



DANIEL HENRIQUE RIBEIRO

**FORMAÇÃO DE UMA COLEÇÃO DE
FRAGMENTOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS
FITOPATOGÊNICAS QUARENTENÁRIAS E
NÃO QUARENTENÁRIAS REGULAMENTADAS
PARA FINS DIAGNÓSTICOS**

LAVRAS – MG

2011

DANIEL HENRIQUE RIBEIRO

**FORMAÇÃO DE UMA COLEÇÃO DE FRAGMENTOS ISOLADOS DE
BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS QUARENTENÁRIAS E NÃO
QUARENTENÁRIAS REGULAMENTADAS PARA FINS
DIAGNÓSTICOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
programa de pós-graduação em
Agronomia/Fitopatologia, área de
concentração em Fitopatologia, para
a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS – MG

2011

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

Ribeiro, Daniel Henrique.

Formação de uma coleção de fragmentos isolados de bactérias fitopatogênicas quarentenárias e não quarentenárias regulamentadas para fins diagnósticos / Daniel Henrique Ribeiro. – Lavras : UFLA, 2011.

87 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Bibliografia.

1. Fitobactérias. 2. Clonagem. 3. Controles positivos. 4. PCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.90873282

DANIEL HENRIQUE RIBEIRO

**FORMAÇÃO DE UMA COLEÇÃO DE FRAGMENTOS ISOLADOS DE
BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS QUARENTENÁRIAS E NÃO
QUARENTENÁRIAS REGULAMENTADAS PARA FINS
DIAGNÓSTICOS**

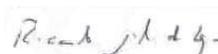
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de Setembro de 2011.

Profa. Dr^a. Antônia do Reis Figueira – UFLA

Prof. Dr. Antônio Chalfun Júnior – UFLA

Orientador



Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS – MG

2011

A tudo e a todos que tornaram possível a cristalização deste trabalho.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade concedida para a realização do curso de mestrado,

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

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

Ao professor Dr. Ricardo Magela de Souza pela amizade, oportunidade e orientação que foram imprescindíveis para o meu crescimento pessoal e profissional,

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

Ao professor Dr. Antonio Chalfun Júnior, pelos conhecimentos adquiridos na disciplina de Biologia Molecular e por se dispor a participar como membro na banca examinadora,

Aos meus colegas do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do DFP/UFLA, por todo companheirismo, amizade e ensinamentos,

Aos meus pais, Lindalva e Maurílio, aos meus irmãos, Vanessa e Renato, e aos meus familiares, por toda compreensão, aprendizado e suporte, que foram a base do meu crescimento, e por dividirem uma existência comigo,

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

Ao Mateus por toda amizade e presença especial em minha vida,

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

Muito Obrigado, Daniel.

RESUMO

A correta detecção e identificação do agente causal de uma doença é fator essencial para evitar a sua introdução em novas áreas de cultivo, bem como na adoção de práticas eficientes de controle. Para isso, várias técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas em procedimentos de detecção, no intuito de diagnosticar e caracterizar o patógeno rapidamente, como a amplificação enzimática direcionada por *primers* de DNA, ou reação da polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction – PCR*), vastamente utilizada para detecção de fitobactérias. Entretanto, para minimizar as possibilidades de falhas na execução e garantir uma margem razoável de segurança na técnica, é necessário dispor de meios para a validação da metodologia utilizada. Nesta validação da técnica utilizada na diagnose de fitobactérias são necessários os controles positivos do patógeno para que não ocorram laudos com resultados falsos negativos advindos de problemas na execução da metodologia de diagnose, o que acarretaria problemas futuros para o produtor, para o laboratório de diagnose e para a agricultura nacional. No caso das Pragas Quarentenárias, existe um risco de se introduzir a bactéria através da dispersão involuntária em regiões onde esta não existe se forem mantidas e utilizadas células viáveis da espécie bacteriana como controle positivo. A montagem de um banco de controles positivos formado a partir de fragmentos de DNA clonados e armazenados destas bactérias quarentenárias eliminaria o risco de epidemia em novas áreas. Com isso os objetivos deste trabalho foi: Montar um banco de controles positivos para bactérias quarentenárias e não quarentenárias regulamentadas, para uso em pesquisa e laudos diagnósticos. Com *primers* específicos utilizados na metodologia de PCR, para se obter fragmentos genômicos de interesse amplificados, que foram purificados, clonados e armazenados, montou-se um Banco de Controles Positivos para as seguintes fitobactérias: *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, *Candidatus Liberibacter americanus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Palavras-chave: Fitobactérias. Diagnose. PCR. Clonagem. Controles Positivos.

ABSTRACT

The correct detection and identification of the causative agent of disease is an essential factor to prevent its introduction into new areas of cultivation, as well as in the adoption of effective control practices. For this purpose, several molecular biology techniques have been used in detection procedures in order to detect and characterize the pathogen quickly, as the enzymatic amplification directed by DNA primers or the polymerase chain reaction – PCR, widely used to detect phyto-bacteria. However, to minimize the possibility of performance failures and to ensure a reasonable safety margin in the technique, it's necessary to have the means to validate the methodology employed. In this technique validation used to diagnose phyto-bacteria, pathogens positive controls are necessary so that does not occur false negative reports arising from problems in the diagnosis methodology performance, which would cause future problems to the producer, to the diagnosis laboratory and to the national agriculture. In the case of quarantine pests, there is a risk of introducing bacteria through the unintentional dispersal in regions where they do not exist if bacterial species viable cells were held and employed as a positive control. Assembling a positive controls library made up from these quarantine bacteria cloned fragments and stored DNA would eliminate the epidemic risk in new areas. Therefore, this work aims: assemble a positive controls library for quarantine and non-quarantine regulated bacteria to employ in research and diagnostic reports. With specific primers employed in the PCR methodology, thus obtaining amplified interesting genomic fragments, which were purified, cloned and stored, it was assembled a positive controls library for the following phyto-bacteria: *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, *Candidatus Liberibacter americanus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Keywords: Phyto-bacteria. Diagnosis. PCR. Cloning. Positive Controls.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Eletroforese em gel de agarose contendo os fragmentos genômicos purificados e clonados obtidos na PCR com primers específicos para <i>Pantoea stewartii</i>	45
Figura 2	Eletroforese em gel de agarose contendo os fragmentos purificados e clonados obtidos na PCR com <i>primers</i> específicos para as espécies bacterianas.....	45
Figura 3	Eletroforese em gel de agarose contendo o fragmento genômico purificado e clonado obtidos na PCR com <i>primers</i> específicos para <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	46
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose contendo o fragmento genômico purificado e clonado obtidos na PCR com <i>primers</i> específicos para <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	47
Figura 5	Eletroforese em gel de agarose do corte com a enzima de restrição <i>EcoR1</i> para a confirmação da clonagem dos isolados com resultado negativo na PCR utilizando o miniprep da espécie bacteriana....	48
Figura 6	Eletroforese em gel de agarose para a diagnose de <i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>	49
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose para a diagnose de HLB (<i>Ca. L. asiaticus</i> e <i>Ca. L. americanus</i>).....	50
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose para a diagnose de <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fitobactérias classificadas como Pragas Quarentenárias A1 no Brasil de acordo com a IN N° 52, de 20 de Novembro de 2007 do MAPA.....	04
Tabela 2	Lista de Bactérias Quarentenárias Presentes (A2) sob controle do Estado.....	06
Tabela 3	<i>Primers</i> descritos para as bactérias do Banco de Controles Positivos.....	38
Tabela 4	Sequência de nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados na formação do banco de controles positivos.....	39
Tabela 5	Etapas da PCR para a amplificação dos fragmentos genômicos dos isolados bacterianos do Banco de Controles Positivos.....	39
Tabela 6	Fragmentos genômicos clonados das espécies bacterianas que compõe a coleção de controles positivos.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1	Bactérias Quarentenárias.....	3
2.2	Bactérias Não Quarentenárias Regulamentadas.....	12
2.3	Detecção de Fitobactérias.....	21
2.4	Banco de controlos positivos.....	25
3	HIPÓTESE.....	32
4	OBJETIVOS.....	33
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1	Obtenção dos isolados bacterianos.....	34
5.2	Extração do DNA.....	35
5.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
5.4	Purificação dos produtos da PCR.....	39
5.5	Clonagem e Extração do DNA plasmidial (Miniprep).....	40
5.6	Digestão dos plasmídeos da Clonagem com a Enzima de Restrição <i>EcoRI</i>	42
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
8	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

TÍTULO: Formação de Uma Coleção de Fragmentos Isolados de Bactérias Fitopatogênicas Quarentenárias e Não Quarentenárias Regulamentadas para Fins Diagnósticos

1 – INTRODUÇÃO

Calcula-se que as doenças, os insetos e as plantas daninhas, juntos provocam perdas em média de 36.5% na produção mundial de alimentos. Deste total, 14.1% são causados pelas doenças nas grandes culturas, que por ano geram prejuízos de aproximadamente 220 bilhões de dólares.

Com a globalização, o Brasil tem a oportunidade de ampliação do mercado interno, obtendo-se assim os benefícios que essa expansão acarreta, como a melhora da economia. Entretanto, em consequência dessa ampliação, podem também ocorrer situações que comprometam a segurança da agricultura, como o livre trânsito de mercadorias entre cidades, estados e países, o que pode veicular doenças para territórios onde antes o patógeno não ocorria, através de mudas, sementes ou qualquer material contaminado. Estas pragas quarentenárias significam risco, pois podem sobreviver de forma latente em sementes e mudas, e possuem a capacidade de serem disseminadas a longas distâncias e introduzidas em áreas antes isentas da doença, atrapalhando o comércio internacional.

A proteção do território nacional contra a entrada de patógenos quarentenários é uma das principais preocupações da Coordenação Geral de Proteção de Plantas – CGPP, que pertence ao Departamento de Sanidade vegetal (DSV) da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Desta forma, adotam-se medidas que visam a prevenção, ou seja, que impeçam a introdução de um

determinado patógeno em áreas isentas. Neste contexto, são necessárias medidas como inspeções rotineiras no campo de produção, aquisição de sementes e materiais de propagação certificados (isentos do patógeno), complementados a exames periódicos de sanidade das sementes em laboratório.

Para a realização dos testes que averiguam a sanidade do material a ser utilizado na agricultura, é necessário contar com métodos específicos, rápidos, seguros e sensíveis para detecção do organismo patogênico no material vegetal e para a determinação do potencial de risco por quantificação precisa deste organismo, podendo-se assim não somente comprovar a sua existência no material testado, mas também se a concentração encontrada é suficiente para causar epidemia no campo.

Particularmente no caso de fitobactérias a preocupação do Sistema de Defesa Vegetal aumenta, pois não há um método químico adequado ou outro tratamento para a sua eliminação sem a destruição do tecido da planta hospedeira. Portanto, a introdução de uma bactéria quarentenária para servir como controle positivo nos testes de diagnose é considerada uma medida de alto risco, pois uma única célula disseminada de forma involuntária e sob condições favoráveis, poderá resultar em epidemia no campo. Por outro lado, é necessário dispor sempre de um controle positivo nos testes diagnósticos nos materiais importados, sem o qual não é possível conferir uma margem razoável de segurança aos mesmos. Assim, a montagem de um banco de controles positivos formados a partir de fragmentos clonados e armazenados de DNA destas bactérias quarentenárias eliminaria o risco de epidemia em novas áreas.

Diante do exposto, formar um banco de plasmídeos será uma medida bastante racional e permitirá a realização de testes em materiais importados com maior eficiência e segurança, pois a correta identificação pode prevenir a ocorrência e os riscos de expansão das doenças nas áreas de produção.

2 – REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 – Bactérias Quarentenárias

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, na Instrução Normativa Nº 52, de 20 de Novembro de 2007, define ‘Praga’ como sendo “qualquer espécie, raça ou biótipo vegetal ou animal ou agente patogênico daninho para as plantas ou produtos vegetais”. E ‘Praga Quarentenária’, como “praga de importância econômica potencial para uma área em perigo, quando a praga ainda não existe ou, se existe, não está dispersa e encontra-se sob controle oficial”. Uma das bactérias quarentenárias citada pela IN 52/2007 é a *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, agente da murcha bacteriana e crestamento foliar em milho doce e milho (*Zea mays* L.) (BRASIL, 2007). Esta doença é um sério problema no centro-norte e região leste dos EUA (HAM et al., 2008). Outra praga quarentenária citada, *Ralstonia solanacearum* raça 2, agente etiológico da murcha bacteriana de Banana (*Musa* spp.) e Helicônia (*Heliconia* spp.), é uma importante doença que ocorre nos Estados do Norte do Brasil, entretanto, devido aos programas oficiais de controle e contenção do patógeno, a bactéria não está totalmente espalhada pelo território nacional (ORGANISATION EUROPÉENNE ET MEDITERRANÉENNE POUR LA PROTECTION DES PLANTES - OEPP, 2006; ZOCCOLI; TOMITA; UESUGI, 2009).

A IN 52/2007 (BRASIL, 2007) define ainda a lista de pragas quarentenárias ausentes (A1) e pragas quarentenárias presentes (A2) para o Brasil, além de instruir sobre medidas fitossanitárias de prevenção, controle, erradicação e monitoramento de plantas e seus produtos passíveis de veicularem pragas, e regulamentam sua utilização em pesquisas. Caso ocorra a detecção de praga quarentenária ausente ou outra praga exótica, deve ser notificada ao MAPA e às instâncias intermediárias do Sistema Unificado de Atenção à

Sanidade Agropecuária, responsáveis pela vigilância fitossanitária na realização dos levantamentos para detecção, delimitação e monitoramento de pragas quarentenárias presentes.

As Pragas Quarentenárias A1 são aquelas que não estão presentes no país, e, caso sejam introduzidas, são potenciais causadoras de importantes danos econômicos. As fitobactérias quarentenárias A1 no Brasil são:

Tabela 1- Fitobactérias classificadas como Pragas Quarentenárias A1 no Brasil de acordo com a IN N° 52, de 20 de Novembro de 2007 do MAPA

Espécies bacterianas	Principais Hospedeiros
<i>Burkholderia glumae</i>	Arroz
<i>Candidatus Liberibacter africanus</i>	Citros
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	Alfafa
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	Milho
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Batata
<i>Erwinia amylovora</i>	Maça e Pêra
<i>Erwinia salicis</i>	Salgueiro branco
<i>Erwinia rhapontici</i>	Cereais
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	Milho
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atropaciens</i>	Trigo
<i>Rhodococcus fascians</i>	Ervilha
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>	Citros
<i>Xanthomonas cassavae</i>	Mandioca
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Arroz
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	Arroz
<i>Xanthomonas populi</i>	<i>Populus</i> spp.
<i>Xylophilus ampelinus</i>	Uva

Esta relação das pragas quarentenárias ausentes (A1) ampara a vigilância agropecuária internacional na fiscalização das mercadorias que chegam ao Brasil pelos portos de fronteira, portos e aeroportos. Pelas normas de trânsito internacional, uma mercadoria infestada por praga quarentenária pode ser impedida de entrar no País e, dependendo do caso, o comércio daquele produto entre os países pode ser suspenso. A lista de pragas quarentenárias ausentes subsidia a política do MAPA para prevenção e erradicação de pragas e, portanto, deve ser revisada periodicamente.

As Pragas Quarentenárias A2 são aquelas de importância econômica potencial para uma área em perigo e que já estão presente no país, porém não estão dispersas em todo o território produtor deste país, e encontram-se sob controle oficial (possuem programas oficiais de controle). Estas pragas quarentenárias presentes também afetam o trânsito interestadual de vegetais e seus produtos, controlado pela certificação fitossanitária de origem e permissão de trânsito de vegetais. A relação dos estados onde ocorrem pragas quarentenárias foi atualizada com a revisão da IN 52 de 2007 pela IN 41 de 2008.

A relação das fitobactérias quarentenárias A2 para o Brasil encontra-se na tabela 2:

Tabela 2 – Lista de Bactérias Quarentenárias Presentes (A2) sob controle do Estado

Bactérias	Hospedeiros	Ocorrência*
<i>Candidatus Liberibacter americanus</i> e <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Citrus</i> spp., <i>Fortunella</i> spp., <i>Poncirus</i> spp., e Murta (<i>Murraya paniculata</i>)	MG, PR e SP.
<i>Ralstonia solanacearum</i> raça 2	Bananeira (<i>Musa</i> spp.), e <i>Heliconia</i> spp.	AP, AM, PA, PE, RO, RR e SE.
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>Citrus</i> spp., <i>Fortunella</i> spp., <i>Poncirus</i> spp.	MT, MS, MG, PR, RS, RR, SC e SP.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	<i>Vitis vinifera</i> , <i>V. labrusca</i> cv. Isabel, Híbridos de <i>V. vinifera</i> x <i>V. labrusca</i> cv. Niágara Branca e Niágara Rosada, Híbrido de <i>V. viticola</i> <i>berlandieri</i> x <i>V. rupestris</i> x <i>V. riparia</i> cv. Paulsen 1103	BA, CE e PE.

(* – Unidades Federativas de Ocorrência da Praga)

Dentre as bactérias quarentenárias A1, foi selecionada uma espécie da lista das Pragas Quarentenárias A1, enquanto o Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia (DFP) da UFLA aguarda a autorização da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) para trabalhar com patógenos quarentenários, como regulamentado pela Instrução Normativa N° 1 de 15 de Dezembro de 1998. O Laboratório de Bacteriologia de Plantas do DFP/UFLA possui todas as condições necessárias para o trabalho em regime de

contenção de patógenos quarentenários, pois faz parte do Laboratório Integrado de Estudos em Biologia Molecular de Fitopatógenos (BIOFITO) do DFP/UFLA, que possui o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) para trabalhar com Organismos Geneticamente Modificados (OGM), como registrado pelo N° do CQB 0145/01 (BRASIL, 2002).

A espécie quarentenária A1 e cinco espécies bacterianas que compõem a lista das Pragas Quarentenárias A2 foram selecionadas para este trabalho a partir de detecções em amostras naturalmente infectadas enviadas para análise na Clínica Fitossanitária do DFP/UFLA.

