



**MARCELA CRISTINA GOULART**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE  
DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE  
FITOBACTÉRIAS EM SEMENTES DE SOJA [*Glycine  
max* (L.) MERRIL] POR *PRIMERS* ESPÉCIE-  
ESPECÍFICOS**

**Campinas, 2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



MARCELA CRISTINA GOULART

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE DETECÇÃO E  
IDENTIFICAÇÃO DE FITOBACTÉRIAS EM SEMENTES DE  
SOJA [*Glycine max* (L.) MERRIL] POR *PRIMERS* ESPÉCIE-  
ESPECÍFICOS

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
<i>Marcela Cristina Goulart</i>
<i>Suzete Lanza Destéfano</i>
aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia  
para obtenção do título de Mestra em Genética  
e Biologia Molecular, na área de Genética de  
Microorganismos.

Orientadora: Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Campinas, 2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G729d Goulart, Marcela Cristina, 1988-  
Desenvolvimento de metodologia de detecção e identificação de fitobactérias em sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] por *primers* espécie-específicos / Marcela Cristina Goulart. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Suzete Aparecida Lanza Destéfano.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Reação em cadeia da polimerase. 2. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. 3. *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. 4. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. 5. Soja - Sementes. I. Destéfano, Suzete Aparecida Lanza. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Development of method for detection and identification of phyto-bacteria in soybean (*Glycine max* L.) seeds by species-specific *primers*

**Palavras-chave em inglês:**

Polymerase chain reaction

*Curtobacterium flaccumfaciens* pv.

*flaccumfaciens* *Pseudomonas syringae* pv.

*savastanoi* *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

Soybeans - Seeds

**Área de concentração:** Genética de Microorganismos

**Titulação:** Mestra em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Suzete Aparecida Lanza Destéfano [Orientador]

Fabiana Fantinatti Garboggini

Ricardo Harakava

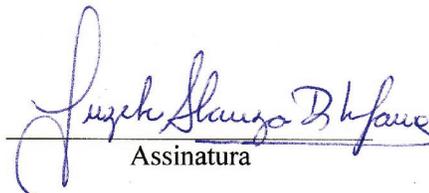
**Data de defesa:** 27-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

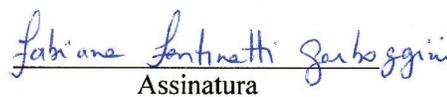
Campinas, 27 de fevereiro de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

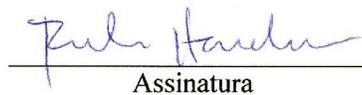
Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano (orientadora)

  
Assinatura

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

  
Assinatura

Dr. Ricardo Harakava

  
Assinatura

Dra. Valéria Maia Merzel

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dr. Ivan Paulo Bedendo

\_\_\_\_\_  
Assinatura



## RESUMO

A soja é considerada uma das culturas mais importantes no Brasil, em função de seu alto valor sócio-econômico, determinado pelas inúmeras aplicações de seus produtos e subprodutos e consequente expressão no mercado interno e externo. No entanto, a cultura desta oleaginosa é frequentemente ameaçada com a ocorrência de um vasto número de doenças, que podem acarretar depreciação do produto, redução no rendimento e perdas econômicas para os produtores. Dentre as principais doenças bacterianas que afetam a cultura da soja, destacam-se a pústula bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Xag); o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycines* (Psg); e a murcha de *Curtobacterium* causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), ocasionando perdas na produção de até 40%. A condição sanitária das sementes é extremamente importante se considerarmos que elas são veículos desses agentes fitopatogênicos que nelas podem se alojar e serem levados ao campo, provocando redução na germinação e vigor, e originando focos primários de infecção de doenças.