Baseado nestas características, as espécies bacterianas escolhidas para serem abordadas nesta pesquisa foram:

***Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Smith 1898) Mergaert, Verdonck & Kersters, 1993.**

P. stewartii subsp. *stewartii* é uma bactéria gram-negativa, disseminada de forma eficiente pelo inseto vetor *Chaetocnema pulicaria* (pulguinha do milho) que abriga e transfere a bactéria de uma planta para outra durante o período vegetativo, à distâncias consideráveis. Uma vez que o inseto adquire a bactéria, este pode carregá-la e transmiti-la por toda a sua vida. A bactéria também pode ser transmitida por sementes, porém com baixa frequência (MICHENER; PATAKY; WHITE, 2002). Entretanto, o risco potencial de transmissão por sementes é considerado tão importante no comércio internacional de sementes de milho, que muitos países proibiram a sua importação, a menos que sejam certificadas como livres da bactéria (COPLIN et al., 2002).

Nas variedades de milho doce e híbridos suscetíveis, a bactéria coloniza principalmente o tecido vascular, causando murcha em fase de primeira folha,

mas são encontradas também nas raízes, caules, lâminas e bainhas, pendões, sabugo, palha e grãos. Em plantas jovens afetadas as folhas desenvolvem coloração do verde-claro ao amarelo, com margens irregulares ou onduladas, que podem se estender ao longo da folha. Com o passar do tempo as estrias se ampliam, as lesões passam a amarelo pálido e, eventualmente, tornam-se castanhas. As plantas podem ser destruídas no estágio de plântula ou, se forem infectadas em idades posteriores, ainda podem atingir um tamanho razoável (HERRERA et al., 2008). Sementes de milho raramente são infectadas, exceto quando os níveis da doença são altos e a cultivar suscetível (KOUTSOUDIS et al., 2006).

As temperaturas elevadas agravam a severidade da doença, entretanto a incidência em cada época está correlacionada às temperaturas do inverno anterior (através do seu efeito sobre o inseto vetor) e esse critério pode ser usado na previsão de níveis de infecção. Em geral, se a soma das temperaturas médias para dezembro, janeiro e fevereiro forem de 32-38°C, a doença tende a ser grave devido ao aumento da sobrevivência dos vetores (ESKER, 2006).

A murcha do milho é a doença mais grave da cultura, causando redução na produtividade e suscetibilidade à podridão. A utilização de cultivares resistentes, sementes sadias, bem como a pulverização com inseticidas para reduzir as populações do vetor, são consideradas medidas de controle da bactéria, que se encontra distribuída na China, Malásia, Tailândia, Polônia, Romênia, Iugoslávia e Itália (HERRERA et al., 2008).

Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter asiaticus

Candidatus Liberibacter americanus e *Candidatus Liberibacter asiaticus*, juntamente com a bactéria quarentenária A1 *Candidatus Liberibacter africanus*, são responsáveis por uma das doenças mais severas encontrada nos citros, o

Huanglongbing (HLB) ou Greening, diagnosticada no Brasil em 2004. Desde então têm causado sérios danos à citricultura do país. Anteriormente conhecida apenas na Ásia e África, atualmente está também presente em vários países do continente americano, além da Península Arábica e Madagascar (COLETTA FILHO et al., 2004).

O HLB no Brasil é causado pelas estirpes asiática e americana, sendo a última encontrada apenas neste país. São bactérias gram negativas, limitada ao floema, pertencentes ao subgrupo *alpha* das proteobacterias. A transmissão da doença de uma planta a outra ocorre principalmente por três mecanismos: enxertia de mudas infectadas, parasitismo dos citros por *Cuscuta* spp. ou pelo inseto vetor da doença, o psíldeo-asiático-dos-citros *Diaphorina citri*. Os sintomas da doença se resumem principalmente em folhas maduras com amarelecimento ao longo das nervuras e manchas cloróticas irregulares, progredindo para o amarelecimento por toda a folha. O fruto apresenta os sintomas mais severos, como tamanho reduzido, assimetria e sabor amargo, provavelmente devido à alta acidez e baixa quantidade de açúcares, o que inviabiliza o seu consumo *in natura* e industrial (PIETERSEN, 2010).

***Xanthomonas campestris* pv. *viticola* Nayudu (Dye), 1974**

O cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* foi observado pela primeira vez no Brasil em 1998 na região de Petrolina no Estado de Pernambuco em plantas da variedade ‘Red Globe’ (MALAVOLTA JÚNIOR et al., 1999), provavelmente introduzida por materiais de propagação vegetal vindos da Índia. A doença se espalhou rapidamente para outras regiões e Estados no país, tornando-se importante por causar perdas significativas na produção, pois as principais variedades cultivadas, como ‘Red Globe’, ‘Itália’, ‘Rubi’, ‘Benitaka’, ‘Patrícia’, são altamente susceptíveis a esse

patógeno. Em 2009, um surto da doença foi diagnosticada em Tupi Paulista, SP, com perdas de 70% a 80%, com suspeita da introdução da doença através de materiais de propagação vegetal infectados oriundos de Petrolina, PE. Entretanto, o governo de São Paulo e a Coordenação de Proteção de Plantas do Estado de São Paulo adotaram medidas de inspeção e erradicação, fazendo a destruição de aproximadamente 4.700 plantas (5 hectares) em 68 pomares. A doença no Estado foi classificada como ausente, detectada em 2009 em um pomar produtor no município de Tupi Paulista, erradicada e sob controle oficial (RODRIGUES NETO et al., 2011).

A bactéria sobrevive de um ciclo para outro em plantas infectadas ou epifiticamente em órgãos da parte aérea, em condições de alta umidade e temperatura, e ainda em hospedeiros alternativos diversos, como mangueira (*Mangifera indica* L.), nim (*Azadirachta indica* A. Juss), *Phyllanthus maderaspatensis* L., aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), cajá-manga (*Spondias dulcis* G. Forst.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), entre outras espécies. Ela afeta folhas, ramos e cachos da videira. Nas folhas, aparecem manchas angulares escuras envoltas por um halo amarelado. Áreas necróticas marrom-claras desenvolvem-se ao longo das nervuras que, coalescendo, atingem grande parte do limbo foliar e, posteriormente, secam, escurecendo o tecido. Nos ramos verdes, aparecem cancrios ovalados de coloração marrom, com bordos escuros, centro deprimido e fendilhamento do tecido. Pedúnculo, ráquis, ramificações laterais e pedicelos dos cachos, quando atacados, apresentam uma podridão mole de coloração marrom-escura. No ráquis observa-se pequenas caneluras longitudinais, causadas pela desintegração dos tecidos. As bagas murcham, podendo ou não ficar presas ao pedicelo (HICKEL et al., 2005).

***Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Dowson, 1970, Hasse, 1915, Vauterin et al., 1995) Schaad et al., 2006**

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*Xcc*), agente causal do cancro cítrico, é um importante patógeno de áreas produtoras de Citros nas regiões tropicais e subtropicais. A doença pode afetar uma ampla variedade de espécies de Citros e, conseqüentemente, está sujeita a programas nacionais de erradicação e regulamentos internacionais (KOSITCHAROENKUL et al., 2011). É uma doença endêmica na Flórida (EUA), dispersada principalmente por gotas de chuva associadas com ventos, podendo também ser dispersa diretamente por pessoas que freqüentam os pomares, através de ferramentas e roupas, sendo que uma vez depositada sobre a planta cítrica, o patógeno penetra nos tecidos jovens por meio de aberturas naturais, tais como estômatos e hidatódios, ou ferimentos em tecidos maduros (BOCK et al., 2011). O cancro cítrico é uma importante doença nas áreas produtoras do Brasil e os danos são agravados pelo inseto minador das folhas dos citros *Phyllocnistis citrella*, que aumenta a coalescência das lesões devido às galerias feitas pelo inseto nos tecidos do mesófilo foliar. A erradicação das plantas é a principal estratégia de proteção dos pomares contra a doença. Além disso, o uso de variedades resistentes é também uma estratégia importante, para o controle a longo prazo da doença (AMARAL et al., 2010).

Os sintomas do cancro cítrico são verificados nas folhas nas partes adaxial e abaxial, ramos e frutos como lesões circulares, corticosas, eruptivas, de coloração parda e circundadas por um halo amarelo. A doença em estágio avançado é capaz de intensa desfolha, depreciação e queda de frutos (KOSITCHAROENKUL et al., 2011).

2.2 – Bactérias Não Quarentenárias Regulamentadas

A IN 52/2007 define “Praga Não Quarentenária Regulamentada como praga não quarentenária cuja presença em plantas para plantio influi no seu uso proposto, com repercussões economicamente inaceitáveis e que, portanto, está regulamentada no território da parte contratante importadora” (BRASIL, 2007). Estas pragas não quarentenárias regulamentadas são aquelas cuja presença em plantas ou em parte delas, causam prejuízos inaceitáveis para cultura, como por exemplo, *Pectobacterium carotovorum*, agente etiológico da podridão mole da batata, que pode causar perdas significativas de até 100% durante a estocagem dos tubérculos (BENELLI et al., 2004; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITES NATIONS - FAO, 2006; MERCADO COMUM DO SUL - MERCOSUL, 1999).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa N° 40, de 24 de Novembro de 2006, estabelece os critérios para identificação e definição dos respectivos limites de tolerância a serem empregados nas medidas fitossanitárias relativas às denominadas Pragas Não Quarentenárias Regulamentadas – PNQR, a serem observados na comercialização de sementes ou Material de Propagação Vegetal (MPV) entre os países do Mercosul, definindo também os procedimentos técnicos para a Análise de Risco das Pragas (ARP) para as PNQR, bem como os processos integrados a serem adotados na avaliação do risco e opções de manejo do risco, para a área de ARP (BRASIL, 2006).

O MAPA também definiu os níveis de tolerância de pragas para as Pragas Não-Quarentenárias Regulamentadas em sementes e outros materiais de propagação vegetal, através da Portaria N° 47 de Fevereiro de 2009, sendo esta medida adotada e recomendada pela ABRASEM (Associação Brasileira de Sementes e Mudas). Estes níveis de tolerância variam de acordo com a espécie bacteriana, sendo proporcionalmente inversos aos danos causados pela fitobactéria. Nesta lista também estão indicados os respectivos métodos de

análise, tamanho máximo do lote e indicação de ano/safra de implementação para as respectivas categorias de sementes. Para algumas fitobactérias foram definidas, por exemplo, o nível de tolerância zero em uma amostra de 6.000 sementes (lotes de 25.000 sementes) utilizando-se meios semi-seletivos, como para *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, agente etiológico da mancha angular do algodoeiro. Para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, agentes do crestamento bacteriano comum e murcha do feijoeiro, o nível de tolerância em uma amostra de 5.000 sementes (lotes de 25.000 sementes) também é zero, utilizando-se os meios semi-seletivos respectivos para cada bactéria.

As PQNR selecionadas neste trabalho foram aquelas que possuem uma grande demanda de diagnose na Clínica Fitossanitária do DFP/UFLA, no qual o Laboratório de Bacteriologia de Plantas realiza as detecções pertinentes às fitobactérias. As PQNR abordadas neste trabalho foram:

***Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges, 1922) (Collins & Jones, 1983)**

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*, agente etiológico da murcha-de-Curtobacterium em feijão (*Phaseolus* sp.) e queima bacteriana da soja (*Glycines max* (L.) Merrill.), é transmitida principalmente por sementes, onde permanece viável por vários anos, e pode sobreviver no solo por até dois anos, mesmo naquelas áreas produtoras de feijão onde há rotação de cultura com milho. Como principais sintomas desta doença podem ser citados a murcha e flacidez dos folíolos durante períodos quentes e secos, normalmente progredindo para a formação de lesões amareladas e necróticas nas folhas e descoloração nas sementes. Esta bacteriose teve seu primeiro relato no estado de Dakota do Sul nos Estados Unidos da América, em 1920, onde causou severas perdas e se

tornou a principal doença bacteriana do feijão deste país na época, mas veio perdendo a importância quando medidas de controle, como a utilização de sementes saudáveis e cultivares resistentes, foram sendo implantadas (MORAES et al., 2010).

No Brasil a murcha-de-*Curtobacterium* do feijoeiro foi constatada em 1995 no estado de São Paulo e hoje se encontra distribuída em grande parte das principais regiões produtoras da cultura. Em 2001, foi detectada no Distrito Federal e nos estados de Goiás e Santa Catarina, inicialmente no município de Campos e, mais recentemente, nos municípios de Faxinal dos Guedes, Guatambú, Ipuacu, Ponte Serrada e Tigrinhos, indicando adaptabilidade do patógeno ao hospedeiro em diferentes ambientes, demonstrando a necessidade da adoção de medidas para o seu controle. O feijão é cultivado durante todos os meses do ano e a sua produção ocorre em quase todo o território nacional, o que permite a sobrevivência do patógeno (VALENTINI et al., 2010).

***Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al., 1984.**

Clavibacter michiganensis compõe um complexo de espécies envolvendo mais quatro subespécies denominadas de *C. m.* subsp. *nebraskensis*, crestamento bacteriano e murcha do milho (*Zea mays* L.), *C. m.* subsp. *sepedonicus*, podridão em anel da batata (*Solanum tuberosum* L.), *C. m.* subsp. *insidiosus*, murcha bacteriana e nanismo da alfafa (*Medicago sativa* L.), e *C. m.* subsp. *tesselarius*, sarda e mancha bacteriana do trigo (*Triticum vulgare* Vill.) (GARTEMANN et al., 2003). Entretanto, estas subespécies são classificadas apenas pelo hospedeiro, pois representam apenas uma espécie filogenética (LEE; BARTOSZYK; DAVIS, 1997).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm), uma praga quarentenária na União Européia, é o agente etiológico da mais importante

doença bacteriana do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), o cancro, causando perdas econômicas substanciais nas principais regiões produtoras do mundo. Atualmente, não existem cultivares resistentes nem controle químico eficaz para esta bacteriose, portanto, a prevenção da doença é feita principalmente por meio de sementes e material vegetal de propagação certificados, sem a presença do patógeno (KLEITMAN et al., 2008).

As sementes contaminadas são a principal forma de disseminação do patógeno a longas distâncias e sua sobrevivência por longos períodos. O patógeno pode também sobreviver em restos de cultura, hospedeiros alternativos, na forma de populações epífitas em plantas não-hospedeiras, no solo e em locais não convencionais, como estacas de madeira, bambu e caixas. O inóculo dessas fontes pode ser disseminado por respingos de água ou por práticas culturais, tais como estaqueamento, desbrota, amarração, capação e colheita (WRUCK et al., 2006).

***Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, 1902**

Pseudomonas syringae pv. *syringae* é o agente da mancha bacteriana marrom em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), da mancha syringae em tomateiro (GILARDI; GULLINO; GARIBALDI, 2010) e do crestamento bacteriano e morte de flores da pereira européia (ROMMEL; VALDEBENITO-SANHUEZA; DUARTE, 2010), doença ainda não descrita no Brasil. Os principais sintomas se constituem de manchas amarronzadas sem halo clorótico no caule, pecíolos e folhas. Causa também o cancro bacteriano do damasco, juntamente com o patovar *morsprunorum* (DONMEZ; KARLIDAG; ESITKEN, 2010). É capaz também de estabelecer populações epifíticas em uma grande variedade de plantas sadias, que servirão como fonte de inóculo primário para

infecção das plantas, sob condições ambientes favoráveis à doença (KURZ et al., 2010).

Os sintomas da doença em pereiras europeias não devem ser confundidos com o fogo bacteriano causado pela bactéria quarentenária A1 *Erwinia amylovora*, para que não ocorra confusão nos laudos diagnósticos, o que poderia aumentar o risco de introdução desta espécie bacteriana no país. A principal característica que distingue o fogo bacteriano do crestamento bacteriano é a queima do ápice dos ramos com encurvamento em forma de ‘cajado’ que ocorre como principal sintoma do fogo bacteriano (ROMMEL; VALDEBENITO-SANHUEZA; DUARTE, 2010).

***Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe, 1933) Young, Dye & Wilkie, 1978**

A pinta bacteriana do tomateiro, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* é considerada uma doença economicamente importante em vários países produtores. No Brasil foi observada pela primeira vez em plantios de tomate no Estado de São Paulo. Nos últimos anos, a doença tornou-se importante nas principais regiões produtoras de tomate industrial, cultivado sob pivô central. Sob condições de temperatura entre 20 e 25°C e alta umidade, pode causar grandes perdas na produção (GULLINO et al., 2009; KUNKEAW; TAN; COAKER, 2010; SILVA et al., 2006).

A doença causa queima e desfolhamento precoce, surgindo em plantas que se mostraram assintomáticas no transplante, quando as condições climáticas se tornam favoráveis. Em canteiros, a doença pode ser drástica, causando severo desfolhamento e pode continuar, embora freqüentemente com reduzida severidade, em plantas transplantadas no campo. Devido ao alto potencial de multiplicação da bactéria sob condições de alta umidade relativa e temperatura ótima, mesmo uma baixa porcentagem inicial de plantas infectadas pode levar a

severas perdas na cultura. Nas folhas, ocasiona lesões escuras de 2-3 mm de diâmetro, geralmente circundadas por halo clorótico, que, coalescendo, podem formar manchas necróticas escuras. Nas hastes, os sintomas são semelhantes, mas sem o halo clorótico. Nos frutos ocasiona lesões superficiais, escuras e puntiformes, raramente excedendo 1 mm de diâmetro, podendo ser destacadas dos mesmos. O tecido ao redor das lesões pode permanecer verde, mesmo com o amadurecimento do fruto. A doença pode ser confundida com outras doenças do tomateiro, principalmente com a mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, visto que os sintomas podem ser inicialmente semelhantes em folhas e frutos (GULLINO et al., 2009; SILVA et al., 2006).

As principais fontes de inóculo desta bacteriose são as sementes, restos culturais, hospedeiros alternativos e solo. Assim, uma das medidas mais eficientes de controle constitui-se na produção de sementes sadias, aliado a uma fiscalização rigorosa nos campos de produção e análise dos lotes de semente. Entretanto a detecção da fitobactéria quando em baixa incidência nas sementes tem sido difícil, devido ao grande número de bactérias saprófitas, taxonomicamente relacionadas que interferem com o crescimento em meios semi-seletivos (SILVA et al., 2006; WILLIS; KINSCHERF, 2008).

***Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Foster 1971) Young et al. 1978**

O fogo selvagem causado por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* afeta o fumo e outras culturas economicamente importantes como a soja e o feijão. Os sintomas surgem com mais frequência nas folhas, embora toda a planta possa ser atacada. As lesões se apresentam como manchas de aparência oleosa, de cor amarelo acinzentado, medindo de 0,5 a 1,0 cm de diâmetro, começando nos bordos da folha, progredindo em direção ao centro. As lesões apresentam o centro marrom, sendo circundadas por um halo verde amarelado. Em poucos

dias as lesões, nem sempre circulares, podem atingir de 2 a 3 cm de diâmetro e coalescerem, originando a formação de lesões grandes e irregulares, produzindo necrose e morte das folhas (RODRÍGUEZ; MARQUES, 2004; STEFANOVA et al., 2009).

O principal fator de virulência da bactéria é a produção da tabtoxina responsável pela formação do halo clorótico ao redor das lesões, intervenção no metabolismo de nitrogênio da planta e acúmulo de compostos de amônio nos tecidos interferindo na fotossíntese. A fitotoxina não é restrita ao patovar *tabaci*, sendo produzida também pelos patovares *garcae* e *coronafaciens*. É dependente das condições de cultivo para ser produzida “in vitro”. Causa clorose e necrose nos tecidos da planta e diminui suas respostas de defesa contra a invasão da bactéria (LYDON; PATTERSON, 2001; RODRÍGUEZ; MARQUES, 2004).

As sementes contaminadas constituem a principal fonte de inóculo primário e de disseminação a distância, onde a bactéria pode sobreviver por até 2 anos. Esta sobrevive também em restos de cultura, plantas invasoras ou em hospedeiros alternativos, que servem como fonte de inóculo secundário. É disseminada dentro do campo pela ação de chuvas e ventos, e perdas severas ocorrem em anos de chuva intensa associada a ventos e temperatura elevada. A principal medida de controle é o tratamento de sementes, juntamente com tratamento de canteiros com compostos cúpricos, rotação de área para sementeira, destruição de restos de culturas nas proximidades dos canteiros, rotação de cultura, evitando-se feijão, soja e outras espécies susceptíveis e fertilização adequada, evitando-se excesso de nitrogênio (RODRÍGUEZ; MARQUES, 2004).

***Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel, 1895) Dowson, 1939**

Xanthomonas campestris pv. *campestris* é causadora da podridão negra das crucíferas, a mais importante bacteriose necrotrófica de ocorrência mundial em plantas do gênero *Brassica* e em outros membros da família Brassicaceae. A bactéria infecta seus hospedeiros principalmente pelos hidatódios marginais das folhas, e através destes atingem os tecidos vasculares. Algumas raças também podem infectar a planta através dos estômatos e colonizar os espaços apoplásticos antes de penetrar os tecidos vasculares. Entretanto as condições ótimas para esse tipo de infecção são raras, pois são necessárias modificações nas ceras cuticulares que se encontram ao redor dos estômatos para que suas características hidrofóbicas sejam reduzidas e permitam a penetração da bactéria. Outros sítios de infecção incluem raízes ou feridas nas folhas, mas em todos os casos, o último sítio de infecção são os tecidos vasculares (AIRES et al., 2011).

Os principais sintomas da doença, são lesões necróticas em formato de ‘V’ das bordas do limbo foliar em direção ao centro, lesões necróticas em raízes, escurecimento dos tecidos vasculares com murcha intensa e necrose. Em alguns casos ocorrem a clorose e a queda prematura das folhas, além do apodrecimento das plantas. A bactéria é transmitida principalmente por sementes contaminadas e, em períodos mais úmidos, podem chegar a perdas de até 60% nas principais brássicas cultivadas, como brócolis (*Brassica oleracea* var. *italica* L.), couve-flor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) e repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) (AIRES et al., 2011; PERUCH; MICHEREFF; ARAÚJO, 2006).

A principal forma de combate a esta bacteriose é o emprego de sementes saudáveis. Entretanto a bactéria também pode sobreviver por até dois anos em restos de cultura e ser transmitida pelo inseto vetor *Calliphora vomitoria*, a mosca varejeira azul, resultando em sementes infectadas que levarão a bactéria para outras áreas distantes (WOLF; ZOUWEN, 2010).

A bactéria é também usada na produção da goma xantana empregada na indústria alimentícia como estabilizante, espessante e emulsificante (CARIGNATTO et al., 2011).

***Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith, 1897) Vauterin et al., 1995**

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, diferenciáveis em laboratório devido à sua capacidade de produzir melanina *in vitro* (HE et al., 2009; OEPP, 2004a), são os agentes do crestamento bacteriano comum. A doença ocorre em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), principal hospedeiro, e em outras leguminosas como o feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), feijão de traça (*Vigna aconitifolia*), feijão-mungo (*V. radiata*), lab-labe (*Lablab purpureu*) e a mucuna-anã (*Mucuna deeringiana*). Encontra-se espalhada na maioria das regiões produtoras do Brasil, bem como Argentina, Chile, Colômbia, Equador, Paraguai, Uruguai e Venezuela.

A bactéria penetra o hospedeiro pelos estômatos foliares ou por ferimentos e coloniza os espaços intercelulares. O caule é invadido principalmente pelos estômatos do hipocótilo e epicótilo durante a germinação da semente ou através dos tecidos vasculares das folhas e cotilédones infectados. A semente é infectada através do sistema vascular do pedicelo e do funículo. Após a germinação da semente a bactéria permanece no tegumento ou coloniza o cotilédone, resultando na infecção das plantas jovens. Baixas concentrações da bactéria são suficientes para causar epidemias no campo (DARRASSE et al., 2007; OEPP, 2004b).

A bactéria pode permanecer viável por vários anos na semente, bem como em restos de cultura e em hospedeiros alternativos. No campo, é disseminada principalmente por chuvas associadas a vento e por insetos vetores do gênero *Melanoplus* (gafanhotos) e pelo besouro mexicano do feijão

(*Epilachna varivestis*). A doença é mais severa em condições de chuva e alta umidade, com seu desenvolvimento máximo em temperaturas próximas de 28°C (POPOVIC et al., 2010; TEBALDI et al., 2010; TORRES; MARINGONI, 2009).

Nas sementes, os sintomas da doença se caracterizam por sementes apodrecidas, enrugadas ou murchas, caso a infecção ocorra em vagens jovens. As mudas produzidas de sementes infectadas podem ser totalmente destruídas. Manchas angulares e com anasarca podem aparecer nas folhas primárias em lados opostos, indicando que a infecção se iniciou enquanto as folhas ainda estavam unidas. No campo, os sintomas se iniciam com áreas pequenas de anasarca na superfície das folhas, que crescem e ficam rodeadas por halos cloróticos, que evoluem para necrose e resultam em desfolha, dando um aspecto de queima na cultura (ABD-ALLA; BASHANDY; SCHENELL, 2010; OEPP, 2004b).

2.3 – Detecção de Fitobactérias

A correta detecção e identificação do agente causal de uma doença é fator essencial para se evitar a sua introdução em novas áreas de cultivo, bem como na adoção de práticas eficientes de controle (NIÑO-LIU; DARNIELLE; BOGDANOVE, 2005).

Métodos para diagnose de bacterioses em plantas e sementes estão disponíveis na literatura especializada (TEBALDI et al., 2010), pois as sementes e outros materiais vegetais de propagação são amplamente distribuídos em várias partes do mundo, portanto, é importante que patógenos não desejados associados a eles sejam detectados. Mas caso estes estejam presentes, devem ser detectados em níveis pré-determinados como não capazes de causar prejuízos econômicos no país importador. Estes métodos variam desde o tradicional

plaqueamento em meios de cultura seletivos às técnicas mais complexas envolvendo testes moleculares (PCR) e sorológicos (ELISA), utilizando *primers* ou anticorpos específicos para as espécies de bactérias fitopatogênicas.

O plaqueamento em meios de cultura seletivos tem sido utilizado rotineiramente para diagnosticar e detectar a viabilidade de bactérias, no entanto, é um método demorado, trabalhoso e demanda técnicos especializados para a identificação de cada patógeno (BEHLAU; NUNES; LEITE JÚNIOR, 2006).

Existem ainda índices consideráveis de insucesso, como possíveis contaminações das placas, ou a ocorrência de bactérias fastidiosas, que têm requerimentos nutricionais elevados, sendo necessários meios enriquecidos com compostos específicos para que sejam capazes de se desenvolverem *in vitro*, como no caso de *Xylella fastidiosa*. Tais bactérias necessitam de elevado tempo para formarem colônias, podendo gerar falsos negativos, ou simplesmente não estarem presentes na amostra, havendo um gasto excessivo de tempo na espera do surgimento da colônia (COLETTA-FILHO; MACHADO, 2001; COPLIN et al., 2002). Este longo processo é dispendioso e, por conseguinte, seria desejável dispor de métodos mais rápidos e seguros nas identificações de bactérias (COLETTA-FILHO; MACHADO, 2001; PALOMO et al., 2000).

Com o avanço da ciência, várias técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas em procedimentos de detecção, no intuito de rapidamente diagnosticar e caracterizar o patógeno. Inúmeros trabalhos foram publicados evidenciando a eficiência de tais técnicas como a amplificação enzimática direcionada por *primers* de DNA, ou reação da polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), para detecção de fitobactérias (BACH et al., 2003; COLETTA FILHO et al., 2006; GONÇALVES; ROSATO, 2002; GOTTSBERGER, 2010; LOUWS et al., 1999; NANDAKUMAR, 2009; OBRADOVIC; KEVRESAN, 2010; SOUZA; MARINGONI; KRAUSE-SAKATE, 2006; TEBALDI et al., 2010; TEGLI; SERENI; SURICO, 2002; WOLF et al., 2005).

Estas técnicas baseadas em PCR apresentam alto grau de sensibilidade e são úteis para o diagnóstico nos casos em que este se faz necessário, como quando existe a suspeita de infecção, e também são essenciais em quarentenas já que as plantas ou sementes não apresentam sintomas da doença, ainda que carreguem o patógeno.

A PCR tem sido cada vez mais utilizada como rotina em laboratórios de diagnose, na detecção precoce de algumas fitobactérias em plantas e sementes, antes mesmo do surgimento dos sintomas na planta, de forma mais rápida, fácil e com um alto nível de sensibilidade, se comparada aos métodos tradicionais, trazendo economia de tempo e dinheiro nos trabalhos de diagnose e identificação (COLETTA FILHO et al., 2006; GONÇALVES et al., 2002).

Entretanto, sementes de algumas plantas contêm inibidores da PCR, que não são eliminados com facilidade em métodos de extração. Como forma de resolver o problema, Schaad et al. (1999) idealizaram a BIO-PCR. Esta técnica fornece o benefício adicional da “amplificação biológica” (plaqueamento de suspensões bacterianas advindas das amostras a serem testadas com a finalidade de se obter colônias suspeitas para serem testadas na PCR), permitindo assim uma melhora na detecção de patógenos em sementes com níveis baixos de contaminação, além de diminuir as chances de detecção de células mortas.

Os *primers* utilizados nesta técnica são filamentos de ácido nucléico que servem como ponto de partida para a síntese de DNA. O DNA da amostra, durante os ciclos da PCR, é desnaturado em duas fitas distintas complementares e as DNA polimerases, as enzimas que catalisam a replicação, só podem adicionar novos nucleotídeos após se ligar a uma vertente de DNA dupla fita. Os *primers* então se anelam à estas fitas desnaturadas fornecendo o sítio de ligação para a DNA polimerase para que então o DNA da amostra seja replicado. Estes *primers* são desenhados a partir do sequenciamento e alinhamento das regiões genômicas de interesse, para que então possam ser utilizados posteriormente.

Muitas das técnicas laboratoriais de bioquímica e biologia molecular que envolvem a DNA polimerase, como o sequenciamento de DNA e a PCR, exigem *primers* de DNA. Estes *primers* são geralmente curtos, quimicamente sintetizados, denominados oligonucleotídeos, com um comprimento de cerca de vinte bases. Eles são hibridizados com um DNA alvo, que no caso de detecção de fitobactérias geralmente são utilizados os genes do plasmídeo, de virulência ou sequências do RNA ribossomal, que são copiados pela polimerase (COLETTA FILHO et al., 2006).

Segundo Louws et al. (1999), a especificidade observada na PCR é a habilidade em identificar o patógeno de interesse, na ausência de falsos positivos, quando este não está presente ou na ausência de falsos negativos, quando está presente. Em métodos baseados em PCR, especificidade depende das condições de amplificação, da seleção dos *primers*, da qualidade e quantidade das amostras de DNA, entre outras (GEORGE et al., 1997).

Variações da técnica da PCR, como a rep-PCR, tem sido utilizada na identificação de fitobactérias, diferenciação de isolados e em estudos sobre a diversidade genética de fitopatógenos (BARBOSA, 2007; LELIS, 2009; LOUWS et al., 1999; TEGLI; SERENI; SURICO, 2002; TRINDADE; LIMA; FERREIRA, 2005).

Dentro do genoma de diversas bactérias existem sequências repetitivas conservadas chamadas sequências extragênicas palindrômicas repetitivas (REP), sequências repetitivas intergênicas consenso de enterobactérias (ERIC) e elementos BOX, que são simplesmente as sequências repetitivas conservadas no genoma das bactérias. A análise de rep-PCR foi desenvolvida com base na observação da ocorrência dessas sequências repetitivas (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). Três *primers* são comumente usados para análise rep-PCR *fingerprinting*, correspondendo às sequências ERIC, REP e BOX. Os protocolos são denominados ERIC-PCR, REP-PCR e BOX-PCR,

respectivamente e, quando utilizados coletivamente, rep-PCR (LOUWS et al., 1999).

As metodologias que utilizam as sequências de ERIC, REP e BOX são variações da PCR em que se utilizam *primers* complementares a sequências de DNA de ocorrência natural, altamente conservadas e repetitivas, presentes em múltiplas cópias nos genomas da maioria das bactérias. Três famílias de sequências repetitivas foram identificadas, incluindo a REP de 35 – 40 pb, ERIC de 124 – 127 pb e o elemento BOX de 154 pb. O uso de *primers* desenhados para essas regiões, leva à amplificação seletiva de regiões distintas do genoma. Os *primers* BOX são geralmente recomendados para gerar impressões digitais (*fingerprintings*) mais robustas e produzir um padrão de fragmentos mais complexos. Os *primers* para REP geram menos complexidade, mas ainda produzem padrões de bandas reproduzíveis e que permitem a diferenciação dos isolados. O conjunto de *primers* para ERIC é mais sensível a condições subótimas da PCR, como presença de contaminantes nas amostras de DNA, porém gera padrões de bandas altamente discriminatórios (GANDRA et al., 2008; REIS JÚNIOR et al., 2002; SOUZA; MARINGONI; KRAUSE-SAKATE, 2006; VERSALOVIC et al., 1994; VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

Outra variação recente da técnica da PCR é denominada de *Miniprimer* PCR, onde são utilizados *primers* menores, de aproximadamente 10 nucleotídeos, do que aqueles utilizados pela PCR convencional (17 a 22 nucleotídeos) (ISENBARGER et al., 2008). Esta nova técnica não é utilizada com propósitos de identificação da espécie microbiana, mas sim com a finalidade de se estudar a diversidade do genótipo dos microorganismos (XU et al., 2010).

2.4 – Banco de controles positivos

Controles positivos são microrganismos, seu material genético ou fragmentos variáveis de ácidos nucleicos, escolhidos de acordo com a finalidade do banco, e utilizados como referência em testes diagnósticos, ou seja, na validação da metodologia de diagnose utilizada, para que não ocorram falsos negativos caso haja falha no método em questão. Anzai (2007), em estudos de caracterização e desenvolvimento de sistemas de referências alélicas do loci de *STR* (*Short Tandem Repeats*) para controle de qualidade e identificação humana (genética forense) construiu uma referência alélica com plasmídeos recombinantes (vetor de clonagem unido com o fragmento genômico de interesse – denominado de *insert*) e demonstrou o seu potencial de aplicação como controle positivo na caracterização de diferentes grupos no genótipo humano e relações de parentesco. A identificação forense através da análise de ácidos nucleicos é realizada, freqüentemente, pelo estudo destas regiões polimórficas do DNA, tais como os *STRs*, regiões que apresentam repetições consecutivas curtas. Para a utilização destes marcadores na identificação humana é necessário conhecer a distribuição de seus alelos na população a qual o indivíduo pertence, visto que essa varia entre diferentes populações.

A clonagem de fragmentos genômicos é uma das principais metodologias na tecnologia do DNA recombinante, e consiste no isolamento e propagação de moléculas idênticas de DNA. Esta técnica compreende dois estágios. No primeiro, a molécula de DNA recombinante é formada pela ligação de um inserto de DNA a uma outra molécula de DNA, chamada vetor. O vetor é o veículo da clonagem, pois é ele que transporta o inserto para dentro da célula hospedeira, onde ele será replicado. O segundo estágio consiste na interiorização da molécula de DNA recombinante na célula hospedeira, processo chamado de transformação da célula competente, dessa forma o DNA inserido é replicado

junto com o vetor de clonagem, gerando um grande número de moléculas de DNA idênticas ao inserto (AUSUBEL et al., 1995).

Na construção do banco de controles positivos são utilizadas diversas técnicas de biologia molecular, como PCR, clonagem e sequenciamento das regiões genômicas de interesse. Um banco de controles positivos derivado da amplificação das amostras selecionadas é produzido principalmente pelo método de clonagem. Os clones contêm fragmentos definidos multiplicados que podem ser rapidamente extraídos, sequenciados ou utilizados para diversos fins, como na validação de metodologias de diagnose. Outra rota para esse tipo de caracterização e funcionalização de técnicas moleculares é a clonagem e o sequenciamento do cDNA transcrito a partir do 16S rRNA com a utilização da enzima transcriptase reversa, que polimeriza moléculas de DNA a partir de moléculas de RNA. Estas regiões do RNA ribossomal são amplamente utilizadas na caracterização e detecção de isolados bacterianos por serem altamente conservadas nas espécies de procariotos. O cDNA também é utilizado nos casos em que é necessário clonar um DNA eucarioto em uma bactéria. Neste processo utiliza-se o cDNA formado a partir do mRNA, pois se a clonagem for realizada diretamente de um DNA eucarioto, a bactéria não irá dispor dos mecanismos necessários para o processamento do hnRNA (RNA heterogêneo) precursor do mRNA eucarioto (REIS JÚNIOR et al., 2002).

No processo da clonagem, a molécula de DNA no qual o fragmento de DNA de interesse é inserido poderá ser um plasmídeo bacteriano, um cosmídeo (resultado da hibridação entre uma molécula de DNA de um fago e um plasmídeo bacteriano) ou um bacteriófago (vírus que infectam as bactérias). Normalmente os vetores de clonagem devem conter três regiões essenciais: uma origem de replicação, que permita sua replicação independente do cromossomo hospedeiro; um marcador, que permita que as células contendo o DNA recombinante sejam facilmente identificadas; e uma região na qual possam ser

inseridos os fragmentos de DNA exógeno (sítios de restrição) que serão utilizados pelas enzimas de restrição (ou endonucleases) para abrir a dupla fita de DNA e permitir a inserção de uma nova sequência genômica no plasmídeo. A enzima de restrição reconhece uma sequência palindrômica (repetida nos dois sentidos da dupla fita de DNA) no sítio de restrição e catalisa a destruição das ligações de fosfodiéster entre dois nucleotídeos consecutivos ligados as bases nitrogenadas. A inserção do fragmento de interesse no vetor será mediada pelas DNA Ligases, que são enzimas dependentes de Mg^{2+} que catalisam as ligações de fosfodiéster entre as moléculas na dupla fita de DNA (NASH; LINDAHL, 1996). Também é necessário que o vetor seja relativamente pequeno, sendo o seu tamanho ideal inferior a 10 Kb, pois as moléculas grandes tendem a degradar-se durante a purificação e são também mais difíceis de manipular (BRISCO et al., 1996).

Os plasmídeos bacterianos são moléculas de DNA extracromossomal, fita dupla, circular, que ocorrem naturalmente em bactérias e leveduras. São utilizados comumente como vetores de clonagem, pois satisfazem os critérios citados à cima. Ao receber o DNA, geralmente a célula adquire uma ou mais características, ou marcadores de seleção que permitam distinguir células transformadas de não transformadas. Um exemplo é a capacidade de crescer em meio de cultura contendo antibiótico. No procedimento são usados vetores que possuem um ou mais genes marcadores de resistência a antibióticos. Desta forma, quando cultivadas em meio de cultura contendo antibiótico, apenas as bactérias transformadas com o DNA recombinante sobrevivem e formam colônias. Um plasmídeo que tem um único sítio de restrição com um gene de resistência a antibiótico pode ser usado para identificar se houve sucesso na inserção do fragmento genômico de interesse. Se o fragmento de interesse é ligado neste local de restrição, o gene de resistência a antibiótico, não será mais

ativo. Qualquer bactéria que abriga o plasmídeo com um inserto já não será resistente para este antibiótico particular (CLARK, 2005).

Existem também proteínas marcadoras utilizadas para selecionar as células bacterianas que receberam os plasmídeos com os fragmentos de interesse, como por exemplo a LACZ, que é produto do gene *lac Z*. Este gene pertence ao 'operon lac' do genoma de *E. coli* e codifica a enzima β -galactosidase, responsável por hidrolisar lactose em galactose e glicose. Se a lactose estiver presente no meio, uma pequena quantidade deste açúcar é convertida em alocatose, um indutor do 'operon lac', e se liga fortemente ao repressor mudando sua conformação, reduzindo sua afinidade pelo operador. O IPTG (isopropylthio- β -D-gactoside) induz a transcrição do gene *lac Z* que codifica a β -galactosidase. O X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) é usado como indicador para distinguir colônias contendo o *lac Z* funcional. A β -galactosidase quebra o X-GAL e torna as colônias azuis. Assim, as colônias que não possuem as moléculas de DNA recombinantes terão cor azul, enquanto que as que possuem as moléculas de DNA recombinantes serão brancas. Além disso, *lac Z* tem sido comumente usado como um gene repórter, tanto para localização da proteína quanto para avaliar a atividade transcricional em uma célula ou cultura (WATSON et al., 2006).

Cada célula irá conter no mínimo uma molécula do DNA recombinante que será duplicado antes de cada divisão celular, assim, cópias do DNA plasmidial segregam para cada célula-filha durante a divisão celular, garantindo a propagação contínua dos plasmídeos através das gerações sucessivas da célula hospedeira. A célula hospedeira divide-se várias vezes e forma uma colônia de células derivada da célula original. Assim o fragmento de DNA exógeno de interesse foi multiplicado em várias cópias, cada cópia dentro de cada bactéria da cultura obtida (ZAHA, 2001).

As células hospedeiras que irão receber o vetor de clonagem são geralmente cepas de *Escherichia coli* obtidas para essa finalidade. As linhagens de *E. coli* mais comumente empregadas para construção e propagação de plasmídeos em biologia molecular são DH5 α e DH10B. Porém, para permitir a entrada de DNA plasmidial nas células, as bactérias devem apresentar condições fisiológicas especiais. Este estado fisiológico especial é chamado de competência. Uma célula é dita competente quando está apta a receber DNA exógeno. A competência natural das bactérias é um fenômeno raro que ocorre apenas em algumas espécies e em condições fisiológicas específicas. Assim, é necessário desenvolver essa capacidade, ou seja, é necessário tornar as células competentes para viabilizar a introdução do DNA recombinado no hospedeiro selecionado. Uma célula pode se tornar competente pelo tratamento com íons de cálcio, pois acredita-se que os íons de cálcio mascaram a carga negativa do DNA permitindo que ele passe pela membrana celular (INOUE; NOJIMA; OKAYAMA, 1990).

Com a clonagem se obtém múltiplas cópias de um fragmento de interesse para que se possa manipulá-lo quimicamente. Quando utiliza-se a metodologia chamada de MINIPREP (minipreparação ou isolamento de pequenas quantidades de DNA plasmidial) em um plasmídeo, obtém-se então suficiente número de cópias desse fragmento genômico de interesse para manipulações químicas. O método comumente utilizado é o de lise alcalina. Neste método a célula bacteriana é lisada por tratamento com uma solução contendo Sulfato Dodecil de Sódio (SDS) e NaOH, o SDS desnatura proteínas e o NaOH desnatura DNA cromossomal e plasmidial. A maioria do DNA cromossomal e proteínas bacterianas precipitam e são removidas por centrifugação. O método de isolamento por lise alcalina baseia-se na diferença em desnaturação, em condições alcalinas (pH ~12) entre o DNA plasmidial e o

cromossomal, que tem alto peso molecular. O DNA plasmidial fica no sobrenadante sendo concentrado com etanol (BROWN, 2003).

O processo da criação do banco de controles positivos, portanto, se resume em isolamento de DNA genômico da célula bacteriana, amplificação seletiva da região do genoma de interesse com *primers* específico na PCR, seguido de ligação destes fragmentos genômicos bem caracterizados de DNA a um carreador, chamado de vetor de clonagem. Um dos vetores de clonagem mais utilizados são os plasmídeos bacterianos, pois após a união com o fragmento genômico de interesse, o DNA recombinante (plasmídeo unido ao *insert*) é introduzido na célula hospedeira, geralmente uma *Escherichia coli*, processo denominado transformação da célula competente. Dessa forma o DNA inserido é replicado junto com o vetor presente na célula competente, gerando um grande número de moléculas de DNA idênticas, que podem ser extraídas do vetor de clonagem para serem utilizadas como controles positivos. Tem princípio semelhante ao de uma biblioteca subgenômica, as quais pequenos fragmentos caracterizados são utilizados na criação destas bibliotecas, porém, nestas bibliotecas os fragmentos são obtidos após cortes aleatórios feitos com enzima de restrição (AUSUBEL et al., 1995).

3 – HIPÓTESE

As técnicas moleculares baseadas em PCR são capazes de propiciar o desenvolvimento de uma metodologia de detecção de bactérias com maior precisão, segurança e rapidez. A confiabilidade da técnica se baseia na utilização de controles positivos para a validação da metodologia, que podem ser apenas os fragmentos de DNA de interesse, não sendo necessário manter a bactéria viável nos laboratórios de diagnose, pois a sua substituição por um clone de um fragmento de seu DNA genômico também é eficiente. Portanto a manutenção do banco de controles positivos através da clonagem de um fragmento genômico de valor diagnóstico de bactérias fitopatogênicas irá propiciar a segurança necessária aos laudos diagnósticos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas em apoio à Clínica Fitossanitária do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, sem o risco de introdução de bactérias quarentenárias nas áreas de produção do território nacional, pois para serem utilizadas como controles positivos da técnica de PCR, tanto o DNA extraído da colônia bacteriana quanto apenas um fragmento clonado da bactéria possuem a mesma eficácia.

4 – OBJETIVO

Montar um banco de controles positivos para bactérias quarentenárias e não quarentenárias regulamentadas, para uso em pesquisa e laudos diagnósticos;

5 – MATERIAL E MÉTODOS

5.1 – Obtenção dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos utilizados nesse trabalho foram obtidos das coleções de fitobactérias da Universidade Federal de Lavras (UFLA), incluindo isolamentos de amostras naturalmente infectadas enviadas à sua Clínica Fitossanitária, bem como de outras instituições brasileiras de pesquisa, como o Instituto Biológico (IB) de Campinas/SP e a Universidade Federal de Brasília (UNB). Foram obtidos os seguintes isolados: *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, bactéria quarentenária A1, tendo como principal hospedeiro plantas de Milho (*Zea mays* L.); *Candidatus* Liberibacter americanus, *Candidatus* Liberibacter asiaticus, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, bactérias quarentenárias A2; e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *syringae* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, bactérias não quarentenárias regulamentadas.

Os isolados bacterianos foram cultivados para a extração do DNA com o objetivo de se obter fragmentos genômicos clonados através da reação de PCR empregando-se *primers* específicos para o fragmento informado, procedendo-se à clonagem com Kits comerciais de clonagem (pGEM[®]-T Easy Vector Systems – Promega[®]) no laboratório do DFP-UFLA.

Os DNAs genômicos extraídos das colônias bacterianas, foram preservados em Deep Freezer a -80°C no Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia – UFLA, onde os procedimentos de PCR e clonagem foram realizados.

5.2 – Extração do DNA

As espécies bacterianas não fastidiosas foram cultivadas em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970). O DNA total foi extraído utilizando-se o protocolo de Ausubel et al. (1992) modificado. Aliquotas de 1,5 mL de suspensões bacterianas de cada isolado, cultivadas sob agitação por 24h a 28°C em meio líquido 523 (KADO; HESKETT, 1970), foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 segundos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets ressuspensos em 567µL de TE (10mM Tris-HCl, pH 7,6, 1mM EDTA), 30µL de SDS (10% g/v) e 3 µL de proteinase K (20mg/mL), seguindo-se de agitação manual. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por 1 hora. Ao conteúdo dos tubos foram adicionado 100 µL de NaCl 5M, seguindo-se de agitação em vórtex. Novamente, foram adicionados 80 µL de CTAB/NaCl (4,1g de NaCl e 10 g de CTAB, em 100 mL de água) seguindo-se de agitação em vórtex. Os tubos foram então incubados em banho-maria a 65°C por 10 minutos e, a seguir, à temperatura ambiente, adicionou-se igual volume (780 µL) de clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1, seguindo-se de agitação manual por 10 minutos e centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após este processo, a fase superior de cada tubo foi transferida para novo tubo, medindo-se o volume (geralmente 500 µL). Nesta etapa adicionou-se 0,6 volumes (300 µL) de álcool isopropílico, agitando-se gentilmente até o DNA precipitar. Novamente procedeu-se a centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet lavado com 1 mL de etanol 70%, seguindo-se de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos e posterior descarte do etanol 70%. O pellet então foi ressuspensado em 30 µL de TE e armazenado a -20°C.

Para *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*, bactérias fastidiosas, não cultiváveis em meios de cultura rotineiros, o DNA total foi extraído de acordo com o protocolo modificado de Murray e Thompson (1980), em que quatro

folhas com sintomas típicos de HLB foram separadas, lavadas em água corrente e enxugadas com papel toalha. A seguir retirou-se a nervura central das folhas utilizando-se tesoura desinfestada com álcool etílico 70%, picotou-se a nervura colocando os fragmentos em um cadinho estéril ao qual adicionou-se nitrogênio líquido e triturou-se os fragmentos com pistilo estéril até obter-se um pó homogêneo. Adicionou-se então 1,8 mL de Tampão 1 (Tris HCl pH 7,5 1M /10,0 mL, EDTA 0,5M /2,0 mL, NaCl 5M/14,0 mL, Água Ultrapura /completar 100 mL) mais 12 µL de Mercaptoetanol 140 mM. Homogeneizou-se, adicionou-se 1,2 mL de Tampão 2 (CTAB 5%/20,0 mL, Sarcosyl 10%, PVP 1%/ 20,0 mL, Mercaptoetanol 140 Mm/1,0 mL, Água Ultrapura/completar para 100 mL), transferiu-se para 2 microtubos de 1,5 mL e agitou-se no vórtex (2 microtubos cheios / amostra). Os microtubos foram colocados em banho-maria a 55-60 °C por 30 min. e centrifugados a 4.000 rpm por 5 min (centrífuga a 4 °C). Após, transferiu-se a fase superior (350 µL) para novo microtubo: 350 µL de cada microtubo (2 x 350 µL = 700 µL por amostras) e adicionou-se 700 µL de clorofórmio + álcool isoamílico preparado no momento da extração. Adicionou-se 70 µL de CTAB 10% (CTAB/10,0 g, NaCl 5M/14,0 mL, Água Ultrapura/completar para 100 mL). Agitou-se manualmente com cuidado para não vazar clorofórmio e centrifugou-se a 12.000 rpm por 8 min. Retirou-se 500 µL da fase superior, transferiu-se para novo microtubo e adicionou-se 500 µL de Tampão de precipitação (CTAB/1,0 g, Tris HCl pH 7,5 1M/5,0 mL, EDTA 0,5M/2,0 mL, Água Ultrapura/completar para 100 mL), agitou-se gentilmente e deixou-se em repouso por 1,5 h para precipitação do DNA. Após isto, centrifugou-se a 10.000 rpm por 4 min e descartou-se o sobrenadante com o cuidado para não perder o pellet. Adicionou-se 400 µL de TE alto sal (Tris HCl pH 7,5 1M/1,0 mL, EDTA 0,5M/0,2 mL, NaCl 5M/20,0 mL, Água Ultrapura/completar para 100 mL), colocou-se em banho-maria a 55-60 °C por 10 min. Adicionou-se 800 µL de etanol 100 % gelado e agitou-se gentilmente.

Colocou-se no freezer (-20 °C) por 2 horas ou no Deep freezer (-80 °C) por 15 min. A amostra pode permanecer *overnight* a -20°C. Na seqüência centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 min., removeu-se o sobrenadante, com o cuidado para não perder o pellet, e lavou-se o sedimentado com 700 µL de etanol 70% gelado. Para finalizar, centrifugou-se a 12.000 rpm por 5 min., descartou-se o sobrenadante e secou-se o pellet em câmara de fluxo laminar em temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o pellet adicionando 50 µL de TE 1/10 (Tris HCl pH 7,5 1M/10,0 mL, EDTA 0,5M/20,0 mL, Água Ultrapura/completar para 100 mL) e armazenou-se no freezer (-20°C).

A partir deste momento os DNAs extraídos foram utilizados nas metodologias de PCR convencional, Purificação e Clonagem. Os *primers* específicos descritos para as diversas espécies bacterianas deste trabalho foram sintetizados pela empresa Invitrogen do Brasil Ltda.

5.3 – Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

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

Os ciclos no termociclador foram variáveis com o tipo de isolado bacteriano e dos *primers* empregados (Tabelas 2 e 3). Os produtos finais das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, previamente acrescido do corante Gel Red[®], com visualização das bandas de DNA em luz ultravioleta.

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

Tabela 2 – *Primers* descritos para as bactérias do Banco de Controles Positivos.

Espécie bacteriana	<i>Primers</i>	Autores
<i>Pantoea stewartii</i> (A1)	CPSL1/CPSR2c	Coplin et al. (2002)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> (A2)	Xcv1F/Xcv3R	Trindade et al. (2007)
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> (A2)	Xac01/Xac02	Coletta Filho et al. (2006)
<i>Candidatus Liberibacter</i> <i>americanus</i> (A2)	LSg2f/LSg2r	Coletta Filho et al. (2005)
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> (A2)	OI2c/OI1	Jagoueix, Bové e Garnier (1996)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	X4c/X4e	Audy et al. (1994)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	XCF/XCR	Park et al. (2004)
<i>Curtobacterium flaccumfasciens</i> pv. <i>flaccumfasciens</i>	<i>Cff</i> FOR2/ <i>Cff</i> REV4	Tegli, Sereni e Surico (2002)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	tblA1/tblA2	Lydon e Patterson (2001)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	COR1/COR2	Cuppels (2006)
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CMM-5/CMM-6	Dreier, Bermpohl e Eichenlaub (1995)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	SyrB1/SyrB2	Rommel, Valdebenito- Sanhuesa e Duarte (2010)

Tabela 3 – Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados na formação do banco de controles positivos.