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver nova metodologia de diagnóstico com o uso das técnicas moleculares que permitissem detectar e identificar a presença de Psg, Xag e Cff em sementes de soja por meio do desenvolvimento de *primers* espécie específicos. Os *primers* desenhados a partir de sequências da região espaçadora 16S-23S RNAr, mostraram-se altamente específicos e sensíveis. O par de *primers* Curto2f/p322anti gerou um fragmento de 675 pb e capacidade de detecção a partir de 0,01 ng de DNA genômico e aproximadamente  $5 \times 10^3$  UFC/PCR; o par de *primers* Psg1/p322anti gerou um fragmento de 500 pb e o grau mínimo de sensibilidade foi de 1 pg de DNA genômico e cerca de 80 UFC/PCR; o par de *primers* Xanth2f/p322anti gerou um fragmento de 545 pb e capacidade de detecção a partir de 1 ng de DNA genômico e cerca de 700 UFC/PCR. Posteriormente, as sementes de soja foram infectadas artificialmente nas condições de 1; 0,5 e 0,1% de infecção. Nas amplificações com os *primers* espécie-específicos desenvolvidos, foi possível detectar as fitobactérias em todos os níveis de infecção testados diretamente do extrato bruto, e nas amplificações após o enriquecimento do extrato (BIO-PCR) o sinal positivo foi potencializado.



## ABSTRACT

Soybean is considered one of the most important crops in Brazil, due to its high socio-economic value, determined by its several products and sub products and its significant expression on the internal and external market. However, this oleaginous plant is often affected by the occurrence of different diseases, which cause depreciation of the product, reduction in yield and substantial economic losses. Among the main bacterial diseases, the bacterial pustule, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Xag), the bacterial blight caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycines* (Psg), and bacterial tan spot caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), producing yield losses of up to 40%. The seed health is extremely important since they are considered vehicles of pathogenic agents which can be led to the field, causing germination reduction and vigor; and yielding primary infection of the diseases.

This study aimed to develop a new method of diagnosis using molecular tools to detect and identify Psg, Xag or Cff in soybean seeds, through species-specific primers. The primers were designed from sequences of the 16S-23S rRNA and they were highly specific and sensitive. The pair of primers Curto2f/p322anti generated a fragment of 675 bp and was able of detecting down to 0.01 ng of genomic DNA and about  $5 \times 10^3$  CFU/PCR; the primer set Psg1/p322anti produced a fragment of 500 bp and reached a detection limit of 1 pg of genomic DNA and about 80 CFU/PCR; and Xanth2f/p322anti yielded a fragment of 545 bp and could detect up to 1 ng of genomic DNA and about 700 CFU/PCR. Subsequently, soybean seeds were artificially infected in the following conditions: 1, 0,5% and 0,1% infection. In the amplifications using the species-specific primers, it was possible to detect the three different phyto-bacteria at all tested levels of infection directly of the crude extract and in the amplifications after enrichment of the extract (BIO-PCR), the positive signal was enhanced.



# SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xix
LISTA DE TABELAS.....	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xxiii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. A cultura da soja.....	3
2.2. Importância da cultura da soja .....	4
2.3. As principais doenças da soja.....	5
2.3.1. A murcha de <i>Curtobacterium</i> .....	5
2.3.2. O crestamento bacteriano.....	7
2.3.3. A pústula bacteriana .....	9
2.4 Região espaçadora 16S-23S RNAr como marcador molecular na identificação de fitopatógenos .....	11
2.5. Detecção de fitobactérias em sementes .....	13
2.5.1 Métodos convencionais.....	15
2.5.2 Métodos moleculares.....	16
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
3.1. Objetivo geral .....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1 Linhagens .....	19
4.2. Reativação de culturas e condições de cultivo .....	20
4.3. Extração de DNA genômico.....	20
4.4. <i>Primers</i> e condições de amplificação da região espaçadora 16S-23S RNAr.....	21
4.5. Análise de RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ) da região espaçadora 16S-23S RNAr .....	22
4.6. Sequenciamento da região espaçadora 16S-23S RNAr e desenho de <i>primers</i> .....	22
4.7. Níveis de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se os <i>primers</i> desenvolvidos.....	23
4.8. Detecção de fitobactérias em sementes contaminadas artificialmente .....	24