Espécie bacteriana	Sequência de nucleotídeos
<i>P. stewartii</i> (A1)	CPSL1 (5'-CCTGTCAGTCTCGAACC-3') CPSR2c (5'-ATCTCGAACCGGTAACC-3')
<i>X. c. pv. viticola</i> (A2)	Xcv1F (5'-TGCAGGTGAGCTGTGC-3') Xcv3R (5'-TATGGCAAGGTGGTTCGAACT-3')
<i>X.c. subsp. citri</i> (A2)	Xac01 (5'-CGCCATCCCCACCACCACGAC3') Xac02 (5'-AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA3')
<i>Ca. L. americanus</i> (A2)	LSg2f (5'-TTAAGTTAGAGGTGAAATCC-3') LSg2r (5'-CAACTTAATGATGGCAAATA-3')
<i>Ca. L. asiaticus</i> (A2)	OI1 (5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3') OI2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3')
<i>X. a. pv. phaseoli</i>	X4c (5'-GGCAACACCCGATCCCTAAACAGG-3') X4e (5'-CGCCGGAAGCACCGATCCTCGAAG-3')
<i>X. c. pv. campestris</i>	XCF (5'-CGATTCGGCCATGAATGACT-3') XCR (5'-CTGTTGATGGTGGTCTGC AA-3')
<i>C. f. pv. flaccumfasciens</i>	CffFOR2 (5'-GTTATGACTGAACTTCACTCC-3') CffREV4 (5'-GATGTTCCCGGTGTTTCAG-3')
<i>P. s. pv. tabaci</i>	tb1A1 (5'-CTGGTCACTGCGCTAGGC-3') tb1A2 (5'-CGTGATTGACTCAGGGCACTAG-3')
<i>P. s. pv. tomato</i>	COR1(5'-GGACTCAGCAGTATCATCTCGGGACG-3') COR2 (5'-TGCAGGGTCTTGGGGAGCACG-3')
<i>C. m. subsp. michiganensis</i>	CMM-5 (5'-GCGAATAAGCCCATATCAA-3') CMM-6 (5'-CGTCAGGAGGTCGCTAATA-3')
<i>P. s. pv. syringae</i>	SyrB1 (5' – CGTACATGATTACGGCGATG – 3') SyrB2 (5' – TTGTTGCTTGTCGATTTTGC – 3')

Tabela 4 – Etapas da PCR para a amplificação dos fragmentos genômicos dos isolados bacterianos do Banco de Controles Positivos.

Espécie bacteriana	Etapas					
	1	2	3	4	5	6
<i>P. stewartii</i> (A1)	94°C/ 1min	94°C/ 15s	52°C/ 15s	72°C/ 30s	72°C/ 5min	25
<i>X. c. pv. viticola</i> (A2)	95°/ 2min	95°C/ 1min	64°C/ 1min	72°C/ 2min	72°C/ 10min	30
<i>X.c. subsp. citri</i> (A2)	94°C/ 3min	94°C/ 45s	60°C/ 45s	72°C/ 45s	72°C/ 5min	36
<i>Ca. L. americanus</i> (A2)	94°C/ 3min	94°C/ 30s	55°C/ 45s	72°C/ 45s	72°C/ 10min	36
<i>Ca. L. asiaticus</i> (A2)	94°C/ 3min	94°C/ 30s	55°C/ 45s	72°C/ 45s	72°C/ 10min	36
<i>X. a. pv. phaseoli</i>	95°C/ 1min	95°C/ 1min	65°C/ 1min	72°C/ 2min	72°C/ 10min	35
<i>X. c. pv. campestris</i>	94°C/ 5min	94°C/ 15s	58°C/ 15s	72°C/ 30s	72°C/ 5min	35
<i>C. f. pv.</i> <i>flaccumfasciens</i>	94°C/ 3min	94°C/ 1min	62°C/ 45s	72°C/ 30s	72°C/ 5min	30
<i>P. s. pv. tabaci</i>	94°C/ 10min	94°C/ 30s	58°C /20s*	72°C/ 30s	72°C/ 5min	30
<i>P. s. pv. tomato</i>	94°C/ 2min	94°C/ 30s	63°C/ 40s	72°C/ 50s	72°C/ 5min	40
<i>C. m. subsp.</i> <i>michiganensis</i>	95°C/ 5min	94°C/ 1min	55°C/ 90s	72°C/ 1min	72°C/ 5min	30
<i>P. s. pv. syringae</i>	95°C/ 5min	94°C/ 15s	53°C/ 10s	72°C/ 15s	72°C/ 5min	35

(Etapas: **1** – Desnaturação inicial, **2** – Desnaturação, **3** – Anelamento, **4** – Extensão, **5** – Extensão final, **6** – Número de ciclos, * – 5 primeiros ciclos em 20s, após, +2s/ciclo)

5.4 – Purificação dos produtos da PCR

Os produtos selecionados das amplificações por PCR a partir de *primers* específicos foram purificados utilizando-se o kit de purificação comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System – Promega®. A purificação ocorreu diretamente da reação da PCR. As etapas da purificação foram realizadas de acordo com as indicações do fabricante, consistindo na filtragem da reação de PCR, duas lavagens do filtro com etanol e eluição do DNA em água livre de nuclease.

5.5 – Clonagem e Extração do DNA plasmidial (Miniprep)

O DNA purificado foi clonado utilizando-se o Kit de clonagem pGEM®-T Easy Vector (Promega®) conforme instruções do fabricante. A Célula competente de *Escherichia coli* DH5ac foi transformada, adicionando-se 2 µL da reação de ligação (5 µL 2X Rapid Ligation Buffer; 1 µL pGEM®-T Easy Vector; 1 µL T4 DNA ligase; 2 µL produto da PCR e 1 µL H₂O deionizada), seguido de incubação dos tubos por 30 minutos no gelo e choque térmico por 30 segundos a 42°C. Novamente os tubos foram colocados no gelo por 5 minutos. Ao conteúdo dos tubos foram adicionados 280 µL de meio líquido SOC (2 g triptona; 0,5 g extrato de levedura; 1 mL NaCl 1M; 0,25 mL KCl 1M; 97 mL de água destilada; 1mL de glicose 2M, filtrado e 1 mL Mg²⁺ 2M, filtrado). A seguir os tubos foram levados para agitação em “shaker” (80 rpm), por 30 minutos, à temperatura de 37°C.

Em placas descartáveis foi vertido o meio LB sólido (10 g triptona; 5 g extrato de levedura; 10 g NaCl; 15 g ágar, completando-se para 1.000 mL com água destilada) contendo ampicilina (100 mg/mL) e em seguida, suplementado

com IPTG (isopropylthio- β -D-gactoside) e X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside), espalhando-se até a secagem e armazenamento a 37°C.

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

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

A presença do *insert* nos plasmídeos purificados (miniprep) foi verificada com a digestão por enzima de restrição (*EcoRI*), de acordo com as

indicações no kit de clonagem, ou com a PCR utilizando o plasmídeo clonado como o *template* de DNA da reação.

Os fragmentos genômicos clonados foram armazenados no Banco de Controles Positivos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia (DFP – UFLA), em Deep Freezer a -80°C.

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

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

6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos com a utilização de *primers* específicos os seguintes fragmentos para as espécies bacterianas estudadas descritos na tabela 4:

Tabela 6 – Fragmentos genômicos clonados das espécies bacterianas que compõe a coleção de controles positivos.

Espécies bacterianas	Tamanho dos fragmentos da PCR
<i>Pantoea stewartii</i> (A1)	1.100pb
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> (A2)	243pb
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> (A2)	581pb
<i>Candidatus Liberibacter americanus</i> (A2)	545pb
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> (A2)	1.160pb
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	730pb
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	535pb
<i>Curtobacterium flaccumfasciens</i> pv. <i>flaccumfasciens</i>	306pb
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	829pb
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	689pb
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	614pb
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	202pb

Os fragmentos se encontram clonados e depositados no Banco de Controles Positivos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do DFP/UFLA (Figuras 1 a 8).

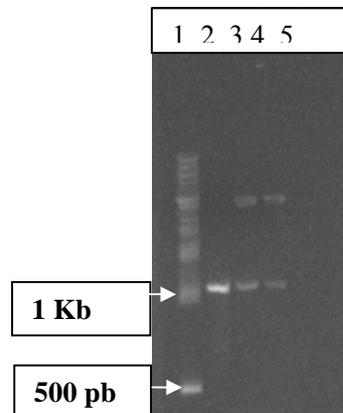


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose contendo os fragmentos genômicos purificados e clonados obtidos na PCR com primers específicos para *Pantoea stewartii*: 1 – Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco[®]), 2 – PCR Purificada de *Pantoea stewartii*, 3 – PCR do miniprep de *Pantoea stewartii*, 4 – PCR do miniprep de *Pantoea stewartii*, 5 – PCR utilizando Controle negativo (Água Ultrapura).

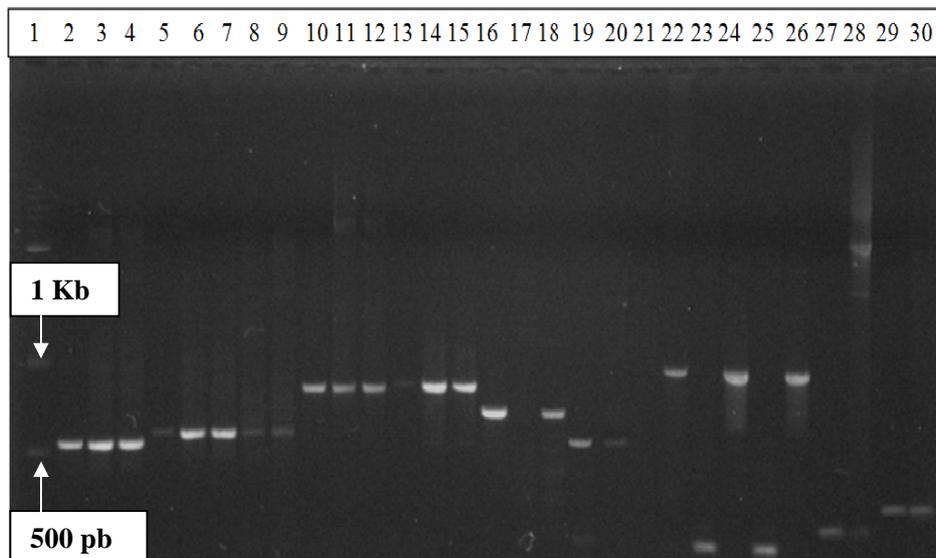


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos purificados e clonados obtidos pela PCR a partir de primers específicos dos seguintes isolados bacterianos: 1 – Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco[®]), 2 – PCR Purificada de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, 3 – PCR do miniprep de *X. campestris* pv. *campestris*, 4 - PCR do miniprep de *X. campestris* pv. *campestris*, 5 – PCR Purificada de *X. citri* subsp. *citri*, 6 – PCR do miniprep de *X. citri* subsp. *citri*, 7 – PCR do miniprep de *X. citri* subsp.

citri, 8 – PCR do miniprep de *X. citri* subsp. *citri*, 9 – PCR do miniprep de *X. citri* subsp. *citri*, 10 – PCR Purificada de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, 11 – PCR do miniprep de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, 12 – PCR do miniprep de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, 13 – PCR Purificada de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, 14 – PCR do miniprep de *P. syringae* pv. *tabaci*, 15 – PCR do miniprep de *P. syringae* pv. *tabaci*, 16 – PCR Purificada de *P. syringae* pv. *tomato*, 17 – PCR do miniprep de *P. syringae* pv. *tomato* (negativo), 18 – PCR do miniprep de *P. syringae* pv. *tomato*, 19 – PCR Purificada de *Candidatus Liberibacter americanus*, 20 – PCR do miniprep de *Ca. L. americanus*, 21 – PCR do miniprep de *Ca. L. americanus* (negativo), 22 – PCR Purificada de *Ca. L. asiaticus*, 23 – PCR do miniprep de *Ca. L. asiaticus*, 24 – PCR do miniprep de *Ca. L. asiaticus* (negativo), 25 – PCR do miniprep de *Ca. L. asiaticus* (negativo), 26 – PCR do miniprep de *Ca. L. asiaticus*, 27 – PCR Purificada de *X. campestris* pv. *viticola*, 28 – PCR do miniprep de *X. campestris* pv. *viticola*, 29 – PCR Purificada de *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*, 30 – PCR do miniprep de *C. flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*.

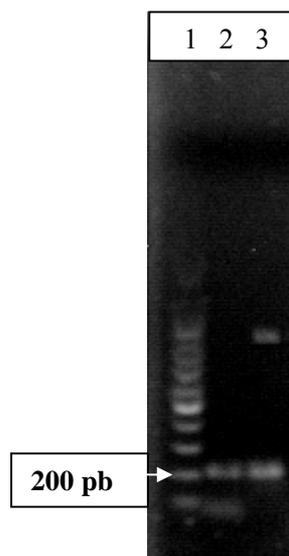


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose contendo o fragmento genômico purificado e clonado obtido na PCR com *primers* específicos para *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: 1 – Marcador 100pb DNA Ladder (Amresco[®]), 2 – PCR Purificada de *P. syringae* pv. *syringae*, 3 – PCR do miniprep de *P. syringae* pv. *syringae*.

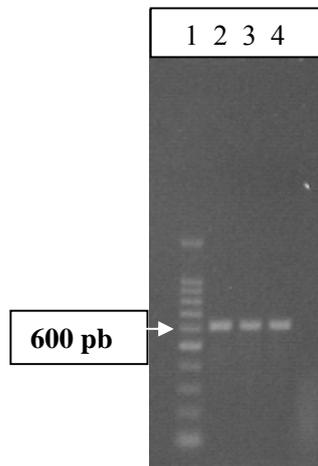


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose contendo o fragmento genômico purificado e clonado obtidos na PCR com *primers* específicos para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: 1 – Marcador 100pb DNA Ladder (Amresco[®]), 2 – PCR Purificada de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, 3 – PCR do miniprep de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, 4 – PCR do miniprep de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Quando a PCR utilizando como template de DNA o plasmídeo vetor com o fragmento clonado (miniprep) não foi suficiente para a confirmação da clonagem, como ocorreu com algumas repetições das bactérias *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter americanus* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Figura 2), foi utilizada a enzima de restrição *EcoR1* para separar o fragmento genômico clonado do plasmídeo vetor e assim averiguar a possível clonagem, entretanto, os resultados também foram negativos, confirmando a necessidade de repetição da clonagem, caso não houvesse nenhuma repetição da clonagem da espécie bacteriana em questão.

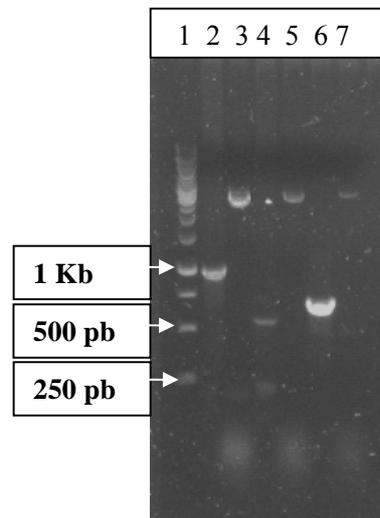


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose do corte com a enzima de restrição *EcoRI* para a confirmação da clonagem dos isolados com resultado negativo na PCR utilizando o miniprep da espécie bacteriana: 1 – Marcador 1Kb DNA Ladder (Fermentas[®]), 2 – Purificação da PCR de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, 3 – Corte do miniprep de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, 4 – Purificação da PCR de *Candidatus Liberibacter americanus*, 5 – Corte do miniprep de *Candidatus Liberibacter americanus*, 6 – Purificação da PCR de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, 7 – Corte do miniprep de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Para a validação do Banco de Controles Positivos, amostras naturalmente infectadas foram testadas, utilizando-se amostras analisadas pela Clínica Fitossanitária do DFP/UFLA, como para a fitobactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, que causa o cancro bacteriano da videira, sendo utilizadas duas amostras naturalmente infectadas que apresentavam os sintomas típicos da doença, de onde foram isoladas algumas bactérias suspeitas de serem o agente etiológico da doença. O DNA das colônias suspeitas foi extraído e utilizado na PCR empregando-se os *primers* Xcv1F e Xcv3R (TRINDADE et al., 2007) específicos para *X. campestris* pv. *viticola*, com resultado positivo para todas as colônias testadas.

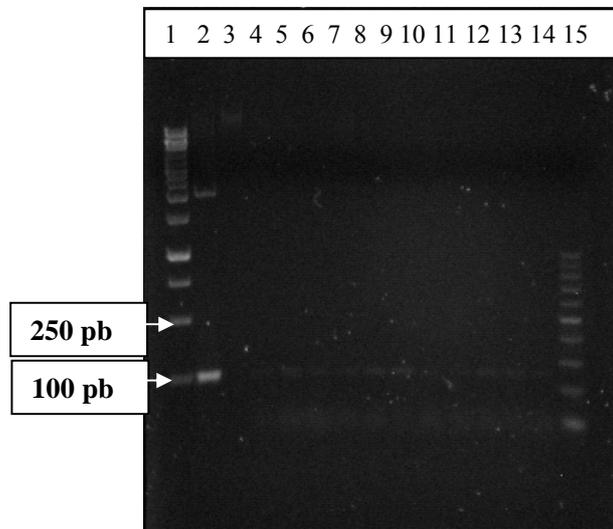


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose para a diagnose de *X. campestris* pv. *viticola*: 1 – Marcador 1Kb DNA Ladder (Fermentas[®]), 2 – Controle positivo (PCR do Miniprep *X. c. pv. viticola*), 3 – Controle positivo (videira), 4 – Amostra suspeita I, 5 – Amostra suspeita II, 6 – Amostra suspeita III, 7 – Amostra suspeita IV, 8 – Amostra suspeita V, 9 – Amostra suspeita VI, 10 – Amostra suspeita VII, 11 – Amostra suspeita VIII, 12 – Amostra suspeita IX, 13 – Amostra suspeita X, 14 – Amostra suspeita XI, 15 – Marcador 100pb DNA Ladder (Amresco[®]).

Para a diagnose do Huanglongbing em duas amostras suspeitas de serem naturalmente infectadas, mas que não apresentavam os sintomas típicos da doença, o DNA total foi extraído de acordo com o protocolo adaptado de Murray e Thompson (1980) e utilizado na PCR com os *primers* específicos para *Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*, OI2c/OI1 (JAGOUEIX; BOVÉ; GARNIER, 1996) e LSg2f/LSg2r (COLETTA FILHO et al., 2005), respectivamente. As amostras não foram diagnosticadas com as bactérias causadoras do HLB no Brasil, havendo amplificação positiva somente dos controles positivos.

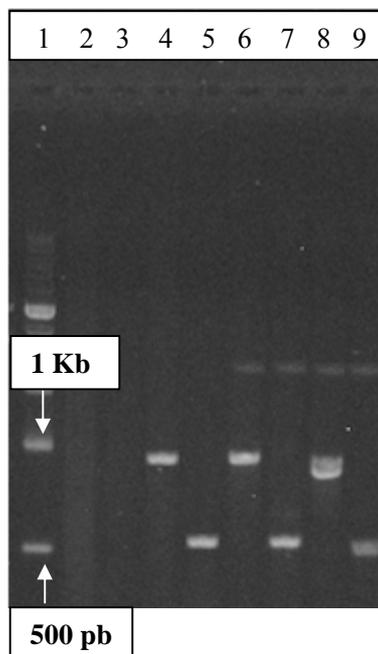


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose para a diagnose de HLB (*Ca. L. asiaticus* e *Ca. L. americanus*): 1 – Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco®), 2 – Amostra suspeita de Citros I (negativo), 3 – Amostra suspeita de Citros II (negativo), 4 – PCR purificada de *Ca. L. asiaticus*, 5 – PCR purificada de *Ca. L. americanus*, 6 – Controle positivo HLB/AS (PCR do Miniprep de *Ca. L. asiaticus*), 7 – Controle positivo HLB/AM (PCR do Miniprep de *Ca. L. americanus*), 8 – Controle positivo HLB/AS (PCR do Miniprep de *Ca. L. asiaticus*), 9 – Controle positivo HLB/AM (PCR do Miniprep de *Ca. L. americanus*).

Na diagnose do cancro cítrico foram usadas quatro amostras com sintomas típicos da doença, das quais foram isoladas colônias suspeitas de serem *X. citri* subsp. *citri*. O DNA foi extraído e utilizado-se os *primers* específicos Xac01/Xac02 (COLETTA FILHO et al., 2006) na PCR, foram obtidas amplificação positiva para todas as amostras e para o controle positivo.

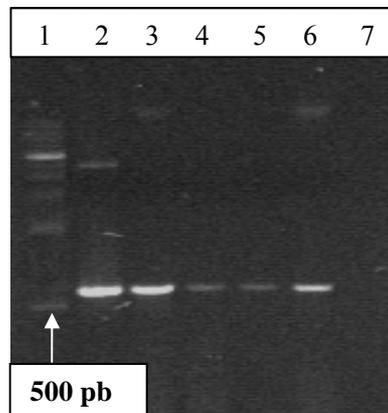


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose para a diagnose de *X. citri subsp. citri*: 1 – Marcador 1Kb DNA Ladder (Amresco®), 2 – Controle positivo (PCR do Miniprep *X. c. subsp. citri*), 3 – Amostra de Citros suspeita I, 4 – Amostra de Citros suspeita II, 5 – Amostra suspeita de Citros III, 6 – Amostra suspeita de Citros IV, 7 – Controle negativo (Água Ultrapura).

A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) tem se tornado uma importante ferramenta de diagnose na detecção de patógenos de plantas e também daqueles associados aos alimentos de consumo humano. Muitos testes têm sido validados, adaptados e comercializados para tornar a PCR uma técnica de rotina nos laboratórios de análise e pesquisa com fitopatógenos. A tecnologia atual da PCR permite a detecção rápida, sensível e específica de pragas, inclusive, em alguns casos, em tempo real. Entretanto, a PCR possui algumas limitações, principalmente associadas com os resultados falsos negativos que podem ocorrer em análises de rotina em laboratórios de diagnose (MAURER, 2011). Estes falsos negativos podem ocorrer por vários motivos, como falhas na montagem da reação ou problemas com algum dos reagentes, mas ocorrem principalmente devido a algum tipo de inibidor que pode estar presente contaminando a reação e inibindo a PCR, como por exemplo, o ácido húmico presente em abundância em amostras provenientes de solo que inibe a atividade da Taq polimerase (SUTLOVIC et al., 2008).

Uma solução para que laudos com falsos negativos não sejam emitidos por laboratórios de detecção de fitopatógenos ou ocorram em rotinas de pesquisa acadêmica é a utilização de controles positivos para assegurar uma margem maior de segurança aos testes de PCR, pois estes controles positivos fornecem o padrão necessário para a comparação entre uma reação de PCR que não ocorreu amplificação do fragmento de interesse de nenhuma amostra, inclusive do controle positivo, indicando falhas na metodologia, e de uma reação que não possua o fragmento em questão, caracterizando a ausência do patógeno na amostra. Um fator importante para a construção de um banco de controles positivos é a seleção correta dos *primers* a serem empregados na obtenção dos fragmentos genômicos específicos para cada patógeno que irá compor este material de referência, pois estes *primers* devem ser específicos e sensíveis na amplificação seletiva dos fragmentos de interesse, além de serem desenhados principalmente com base em sequências de genes conhecidos, conservados e específicos para cada espécie do patógeno, para que as sequências de nucleotídeos dos *primers* não permitam anelamentos inespecíficos com DNAs provenientes de outras espécies.

Vários autores tem se utilizado de *primers* específicos para a PCR na detecção de fitopatógenos, como para a murcha bacteriana e a queima das folhas causada pela bactéria *Pantoea stewartii*, que é uma importante doença que causa grandes perdas nas culturas do Milho e do Milho doce. Esta bactéria pode ser transmitida por sementes, por isso está sujeita às restrições quarentenárias de vários países onde a bactéria ainda não foi diagnosticada, como no Brasil. Coplin et al. (2002), com o objetivo de desenvolver uma metodologia para a identificação deste patógeno em amostras advindas do campo e para testes de sanidade de sementes, desenhou 4 pares de *primers* baseados nas sequências de nucleotídeos dos genes *hrpS*, *cpsD*, *cpsE* e na região ITS (*Intergenic Transcribed Spacer*) do 16S rRNA. O gene *hrpS* está relacionado com a formação do pilus

bacteriano das bactérias F+ (bactérias portadoras do plasmídeo de fertilidade F que permite a união do citoplasma entre duas bactérias via pilus para a troca de material genético na conjugação bacteriana) juntamente com o gene *hrpH*, e também está envolvido com a regulação do gene e secreção de proteínas do Sistema Secretório Bacteriano Tipo III (ROINE et al., 1997). Já os genes *cpsD* e *cpsE* estão envolvidos na síntese da glicosiltransferase para a biosíntese da cápsula bacteriana (COPLIN et al., 1996). A região cromossômica ITS da região 16S do rRNA é bastante conservada entre as bactérias relacionadas e necessita de alinhamento minucioso e comparação da sequência de nucleotídeos destas espécies ao se utilizar esta região para o desenho de um par de *primers* específicos (KIM et al., 1999). Os autores constataram que o melhor par de *primers* para a detecção de *P. stewartii* foi aquele baseado na região dos genes *cpsD* e *cpsE* denominados de CPSL1 e CPSR2c, principalmente pelo fato de que estes *primers* não anelam com o DNA extraído de colônias bacterianas não-mucóides de *P. stewartii*, que se caracterizam por serem avirulentas, indicando o papel do exopolissacarídeo (EPS) da cápsula destas bactérias na sua virulência.

Este método de detecção de *P. stewartii* vem corroborar com as medidas de contenção de pragas quarentenárias dos países onde a bactéria ainda não foi detectada, pois a detecção visual deste patógeno pode ser confundida com sintomas causados por outras bactérias em plantas de milho, como *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananas* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*. Ainda, este protocolo de detecção por PCR pode certificar sementes sadias para o plantio de novas culturas, pois foi capaz de detectar baixas concentrações da bactéria, na confirmação da diagnose em campo ou em clínicas fitossanitárias, como em estudos epidemiológicos envolvendo tanto sementes quanto insetos vetores (COPLIN et al., 2002).

Para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente etiológico do cancro bacteriano da videira, Trindade et al. (2007) desenharam

um par de *primers* baseado na região cromossômica do gene *hrpB*, que está relacionado à produção de Helicase dependente de ATP, um regulador de patogenicidade, pois esta enzima atua como reguladora da expressão de todo o *cluster* do gene *Hrp*, relacionados à patogenicidade e indução de HR (*hypersensitive response*) em plantas não compatíveis com o patógeno (MUKAIHARA; TAMURA, 2009). A especificidade do *primer* foi garantida com o teste em DNA extraído de outros 6 gêneros de bactérias fitopatogênicas e 20 outras espécies de bactérias epifíticas de folhas de videira, não havendo amplificação inespecífica da microflora da videira, nem do DNA do hospedeiro.

Entretanto, estes *primers* para a detecção de *X. c. pv. viticola*, denominados de Xcv1F e Xcv3R também anelaram com o DNA extraído de isolados de *X. campestris pv. mangiferaeindicae* e *X. axonopodis pv. passiflorae*, que atacam manga (*Mangifera indica*) e maracujá (*Passiflora* sp.) respectivamente. Ainda que estes *primers* possam vir a serem considerados semi-específicos, estas espécies bacterianas podem ser diferenciadas pelo hospedeiro que infectam, pois dificilmente estas outras duas espécies seriam encontradas infectando plantas de videira em condições de campo, além de que um segundo passo no protocolo de diagnose pode ser facilmente adotado caso seja necessário a confirmação precisa da espécie bacteriana caso permaneça alguma dúvida, a digestão dos produtos da PCR pela enzima de restrição *HaeIII*, que irá fornecer um padrão de bandas altamente discriminatório entre os 3 patovares baseado em seu polimorfismo genômico.

A sensibilidade deste par de *primers* foi determinada na detecção de 10 pg (10^{-12} g) de DNA purificado. Este nível de sensibilidade é altamente importante na detecção direta do tecido vegetal, na detecção através de infecções latentes ou em sementes, onde se encontram baixas populações do patógeno (menor que 10^5 UFC/mL). Esta sensibilidade pode ser incrementada através da utilização da BIO-PCR, consistindo na obtenção de colônias bacterianas

suspeitas através do isolamento da bactéria de lesões e sementes de lotes suspeitos, para então serem utilizadas na PCR.

Já na detecção de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico, não houve ampliações inespecíficas com bactérias altamente relacionadas, como *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*, ambas espécies bacterianas que também causam bacteriose em citros, a canrose “B” e “C”; e mancha-bacteriana, respectivamente. Os *primers* desenhados para esta detecção por Coletta Filho et al. (2006) foram baseados na sequência de nucleotídeos do cluster do gene *rpf* (“*Regulation of Pathogenicity Factors*”). Este cluster é formado por pelo menos 8 genes (*rpfA* – *rpfH*) envolvidos na síntese de polissacarídeos e de enzimas extracelulares, relacionadas a virulência do patógeno (JEONG et al., 2008).

Dentro do cluster do gene *rpf* de *X. citri* subsp. *citri* existe uma região única ainda não descrita em outras espécies do gênero *Xanthomonas*. Esta região, denominada de *wapA*, que codifica para uma proteína da parede celular, se localiza entre os genes *rpfB* e *recJ*, e foi utilizada para o desenho dos *primers* Xac01 e Xac02, que se mostraram altamente específicos, inclusive na amplificação do genoma das estirpes do patógeno, A^w (Flórida) e A* (sudoeste da Ásia), de suspensões bacterianas obtidas das lesões e em folhas assintomáticas adjacentes às lesões. Já em outras espécies do gênero *Xanthomonas* e em bactérias epifíticas não-caracterizadas isoladas de lesões do cancro não houve amplificação de produtos genômicos. Os *primers* são eficazes na detecção de no mínimo 100 células bacterianas em suspensão, inclusive daquelas que se encontram em fase epifítica na superfície das folhas, garantindo um protocolo seguro para a detecção desta bactéria e que pode ser utilizado em rotina de diagnose e em estudos epidemiológicos e de manejo do cancro cítrico.

Devido ao fato de que a região *wapA* estar localizada entre dois genes do cluster *rpf* e estar presente somente em isolados de *X. citri* subsp. *citri* e

inclusive em seus variantes, há com isso indícios de que esta região seja um transposon (ou elementos transponíveis de DNA, que se deslocam no genoma bacteriano, inativando genes ou conferindo-lhes uma nova função adaptativa) que tenha se inserido recentemente no genoma desta bactéria, dando uma significância evolucionária na utilização deste *primer* (COLETTA FILHO et al., 2006).

Uma das mais importantes e destrutíveis doenças dos Citros, o *Huanglongbing*, foi diagnosticada recentemente no Brasil, e com essa constatação de uma doença até então quarentenária ocorrendo em território nacional, descobriu-se uma nova estirpe do patógeno que ocorre apenas no Brasil (COLETTA FILHO et al., 2005). Quando em 2004 esta nova doença foi detectada ocorrendo em pomares da cidade de Araraquara, Estado de São Paulo, foi diagnosticada que o agente etiológico da doença era a estirpe asiática de *Candidatus Liberibacter*, pertencente ao grupo filogenético LSg1 (*Liberibacter Sequence group 1*), ao qual estão reunidos todos os isolados que ocorrem em alguns países da Ásia. Após a descoberta deste novo patógeno ocorrendo nos pomares do Brasil, foi detectada uma nova estirpe associada aos sintomas de Huanglongbing (HLB), mas que não se caracterizava como pertencente aos grupos filogenéticos das estirpes asiática e africana (TEIXEIRA; AYRES, 2005).

Com a análise da sequência da região cromossômica 16S rRNA constatou-se de que se tratava de um novo grupo filogenético associado ao HLB, que foi denominado de LSg2 (*Liberibacter Sequence group 2*), o qual possui algumas mutações em sua sequência genômica que o diferencia das demais estirpes. Essas mutações na sequência da região 16S do RNA ribossomal foram utilizadas no desenho de *primers* específicos para a estirpe brasileira, denominados de LSg2f e LSg2r. Ainda que esta região do RNA ribossomal seja altamente conservada entre as bactérias, existem regiões de genes com variações

específicas que permitem o desenho de *primers* para a diferenciação de espécies e até mesmo de variantes/estirpes dentro de uma espécie (JAGOUÉIX; BOVÉ; GARNIER, 1996).

A detecção via PCR é fundamental quando se trata do Huanglongbing dos citros, pois as fitobactérias causadoras da doença são restritas ao floema das plantas e são fastidiosas, ou seja, não são cultiváveis em meios de cultura de rotina, o que dificulta a utilização de outros testes de diagnose, como os sorológicos. Além disso, os sintomas causados pelas três estirpes são muitos semelhantes, não havendo determinação visual da ocorrência de cada estirpe. Com a utilização destes *primers* foi observado que a estirpe brasileira, denominada de *Candidatus Liberibacter americanus*, estava amplamente distribuída pelos pomares de São Paulo e em maior porcentagem de que *Candidatus Liberibacter asiaticus* (superior em 98%), além de que as duas estirpes podem ocorrer juntamente causando a doença, caracterizando uma infecção mista em uma única planta (COLETTA FILHO et al., 2005).

Primers específicos para a detecção das estirpes asiática e africana do HLB foram descritos por Jagoueix, Bové e Garnier (1996), também baseados na região cromossômica do 16S rRNA, sendo a diferenciação entre as duas estirpes é realizada com a digestão dos produtos da PCR pela enzima de restrição *Xba*I, que fornece bandas discriminatórias suficientes para esta diferenciação. Estes *primers*, OI1 e OI2c foram utilizados na detecção primária da estirpe asiática no Brasil em 2004 (COLETTA FILHO et al., 2004) e em trabalhos epidemiológicos posteriores (TEIXEIRA, 2005; TEIXEIRA et al., 2005a, 2005b). São também utilizados juntamente com os *primers* LSg2f/LSg2r, para a estirpe americana, em uma PCR Multiplex para a diagnose do HLB em pomares no Brasil, não sendo necessário o segundo passo da digestão dos amplicons com a enzima de restrição *Xba*I para a diferenciação das estirpes asiática e africana, visto que *Candidatus Liberibacter africanus* é um patógeno quarentenário A1 no Brasil, ou

seja, ainda não foi detectado em nenhuma região produtora de citros no território nacional.

Como no Brasil ocorrem duas diferentes estirpes de “*Ca. Liberibacter*” causando danos severos e idênticos aos de HLB em plantas de citros e devido à rápida distribuição da bactéria pelos pomares de São Paulo, Minas Gerais e Paraná e à situação epidêmica do seu vetor, um programa de erradicação para o Huanglongbing dos citros deve ser implementado urgentemente para evitar a maior dispersão da doença, sendo os protocolos de diagnose precisos, sensíveis e rápidos, como a detecção das estirpes bacterianas causadoras do HLB por *primers* específicos na PCR, são essenciais para tal finalidade.

Com o objetivo de impedir uma maior dispersão de uma bacteriose que já ocorre nas regiões produtoras do Brasil através de uma diagnose precisa, Audy et al. (1994) desenharam *primers* específicos para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, bactéria causadora do crestamento comum do feijoeiro, doença que causa grandes perdas na cultura todos os anos. Os *primers* foram obtidos com base no sequenciamento parcial de um dos fragmentos obtidos por digestão via enzimas de restrição de um plasmídeo de *X. a.* pv. *phaseoli*, o plasmídeo p7, que possui função relacionada a replicação do DNA genômico e plasmidial da bactéria (YOUNGREN et al., 2000). Estes *primers* se mostraram altamente específicos, detectando inclusive seu variante *X. a.* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, e não produzindo anelamento inespecíficos com bactérias causadoras de outras doenças em feijão, como *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (crestamento aureolado do feijoeiro), em outras espécies do gênero de *Xanthomonas* ou em outros gênero fitopatogênicos.