<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
5.1. Análise de PCR-RFLP ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ) da região espaçadora 16S-23S RNAr.....	25
5.2 Desenho de <i>primers</i> espécie específicos e testes de especificidade .....	26
5.3 Níveis de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se os <i>primers</i> desenvolvidos.....	28
5.4 Validação da metodologia de detecção em sementes.....	31
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>37</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>38</b>

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

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

**Fernando Pessoa**



**Aos meus pais, Neide e Paulo, pelo amor incondicional e incentivo, por serem exemplo de vida e de luta, e serem minha fonte de inspiração diária para seguir nessa difícil caminhada. Obrigada por se fazerem presentes mesmo na distância, e por acreditarem no meu sonho junto comigo.**

**Aos meus irmãos, Bruno e Vinícius, pelo apoio nos momentos de dificuldade, pelos sorrisos nos momentos de alegria, e por serem os melhores irmãos do mundo. Minhas almas gêmeas.**

**Dedico.**



## **AGRADECIMENTOS**

**À Deus, por ter sido meu companheiro de todos os dias e noites, não ter me abandonado nos momentos de fraqueza, e por ter me concedido a benção de chegar até aqui.**

**À Profa. Dra. Suzete A. L. Destéfano, por ter me acolhido em um momento tão complicado, acreditado no meu potencial e possibilitado a conclusão desse trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, pelo empenho e compreensão ao longo desses meses. Serei sempre grata.**

**Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.**

**Ao Dr. Márcio José da Silva, Pesquisador do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas - CBMEG/UNICAMP - pelo sequenciamento das amostras.**

**Aos membros da banca de qualificação: Prof. Ivan Bedendo, Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini e Prof. Dr. Ricardo Harakava, por suas importantes observações e sugestões.**

**Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, que foram grandes companheiros, me acolhendo com carinho e se tornando minha segunda família, também responsáveis por esta conquista: Mariana (Meri Jeine), amiga-mãe, sempre presente, grande exemplo para mim de mulher, mãe e profissional; Daniele (Calabresa), parceira de todas as horas, de inestimável ajuda em todos os momentos; Lucilene (Lupita), minha cantora favorita, sempre disposta nas minhas intermináveis dúvidas; Alex (Boy), grande amigo, quebra galho de todas as horas, que contribuiu de forma imensurável nos meus experimentos; Renata (Rê), pela enorme contribuição com os isolados e pelas palavras aconchegantes nos momentos de tristeza; Thaís (Massa) pela parceria de boas risadas e conversas; Sônia (Soninha), pelo cafezinho de todo dia, pelo debate esportivo da hora do almoço e pelo exemplo de humildade, e a todos os amigos do laboratório.**

Às estagiárias, Mariana Torreão (Pão de Batata), Marina, Gabriela e Suzana, que de alguma forma contribuíram para a realização dos experimentos.

À Bruna Rafaela Coelho, companheira, amiga, irmã, e mãe, por ter segurado minha mão nos momentos mais difíceis, dividido comigo minhas alegrias e tristezas, e por não ter me deixado desistir no momento em que achei que tudo estivesse perdido. Sem você, isso não seria possível. Essa conquista também é sua!

A todos os amigos e familiares, de perto ou de longe, que sempre me incentivaram e compartilharam comigo a alegria dessa conquista.

Aos meus irmãos, Bruno e Vinícius, por terem sido além de irmãos, companheiros de todas as horas. Obrigada pelos conselhos, pela amizade, compreensão nas minhas ausências, e por darem um colorido especial à minha vida. Que o nosso amor fraternal e a nossa união continuem sendo exemplos para muitos. Amo vocês, incondicionalmente.

E finalmente, às duas pessoas que mais contribuíram para essa conquista: meus amados pais, Paulo e Neide. Obrigada pelo amor incondicional, pelo apoio e incentivo diário, por serem a razão pela qual acordo todos os dias e enfrento a jornada que é a vida. Obrigada por serem exemplo de tudo que eu quero ser, por me darem uma família tão amada e unida, e por me ensinarem sempre o caminho do bem. Vocês são a razão da minha vida! Sem vocês, nada disso tem sentido. Amo vocês, hoje e sempre.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Murcha-de-Curtobacterium, causada por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> , em soja. A – Murcha nas folhas ; B - clorose oval ou alongada, ao longo da margem da folha progredindo na direção da nervura. Fonte: EMBRAPA SOJA, 2007 .....	7
Figura 2. Folhas de soja com sintomas de crestamento. Fonte: EMBRAPA SOJA, 2007 .....	9
Figura 3. Folhas de soja com encharcamento nos tecidos, com formação de pústulas ao redor, circuncidadas por halo amarelo. Fonte: EMBRAPA SOJA, 2007 .....	11
Figura 4. Digestão dos produtos de amplificação correspondentes à região espaçadora.....	25
Figura 5. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Curto2F/p322 anti.....	26
Figura 6. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Psgl/p322 anti .....	27
Figura 7. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Xanth2F/p322 anti .....	27
Figura 8. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Curto2F/p322anti com diferentes quantidades de DNA da linhagem Cff (IBSBF 1290 <sup>P</sup> ).....	28
Figura 9. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Psgl/p322anti com diferentes quantidades de DNA da linhagem de Psg (IBSBF 1462 <sup>P</sup> ).....	28
Figura 10. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Xanth2F/p322anti com diferentes quantidades de DNA da linhagemde Xag (IBSBF 2440 <sup>P</sup> ).....	29
Figura 11. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Curto2F/p322anti em suspensão bacteriana e diluição seriada da linhagemde Cff (IBSBF 1290 <sup>P</sup> ). .....	29
Figura 12. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Psgl/p322anti em suspensão bacteriana e em diluição seriada da linhagem de Psg (IBSBF 1462 <sup>P</sup> ).....	30
Figura 13. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Xanth2F/p322anti em suspensão bacteriana e em diluição seriada da linhagem de Xag (IBSBF 2440 <sup>P</sup> ).....	30
Figura 14. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Curto2F/p322anti diretamente no extrato bruto das sementes infectadas com Cff (IBSBF 1290 <sup>P</sup> ) .....	31
Figura 15. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Curto2F/p322anti após enriquecimento (BIO-PCR) do extrato bruto das sementes infectadas com Cff (IBSBF 1290 <sup>P</sup> ).....	31
Figura 16. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Curto2F/p322anti diretamente no extrato bruto das sementes infectadas com Cff (IBSBF 1290 <sup>P</sup> ) em 0,1% de infecção.....	31
Figura 17. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Curto2F/p322anti após enriquecimento (BIO-PCR) do extrato bruto das sementes infectadas com Cff (IBSBF 1290 <sup>P</sup> ) em 0,1% de infecção.....	32

<b>Figura 18. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Psgl/p322anti diretamente no extrato bruto das sementes infectadas com Psg (IBSBF 1462<sup>P</sup>).....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 19. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Psgl/p322anti após enriquecimento (BIO-PCR) do extrato bruto das sementes infectadas com Psg (IBSBF 1462<sup>P</sup>).....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 20. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Psgl/p322anti diretamente no extrato bruto das sementes infectadas com Psg (IBSBF 1462<sup>P</sup>), em 0,1% de infecção.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 21. Produtos de amplificação utilizando-se o par de <i>primers</i> Psgl/p322anti após enriquecimento (BIO-PCR) do extrato bruto das sementes infectadas com Psg (IBSBF 1462<sup>P</sup>), em 0,1% de infecção.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 22. Produtos de amplificação utilizando o par de <i>primers</i> Xanth2F/p322anti.....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais de testes de detecção em sementes incluindo tempo requerido para análise, sensibilidade, facilidade de aplicação, e especificidade, para detecção de fungos, bactérias e vírus.....	15
Tabela 2. Linhagens utilizadas no estudo.....	20
Tabela 3. Pares de <i>primers</i> , regiões amplificadas, tamanhos dos fragmentos e programas de amplificação utilizados nos experimentos .....	23