Este par de *primers*, X4c e X4e, é eficaz na detecção direta do patógeno em folhas sintomáticas com baixas concentrações da bactéria (no mínimo 100 fentogramas – 10^{-15} g) e possui a característica de poder ser utilizado com uma temperatura de anelamento (união do primer à fita de DNA) próxima a

temperatura de extensão (polimerização do produto da PCR), isto é, 72°C, o que diminui consideravelmente o tempo de diagnose devido a redução do tempo da PCR no termociclador e aumenta consideravelmente a sensibilidade do *primer*, com detecções em até 10 fentogramas de concentração bacteriana, entretanto para se utilizar esta temperatura de anelamento, são necessários dois ciclos de PCR de 20 e 35 ciclos respectivamente, mas o que ainda assim garante a redução do tempo de detecção em 1 hora (AUDY et al., 1994).

O *cluster* do gene *hrp* (*Hypersensitive Response and Pathogenicity*) é considerado uma sequência genômica específica já caracterizada nas bactérias fitopatogênicas e apropriado para seleção de *primers* utilizados na detecção de bactérias. São amplamente conservados em patogenicidade, parecem ser universais entre bactérias patogênicas e controlam uma variedade de interações entre a bactéria e a planta, além de produzirem sintomas em hospedeiros suscetíveis e reação de hipersensibilidade (HR) em hospedeiros resistentes ou não hospedeiros (ALFANO; COLLMER, 1997).

Baseado nisso, para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente etiológico da podridão negra das crucíferas, Park et al. (2004) descreveram o par de *primers* XCF e XCR obtidos na sequência genômica do gene *hrpF* da bactéria. Este gene está relacionado com produção de uma proteína envolvida na translocação de outras proteínas no Sistema Secretório Tipo III de *X. c.* pv. *campestris* e com sua patogenicidade, pois também atua desativando um mensageiro secundário na resposta de defesa das plantas, a adenilato ciclase, envolvida na cascata de fosforilação na transdução de sinal da membrana da planta para seu núcleo durante a ativação dos genes de defesa (BÜTTNER et al., 2002). O par de *primers* foi eficiente na amplificação de fragmentos específicos apenas de *X. c.* pv. *campestris*, tanto em amostras de DNA purificadas quanto em plantas naturalmente infectadas e em baixas concentrações (1.3×10^4 UFC/mL), não anelando com o DNA de outras espécies

de *Xanthomonas* relacionadas, confirmando sua utilidade em protocolos de detecção por PCR.

Outra metodologia para a escolha de regiões do genoma bacteriano para o desenho de *primers* específicos para fitobactérias é a utilização das chamadas ‘sequências anônimas’, que são seqüências de DNA desconhecidas, geralmente, um único fragmento de DNA da espécie em estudo é determinado, em seguida a seqüência de DNA deste fragmento pode ser identificada, sequenciada e utilizada no desenvolvimento de *primers* (LOUWS et al., 1999). A seqüência anônima é assim nomeada, pelo fato de inicialmente a região escolhida não ser conhecida e somente após o sequenciamento do fragmento tornar-se possível o reconhecimento do gene. A principal fonte de DNAs anônimos são os fragmentos de rep-PCR clonados (LELIS, 2009; TEGLI; SERENI; SURICO, 2002).

Com a utilização de uma seqüência anônima, Tegli, Sereni e Surico (2002) desenharam *primers* específicos para a detecção de *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens* em amostras naturalmente infectadas e sementes, requisito fundamental para o monitoramento desta praga quarentenária para alguns países da Europa (OEPP, 2003). O par de *primers* foi baseado na seqüência de um fragmento genômico amplificado na ERIC-PCR (VERSALOVIC et al., 1994), que foi clonado e sequenciado, gerando assim uma seqüência de nucleotídeos para o desenho dos *primers* CffFOR2 e CffREV4. Estes oligonucleotídeos se mostraram altamente específicos para os isolados de *C. f.* pv. *flaccumfasciens*, não havendo anelamento inespecífico com outras fitobactérias, nem aquelas altamente relacionadas como *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *betae*, *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *oortii* ou *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *poinsettiae*, patógenos de beterraba (*Beta vulgaris* L.), tulipa negra (*Tulipa gesneriana* L.) e poinsetia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch) respectivamente. Foram sensíveis em

concentrações de DNA inferiores a 5 picogramas e capazes de diferenciar os patovares de *Curtobacterium flaccumfasciens*, até então diferenciados somente pelo hospedeiro (TEGLI; SERENI; SURICO, 2002).

Entre as bactérias fitopatogênicas, existe outro complexo de patovares que necessitam de diferenciação específica para subsidiar as metodologias de detecção, estudos epidemiológicos e práticas de manejo, as *Pseudomonas syringae*. Elas são diferenciadas inicialmente pela preferência de hospedeiro e também pela produção de fitotoxinas específicas. Esta produção de fitotoxinas indutoras de clorose, como siringomicina, tabtoxina, coronatina, faseolotoxina e tagetitoxina é limitada para certos patovares de *P. syringae*. Entretanto existe uma sobreposição de gama de hospedeiro de *P. syringae* que produzem estas fitotoxinas e as zonas cloróticas induzidas por estas toxinas que rodeiam as lesões necróticas causadas pela bacteriose são similares, havendo assim a necessidade de desenvolver uma metodologia mais específica e rápida para a detecção e diferenciação dentre os diferentes patovares de *P. syringae* (LYDON; PATTERSON, 2001).

Com esse objetivo, Lydon e Patterson (2001) desenvolveram uma metodologia de PCR para a detecção de *P. syringae* pv. *tabaci* baseado na produção de tabtoxina por esta bactéria. *Primers* específicos foram desenhados baseados nas regiões dos genes *tbla* e *tabA*, responsáveis pela produção desta toxina. Dentre os dois pares de *primers* testados, os *primers* obtidos do gene *tblA*, *tbla1* e *tbla2*, foram mais específicos em amplificar somente os isolados produtores de tabtoxina em *P. syringae* pv. *tabaci*, não anelando com nenhum isolado incapaz de produzir a tabtoxina, sendo este um indicativo da capacidade do *primer* em detectar a patogenicidade do isolado concomitantemente. Além disso, o *primer* foi específico somente para o patovar *tabaci*, não havendo ampliações inespecíficas com os outros patovares do complexo *Pseudomonas syringae* produtores de tabtoxina, como *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e

Pseudomonas syringae pv. *coronafaciens*, agentes etiológicos da mancha aureolada do cafeeiro (*Coffea arábica* L.) e crestamento aureolado da aveia (*Avena sativa* L.) respectivamente.

Também objetivando a detecção de um patovar do complexo *Pseudomonas syringae*, Cuppels (2006) utilizou *primers* para a detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, que causa a pinta bacteriana em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), além de fornecer uma metodologia precisa para a diferenciação de outro complexo de patógenos que causam a mancha bacteriana no tomateiro, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas gardneri*, sendo os sintomas destas duas importantes doenças facilmente confundidos nos campos de produção. Os *primers* para a detecção de *P. syringae* pv. *tomato* foram desenhados a partir de sequências obtidas do cluster do gene *COR1*, responsável pela produção da fitotoxina coronatina, mais especificamente do gene *cfa7* relacionado a biosíntese do ácido coronafácico, que é um dos componentes da coronatina, juntamente com o ácido coronâmico (ISHIGA et al., 2010). Os *primers* COR1 e COR2 foram eficazes na amplificação seletiva de todos os isolados de *P. syringae* pv. *tomato* produtores de coronatina, ou seja, aqueles que eram patogênicos. Entretanto, outros patovares produtores de coronatina também foram detectados por este par de *primers*, como *P. syringae* pv. *maculicola* (podridão bacteriana das brássicas), *P. syringae* pv. *morsprunorum* (cancro bacteriano da ameixeira e cerejeira), *P. syringae* pv. *atropurpurea* (macha bacteriana do azevém italiano) e *P. syringae* pv. *glycinea* (crestamento bacteriano da soja), com isso, a identificação correta do patovar *tomato* é inicialmente baseada nos sintomas do hospedeiro com posterior confirmação pelo emprego dos *primers* específicos na PCR. Como a detecção de *P. syringae* pv. *tomato* foi possível com concentrações bacterianas próximas a 50 UFC/mL, e não houve nenhum tipo de beneficiamento do material vegetal

testado, apenas extração do DNA total, nem utilização de métodos de Nested PCR, este protocolo permite a detecção da bactéria nas mudas antes destas irem para o campo, reduzindo os danos na cultura do tomate devido a detecção precoce do patógeno.

O objetivo de se diferenciar a pinta bacteriana da mancha bacteriana do tomateiro foi cumprido através do desenho de *primers* específicos baseados no gene *hrpB* de *X. a. pv. vesicatoria*, para as espécies de *Xanthomonas* relacionadas com a mancha bacteriana, onde houve apenas amplificação específica do genoma destas espécies bacterianas, sendo possível utilizar os dois pares de *primers* específicos para *P. syringae* pv. *tomato* e para as espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana em uma única reação de PCR, quando os sintomas na planta não permitem a distinção inicial entre as duas doenças, pois não houve amplificação genômica cruzada entre as espécies (CUPPELS, 2006).

Rommel, Valdebenito-Sanhueza e Duarte (2010) observaram uma doença, morte das flores, ocorrendo em pereiras européias (*Pyrus communis* L.) na cidade de Vacaria, RS. Devido à ausência de registro da etiologia dessa doença no Brasil, ao registro de *P. syringae* pv. *syringae* e *Erwinia amylovora* associadas a sintomas similares em outros países e à possível presença deste tipo de bactérias em gemas, um método para detecção dessas três bactérias foi desenvolvido envolvendo a extração do DNA total de gemas florais sintomáticas seguido de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada uma das bactérias, sendo os *primers* utilizados para a detecção de *P. syringae* pv. *syringae* denominados de SyrB1 e SyrB2, baseados na sequência do gene *SyrB1*, cujo produto está envolvido na síntese da fitotoxina siringomicina, que atua na membrana celular das células vegetais, alterando a sua fluidez, aumentando a respiração e produção de ATP, acarretando na perda de eletrólitos que irão nutrir a célula bacteriana. Posteriormente causa ruptura da membrana plasmática, lise

das membranas celulares adjacentes e necrose nas folhas (SCHROEDER et al., 2001; WANG et al., 2006).

O crestamento bacteriano de pereiras européias, que ainda não ocorre no Brasil, é considerado uma das principais patologias da pereira. Os sintomas dessa doença são associados à *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. A queima bacteriana associada à *Erwinia amylovora* apresenta um quadro sintomatológico bastante distinto, no entanto, pode ser confundida, no início, com o crestamento bacteriano em pereiras européias devido à necrose do receptáculo floral e o crestamento de flores. Como *E. amylovora* é considerada praga quarentenária A1, merece especial atenção ante a possibilidade de ser confundida com outra bactéria já presente no país. A semelhança de sintomas entre o crestamento bacteriano associado a *P. syringae* pv. *syringae* e a morte de flores nos pomares de pereira européia de Vacaria não é evidência suficiente para se concluir sobre a etiologia da doença, pois ainda não há registros no país da associação deste patógeno com pereiras. Além disso, existe a possibilidade de confusão de alguns sintomas com os associados a uma praga quarentenária. Portanto, se faz necessário um completo estudo etiológico e epidemiológico da doença observada (ROMMEL; VALDEBENITO-SANHUEZA; DUARTE, 2010).

Como parte desse estudo, Rommel, Valdebenito-Sanhueza e Duarte (2010) verificaram por meio de testes bioquímicos, fisiológicos, PCR e sequenciamento que dois isolados obtidos a partir de flores com sintomas e que reproduziram os mesmos sintomas em flores de ramos destacados podendo ser reisolados, foram identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, mas não puderam ser conclusivamente enquadrados nas espécies patogênicas descritas por Schaad, Jones e Chun (2001). Em função do curto período de floração, duas a três semanas na primavera, existem dificuldades práticas para estudos mais aprofundados sobre a morte de flores de pereira européia. Entretanto, existe o indicativo de que o inóculo do crestamento na flor já pode

estar presente na gema dormente, pois os sintomas de crestamento bacteriano em flores são semelhantes aos observados em gemas florais dormentes, em caso de alta severidade de crestamento associado a *P. syringae* pv. *syringae*. Da mesma forma, *E. amylovora* também é encontrada em gemas de pereiras.

Nas amostras provenientes de Vacaria, RS, *E. amylovora* não foi detectada, confirmando que ainda permanece sendo uma praga quarentenária ausente no Brasil. A frequência média de *P. syringae* pv. *syringae* e *Pseudomonas* sp. foi de 0,7 e 16,3%, respectivamente, com picos 30% em outubro para *Pseudomonas* sp.. A espécie do agente causal não foi elucidada, mas foi demonstrada a associação com o gênero *Pseudomonas*, o que já fornece subsídios para o desenvolvimento de métodos de controle da doença. *P. syringae* pv. *syringae* não foi considerada como o agente patogênico da morte das flores de pereiras européias pois não houve uma associação constante do patógeno com hospedeiro, sendo este o primeiro passo nos postulados de Koch para se descrever uma nova doença. Os *primers* utilizados para a detecção de *P. syringae* pv. *syringae* se mostraram bastante específicos (não ocorreram anelamentos inespecíficos com bactérias relacionadas ou de outros gêneros fitopatogênicos e epifíticos) e sensíveis (detectando a bactéria no limiar de 10^3 UFC mL⁻¹), subsidiando assim as metodologias de diagnose em outras espécies vegetais hospedeiras da bactéria e seu monitoramento epidemiológico nos casos de novas doenças (ROMMEL; VALDEBENITO-SANHUEZA; DUARTE, 2010).

Em relação à *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Dreier, Bermpohl e Eichenlaub (1995) se propuseram a desenvolver uma metodologia para a diferenciação deste patógeno, causador da murcha e cancro bacteriano de tomateiro, das outras quatro subespécies que ocorrem em milho (subsp. *nebraskensis*), batata (subsp. *sepedonicus*), alfafa e trevo-amarelo (subsp. *insidiosus*) e trigo (subsp. *tesselarius*). Para tal, utilizou a metodologia de

hibridização de *Southern* com sondas de DNA derivadas dos genes de origem do plasmídeo, do gene *CelA*, que codifica para as endocelulases, e do gene *Pat-1*, relacionado com a patogenicidade destas subespécies, com a capacidade causar murcha em tomate e estão localizados no plasmídeo pCM2 da bactéria (KLEITMAN et al., 2008).

As sondas obtidas da sequência do gene *Pat-1* permitiram a diferenciação de *C. m. subsp. michiganensis* das outras quatro subespécies, além de distinguir os isolados virulentos dos avirulentos. Por isso, foram desenhados *primers* específicos baseados na sequência do gene *Pat-1* para serem utilizados na PCR na detecção de *C. m. subsp. michiganensis*. Estes *primers*, CMM-5 e CMM-6, foram capazes de detectar os isolados virulentos em amostras de plantas sintomáticas, em sementes naturalmente infectadas e em amostras de plantas assintomáticas que continham uma concentração de 2×10^2 bactérias por milímetro. Como a principal forma de transmissão desta bacteriose é por sementes infectadas, a diagnose por PCR é uma ferramenta fundamental na detecção da bactéria antes que as sementes sejam utilizadas para novas plantações, obtendo assim maior eficácia no controle desta doença.

Utilizando também os *primers* CMM-5/CMM-6, Ozdemir (2009) desenvolveu uma técnica de PCR Multiplex para a detecção simultânea de três bactérias fitopatogênicas de tomate transmitidas por semente, *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, e *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, com *primers* específicos para previamente descritos para as duas últimas bactérias também sendo utilizados. A PCR Multiplex permite a detecção simultânea de vários patógenos em um único ciclo de PCR, pois cada par de *primers* utilizado é desenhado para produzir um amplicon com um tamanho definido para cada patógeno o qual se tenha interesse em detectar, garantindo assim mais rapidez nas análises onde são requeridos testes para mais de uma espécie, subespécie ou variante de patógeno

(MAURER, 2011). Esta metodologia proposta por Ozdemir (2009) foi altamente sensível na amplificação específica dos patógenos em um único tubo de reação, havendo a detecção com concentrações de 3 UFC mL⁻¹. Porém, este protocolo de detecção não foi testado em sementes naturalmente infectadas, amostras sintomáticas ou assintomáticas, somente em culturas puras das bactérias, não fornecendo assim dados sobre as reais condições em que se deveria ocorrer a detecção destes patógenos, mas ainda assim fornece informações sobre as bases de uma PCR Multiplex para esses patossistemas, o que, com a adaptação do protocolo para as condições de campo, garantiria uma metodologia rápida, eficaz e ampla para a diagnose de importantes bacterioses associadas a sementes.

7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A manutenção de um Banco de Controles Positivos de plasmídeos clonados com fragmentos genômicos de interesse de bactérias fitopatogênicas e utilização do controle positivo nas análises de detecção destas fitobactérias permite uma maior confiabilidade nos testes de diagnose utilizando a técnica da PCR por evitar que falhas na execução durante a montagem da reação da PCR induzam na emissão de laudos com falsos negativos para o patógeno.

Outra importante consideração acerca dos controles positivos obtidos de fragmentos genômicos específicos clonados, é a possibilidade de realizar testes diagnósticos moleculares para pragas quarentenárias sem a necessidade de manutenção de culturas viáveis da mesma para que possam servir de controle positivo, prática esta que representa grande risco de introdução de uma doença quarentenária em território nacional, pois uma única célula bacteriana em condições favoráveis pode se multiplicar, e, com o tempo, causar epidemias nas áreas de produção, acarretando grandes perdas para o setor de agricultura nacional, pois muitas são as pragas que já ocorrem no país, portanto, impedir que aquelas que ainda não estão presentes no país não sejam introduzidas é uma importante prática para a manutenção da sanidade dos campos de produção, que estão sob constante vigilância dos órgãos públicos protetores da agricultura nacional em relação às pragas quarentenárias, como o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e a SDV (Secretaria de Defesa Vegetal).

Parte do sucesso da técnica da PCR, e conseqüentemente da utilização de controles positivos para certifi-cá-la, está baseada na seleção correta dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers* de DNA) para garantir a especificidade e sensibilidade na detecção da bactéria.

Para que as análises de diagnose baseadas na metodologia da PCR executadas em clínicas fitossanitárias do país possam ser realizadas com um

nível mínimo de erros, vários são os aspectos envolvidos, como estado da amostra enviada para a clínica, eliminação de todos os inibidores da PCR durante o processo de isolamento e extração do DNA bacteriano, qualidade e pureza do DNA extraído, precisão do técnico laboratorista na execução das etapas da PCR, escolha correta dos ciclos da PCR, visualização e interpretação precisa do resultado da PCR na corrida eletroforética em gel de agarose e utilização de um controle positivo na PCR para garantir que todas as etapas citadas anteriormente não sofreram falhas.

8 – CONCLUSÃO

A utilização de um Banco de Controle Positivos formado a partir da clonagem de fragmentos genômicos de interesse amplificados com o emprego de *primers* específicos para as fitobactérias utilizadas neste trabalho na metodologia da PCR é eficiente na validação da técnica da PCR para a detecção de bactérias fitopatogênicas e compõe uma alternativa segura para substituir a utilização de células bacterianas viáveis de pragas quarentenárias como controles positivos na certificação de origem de materiais de propagação vegetal ou na diagnose de bacterioses, subsidiando as práticas de exclusão e contenção para a não introdução de pragas quarentenárias no território nacional.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M. H.; BASHANDY, S. R.; SCHENELL, S. Occurrence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, the causal agent of common bacterial blight disease, on seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Upper Egypt. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 55, n. 1, p. 47-52, Jan. 2010.
- AIRES, A. et al. Correlations between disease severity, glucosinolate profiles and total phenolics and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* inoculation of different Brassicaceae. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 129, n. 3, p. 503-510, June 2011.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. The type III (*Hrp*) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, avr proteins, and death. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 18, p. 5655-5662, 1997.
- AMARAL, A. M. et al. Reaction of genotypes of citrus species and varieties to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under greenhouse conditions. **Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 92, n. 2, p. 519-524, Feb. 2010.
- ANZAI, E. K. **Caracterização e desenvolvimento de sistemas de referências alélicas de loci de STR para controle de qualidade em identificação humana**. 2007. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- AUDY, P. et al. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. C.* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 10, p. 867-878, Oct. 1994.
- AUSUBEL, F. M. R. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: Greene, 1995. v. 1.
- _____. **Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology**. 2nd ed. New York: Greene, 1992. v. 1.
- BACH, H. J. et al. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 85-91, Jan. 2003.

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

BEHLAU, F.; NUNES, L. M.; LEITE JÚNIOR, L. P. Meio de cultura semi-seletivo para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo e sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 394-396, 2006.

BENELLI, A. I. H. et al. Reação de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 155-159, mar./abr. 2004.

BOCK, C. H. et al. Infection and decontamination of citrus canker-inoculated leaf surfaces. **Crop Protection**, Guildford, v. 30, n. 3, p. 259-264, Mar. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 40**, de 24 de novembro de 2006. Estabelece critérios da ARP para estabelecimentos de PNQR. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://www.slideshare.net/MinAgriculturaBrasil/manual-de-legislao>>. Acesso em: 10 mar. 2011.

_____. **Instrução Normativa Nº 52**, de 20 de novembro de 2007. Estabelece a lista de pragas quarentenárias ausentes (A1) e de pragas quarentenárias presentes (A2) para o Brasil e aprovar os procedimentos para as suas atualizações. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18212>>. Acesso em: 10 mar. 2011.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. CQB n. 0145/01, de 29 de agosto de 2001. Refere-se à solicitação de extensão do certificado de qualidade em biossegurança. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 211, 30 out. 2002. Seção 3, p. 4.

BRISCO, P. et al. Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification system: the next generation in miniprep purification. **Promega Notes Magazine**, London, n. 59, p. 10, 1996.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 376 p.

BUTTNER, D. et al. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 9, p. 2389-2398, May 2002.

CARIGNATTO, C. R. R. et al. New culture medium to xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 51, n. 3, p. 283-288, July/Sept. 2011.

CLARK, D. P. **Molecular biology**: understanding the genetic revolution. San Diego: Elsevier, 2005. 816 p.

COLETTA FILHO, H. D. et al. Analysis of 16S rDNA Sequences from Citrus Huanglongbing bacteria reveal a different “*Ca. Liberibacter*” strain associated with citrus disease in São Paulo. **Plant Disease**, Quebec, v. 89, n. 8, p. 848-852, Aug. 2005.

_____. First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, Quebec, v. 88, n. 12, p. 1382-1388, Dec. 2004.

_____. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 2, p. 279-285, Feb. 2006.

COLETTA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A. Hospedeiros, transmissão e técnicas de diagnóstico da bactéria *Xylella fastidiosa*. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, n. 1, p. 121-132, 2001.

COPLIN, D. L. et al. Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. **Plant Disease**, Quebec, v. 86, n. 3, p. 304-311, Mar. 2002.

_____. Nucleotide sequence analysis of the *Erwinia stewartii cps* gene cluster for synthesis of stewartan and comparison to the *Erwinia amylovora ams* cluster for synthesis of amylovoran. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 411, n. 1, p. 251-257, Apr. 1996.

CUPPELS, D. A. Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. **Plant Disease**, Quebec, v. 90, n. 4, p. 451-458, Apr. 2006.

DARASSE, A. et al. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, n. 2, p. 203-215, Oct. 2007.

DONMEZ, M. F.; KARLIDAG, H.; ESITKEN, A. Identification of resistance to bacterial canker (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) disease on apricot genotypes grown in Turkey. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, n. 2, p. 241-247, Oct. 2010.

DREIER, J.; BERMPOHL, A.; EICHENLAUB, R. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 4, p. 462-468, Aug. 1995.

ESKER, P. D. Comparison of models for forecasting of Stewart's disease of corn in Iowa. **Plant Disease**, Quebec, v. 90, n. 10, p. 1353-1357, Oct. 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Rome, 2006. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/>>. Acesso em: 2 fev. 2011.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GATERMANN, K. H. et al. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understand of virulence of a gram-positive phytopathogenic bacteria. **Journal of Biotechnology**, Washington, v. 106, n. 19, p. 179-191, Dec. 2003.

GEORGE, M. L. C. et al. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in southeast Asia detected using PCR based DNA *fingerprinting*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 3, p. 302-309, Mar. 1997.

GILARDI, G.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Evaluation of spray programmes for the management of leaf spot incited by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato cv. Cuore di bue. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 4, p. 330-335, Apr. 2010.

GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* utilizando-se sondas de DNA e "primers" específicos. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v. 28, n. 1, p. 20-27, jan./fev. 2002.

GOTTSBERGER, R. A. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 285-292, July 2010.

GULLINO, M. L. et al. Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 37, n. 5, p. 461-466, Oct. 2009.

HAM, J. H. et al. WtsE, an AvrE-family type III effector protein of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, causes cell death in non-host plants. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, n. 5, p. 633-643, Sept. 2008.

HE, Y. et al. A diagnostic real-time PCR assay for the detection and quantification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, n. 6, p. S34-S34, June 2009.

HERRERA, C. M. et al. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* exhibits surface motility, which is a critical aspect of stewart's wilt disease development on maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, n. 10, p. 1359-1370, Oct. 2008.

HICKEL, E. et al. **Uvas sem sementes**: cultivares BRS Morena, BRS Clara e BRS Linda. Colombo: EMBRAPA Uva e Vinho, 2005. (Sistema de Produção, 8). 1 CD-ROM.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 23-28, Feb. 1990.

ISENBARGER, T. A. et al. Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 3, p. 840-849, Feb. 2008.

ISHIGA, Y. et al. Exogenous coronatine, but not coronafacic acid or methyl jasmonate, restores the disease phenotype of a coronatine defective mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato seedlings. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 76, n. 1, p. 188-195, Feb. 2010.

JAGOEIX, S.; BOVÉ, J. M.; GARNIER, M. PCR detection of the two 'Candidatus' liberobacter species associated with greening disease of citrus. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 10, n. 1, p. 43-50, Apr. 1996.

JEONG, K. S. et al. Virulence reduction and differing regulation of virulence genes in *rpf* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 24, n. 2, p. 143-151, Mar. 2008.

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

KIM, W. S. et al. *Erwinia pyrifoliae* sp. nov.; a novel pathogen that infects Asian pear trees. **International Journal of Systematic Evolutionary Bacteriology**, Reading, v. 49, n. 3, p. 899-906, Mar. 1999.

KLEITMAN, F. et al. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 121, n. 1, p. 463-475, Jan. 2008.

KOSITCHAROENKU, N. et al. Detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* from field samples using single-tube nested PCR. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 60, n. 3, p. 436-442, June 2011.

KOUTSOUDIS, M. D. et al. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 15, p. 5983-5988, Apr. 2006.

KUNKEAW, S.; TAN, S.; COAKER, G. Molecular and evolutionary analyses of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* race 1. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 23, n. 4, p. 415-424, 2010.

KURTZ, M. et al. Genome-driven investigation of compatible solute biosynthesis pathways of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and their contribution to water stress tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 16, p. 5452-5462, Aug. 2010.

LEE, I. M.; BARTOSZYK, D. E.; DAVIS, R. E. Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16S rRNA gene sequence analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2631-2636, July 1997.

LELIS, F. M. V. **Desenho de primers específicos para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum***. 2009. 32 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

LOWUS, F. J. et al. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

LYDON, J.; PATTERDON, C. D. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 166-170, Jan. 2001.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. et al. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 25, n. 3, p. 262-264, out. 1999.

MAURER, J. J. Rapid detection and limitations of molecular techniques. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 2, n. 2, p. 259-279, Apr. 2011.

MERCADO COMUM DO SUL. **Resolução RES N° 74/99**, de 20 de julho de 1999. Estandar Fitossanitário: delineamentos para a identificação de pragas não quarentenárias regulamentadas (PNQR) e estabelecimento dos seus requisitos fitossanitários. Rio de Janeiro, 1999. Disponível em:
<http://www.mercosur.int/msweb/portal%20intermediario/Normas/normas_web/Resoluciones/PT/Res_074_099_Standard%20Fitossanit%C3%A1rio%20Pragas%20N%C3%A3o%20Quarent_At%204_99.PDF>. Acesso em: 2 fev. 2011.

MICHENER, P. M.; PATAKY, J. K.; WHITE, D. G. Rates of transmitting *Erwinia stewartii* from seed to seedlings of a sweet corn hybrid susceptible to Stewart's wilt. **Plant Disease**, Quebec, v. 86, n. 9, p. 1031-1035, Sept. 2002.

MORAES, M. H. D. et al. Avaliação de dois meios de cultura semi-seletivos para a detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 385-389, 2010.

MUKAIHARA, T.; TAMURA, N. Identification of novel *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins through translocation analysis of *hrpB*-regulated gene products. **Microbiology**, New York, v. 155, n. 7, p. 2235-2244, July 2009.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, Oct. 1980.

NANDAKUMAR, R. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the Southern United States. **Plant Disease**, Quebec, v. 93, n. 9, p. 896-905, Sept. 2009.

NASH, R.; LINDAHL, T. **DNA replication in eukaryotic cells**. London: Cold Spring Harbor Laboratory, 1996. 1058 p.

NIÑO-LIU, D. O.; DARNIELLE, L.; BOGDANOVA, A. J. A simple method of mass inoculation of rice effective for both pathovars of *Xanthomonas oryzae*, and the construction of comparable sets of host cDNA libraries spanning early stages of bacterial leaf blight and bacterial leaf streak. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 7/8, p. 500-504, 2005.

OBRADOVIC, D.; KEVRESAN, S. Optimization of PCR in application of hot Start *Taq* DNA polymerase for detection of *Erwinia amylovora* with primers FER1_F and FER1_R. **Microbiology**, New York, v. 79, n. 6, p. 816-821, Dec. 2010.

ORGANISATION EUROPÉENNE ET MEDITERRANÉENNE POUR LA PROTECTION DES PLANTES. **Data sheets on quarantine pests *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli***. Paris, 2004a. Disponível em: <<http://pqr.eppo.org>>. Acesso em: 15 jan. 2010.

_____. **Distribution maps of quarantine pests for Europe: *Ralstonia solanacearum* race 2**. Paris, 2006. Disponível em: <<http://pqr.eppo.org/datas/PSDMS2/PSDMS2.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2010.

_____. **Diagnostic protocols for regulated pests: *Ralstonia solanacearum***. Paris, 2004b. Disponível em: <<http://nappo.org/phpXplorer/homes/guest/TAGRalstonia/Background%20Documents/EPPO%20Ralstonia.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2011.

_____. **Data sheets on quarantine pests *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens***. Paris, 2003. Disponível em: <http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Curtobacterium_flaccumfaciens/CORBFL_ds.pdf>. Acesso em: 15 set. 2011.

OZDEMIR, Z. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure cultures. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 91, n. 2, p. 495-497, Feb. 2009.

PALOMO, J. L. et al. Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus* based on the stable low molecular weight RNA (LMW RNA) profiles. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 106, n. 8, p. 789-793, July 2000.

PARK, Y. J. et al. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species specific primers based on *hrpF* gene sequences. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, n. 8, p. 419-423, July 2004.

PERUCH, L. A. M.; MICHEREFF, S. J.; ARAÚJO, I. B. Levantamento da intensidade da alternariose e da podridão negra em cultivos orgânicos de brássicas em Pernambuco e Santa Catarina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 464-469, out./dez. 2006.

PIETERSEN, G. A survey for 'Candidatus Liberibacter' species in South Africa confirms the presence of only 'Ca. L. africanus' in commercial citrus. **Plant Disease**, Quebec, v. 94, n. 2, p. 244-249, Feb. 2010.

POPOVIC, T. et al. Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. **African Journal of Agricultural Research**, Pretoria, v. 5, n. 19, p. 2730-2736, Oct. 2010.

REIS JÚNIOR, R. B. et al. **Uso de ferramentas moleculares no estudo da diversidade de microorganismos do solo**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2002. 31 p.

RODRIGUES NETO, J. et al. Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 42-44, 2011.

RODRÍGUEZ, E. A.; MARQUES, A. S. A. **Caracterização molecular, sorológica e nutricional de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* provenientes de fumo, feijão e soja**. Brasília: EMBRAPA, 2003. 28 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 52).

ROINE, E. et al. Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 3459-3464, Apr. 1997.

ROMMEL, C. C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; DUARTE, V. Detecção de bactérias associadas a gemas de pereiras européias no Rio Grande do Sul. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 360-367, Dec. 2010.

SCHAAD, N. W. et al. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by Bio PCR and an Automated Real-Time fluorescence detection system. **Plant Disease**, Quebec, v. 83, n. 12, p. 1095-1100, Dec. 1999.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3rd ed. Saint Paul: APS, 2001. 398 p.

SCHROEDER, B. K. S. et al. The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of sypA and syrB1 biosynthesis mutant analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 3, p. 336-348, 2001.

SILVA, J. B. C. et al. **Cultivo de tomate para industrialização**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 2006. (Sistema de Produção, 1). 1 CD-ROM.

SOUZA, V. L.; MARINGONI, A. C.; KRAUSE-SAKATE, R. Variabilidade genética em isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 170-176, mar./abr. 2006.

STEFANOVA, M. et al. Optimización de la recuperación de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* por la modificación de dos medios de cultivo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 178-181, 2009.

SUTLOVIC, D. et al. Interaction of humic acids with human DNA: proposed mechanisms and kinetics. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 29, n. 7, p. 1467-1472, Apr. 2008.

TEBALDI, N. D. et al. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry, immunostaining and direct viable counting. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 213-222, 2010.

TEGLI, S.; SERENI, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 331-337, Oct. 2002.

TEIXEIRA, D. C. Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the ‘*Candidatus*’ Liberibacter species associated with the disease. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, n. 1, p. 173-179, Feb. 2005.

TEIXEIRA, D. C.; AYRES, J. First report of a huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new liberibacter species, “*Candidatus* Liberibacter americanus”, with the disease. **Plant Disease**, Quebec, v. 89, n. 1, p. 107-111, Jan. 2005.

TEIXEIRA, D. C. et al. ‘*Candidatus* Liberibacter americanus’, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 5, p. 1857-1862, Sept. 2005a.

_____. PCR detection of the two liberibacter species associated with citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS CONFERENCE, 16., 2005, Athens. **Proceedings...** Athens: IOCV, 2005. 1 CD-ROM.

TORRES, J. P.; MARINGONI, A. C. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in common bean leaflets on soil. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 91, n. 1, p. 195-198, 2009.

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

TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR *fingerprinting*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 46-54, jan./fev. 2005.

VALENTINI, G. et al. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: etiologia, detecção e medidas de controle. **Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 4, p. 1-8, dez. 2010.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 472-489, Apr. 1994.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, Dec. 1991.

WANG, N. et al. The expression of genes encoding lipodepsipeptide phytotoxins by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is coordinated in response to plant signal molecules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 3, p. 257-269, Mar. 2006.

WATSON, J. D. et al. **Biologia molecular do gene**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 1268 p.

WILLIS, D. K.; KINSCHERF, T. G. Population dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strains on tomato cultivars Rio Grande and Rio Grande-Pto under field conditions. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 4, p. 219-227, Apr. 2008.

WOLF, J. M. van der et al. Fate of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the causal organism of bacterial ring rot of potato, in weeds and field crops. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 6, p. 358-365, June 2005.

WOLF, J. M. van der; ZOUWEN, P. S. van der. Colonization of cauliflower blossom (*Brassica oleracea*) by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, via flies (*Calliphora vomitoria*) can result in seed infestation. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 11/12, p. 726-732, Dec. 2010.

WRUCK, D. S. M. et al. Eliminação de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em estacas de bambu infestadas artificialmente. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 373-375, 2006.

XU, R. et al. Miniprimer PCR assay targeting multiple genes: a new rapid and reliable tool for genotyping *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 216-222, Feb. 2010.

YOUNGREN, B. et al. A plasmid partition system of the P1-P7*par* family from the pMT1 virulence plasmid of *Yersinia pestis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 14, p. 3924-3928, July 2000.

ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001. 421 p.

ZOCCOLI, D. M.; TOMITA, C. K.; UESUGI, C. H. Ocorrência de murcha bacteriana em Helicônias e musácea ornamental no Distrito Federal. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 45-46, 2009.