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>16S-23S</b>	região espaçadora entre os RNAs ribossomais 16S e 23S
<b>BSA</b>	albumina sérica bovina
<b>°C</b>	graus Celsius
<b>CBMEG</b>	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
<b>CNPSo</b>	Centro Nacional de Pesquisa de Soja
<b>CNS -</b>	<i>Corynebacterium Nebraskense Selective Medium</i>
<b>CONAB</b>	Companhia Nacional de Abastecimento
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	desoxirribonucleotídeo trifosfatado
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetracético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<b>g</b>	gramas
<b>h</b>	hora
<b>ha</b>	hectare
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>IBSBF</b>	Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>LiCl</b>	cloreto de lítio
<b>M</b>	molar

<b>mg</b>	miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>μg</b>	micrograma
<b>μL</b>	microlitro
<b>μM</b>	micromolar
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>NaOCl</b>	hipoclorito de sódio
<b>ng</b>	nanograma
<b>P</b>	Linhagem Patotipo
<b>pb</b>	pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>qsp</b>	quantidade suficiente para
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>RNase</b>	ribonuclease
<b>RNAr</b>	ácido ribonucléico ribossomal
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b><i>rpoB</i></b>	gene codificante da subunidade β da RNA polimerase

<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>T</b>	linhagem Tipo
<b>TAE</b>	Tris - Acetato - EDTA
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima DNA polimerase)
<b>TE</b>	Tris - EDTA
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>tRNA</b>	RNA transportador
<b>U</b>	Unidade
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>USDA</b>	United States Department of Agriculture



# 1. INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] está entre as espécies produtoras de grãos de maior relevância socioeconômica. É a oleaginosa mais cultivada no mundo, cujos teores de óleo e proteínas estão em torno de 20 e 40%, respectivamente. Em razão de seu alto potencial produtivo, aliado à sua composição química e ao valor nutritivo, essa cultura gerou um amplo complexo agroindustrial (ROESSING; GUEDES, 1993). A soja, pelas suas qualidades nutricionais, facilidade de adaptação a quase todas as regiões do globo, alta produção e facilidade de cultivo, pode ser considerada como um dos alimentos para a população do futuro (BELLAVIER; SNIZER, 1999). A expansão do setor de soja está relacionada principalmente a fatores associados ao comércio internacional e ao comportamento de grandes mercados de exportação. No Brasil, o consumo de soja e de seus derivados vem crescendo desde a década de 90, mas a maior parte da produção é exportada na forma de grãos ou, em menor escala, dos subprodutos do processamento primário, como farelo e óleo de soja. O aumento da produção está relacionado ao consumo mundial de proteína animal, entre estes, aves, suínos e bovinos que são alimentados com dietas contendo altos teores de farelo de soja.

No cultivo da soja tem sido empregada alta tecnologia, resultando em alto rendimento de grãos por área. Entretanto, alguns fatores podem interferir na produtividade da cultura, como as doenças causadas por diversos tipos de patógenos. Dentre as principais doenças bacterianas que afetam a cultura da soja destacam-se a pústula bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*; o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*; e a murcha de *Curtobacterium* causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, ocasionando perdas na produção de até 40%. Estes patógenos podem ser veiculados por sementes, provocando redução na germinação e vigor, além de originar focos primários de infecção (GOULART, 1997).

Nesse sentido, a detecção de fitopatógenos em sementes é altamente desejável, uma vez que as mesmas constituem a principal fonte de inóculo no campo e podem ser transportadas a longas distâncias. Sinais e lesões nas sementes, nem sempre são detectados por inspeção visual, demandando, portanto, a associação de várias técnicas para a identificação do patógeno (MOURA et al., 2005; MARIANO ; SILVEIRA, 2005; DEZORDI et al., 2005; DEZORDI et al., 2004; DENARDIN, 2004; DENARDIN; 2002). Dentre as técnicas podemos citar o plantio em ambiente controlado e substrato esterilizado, uso de meios seletivos e semi-seletivos, inoculação

de plantas hospedeiras, uso de bacteriófagos, sorologia e sondas de DNA (SCHAAD et al., 2001). Ainda, o emprego de técnicas moleculares em procedimentos de rotina para detecção de patógenos em sementes tem se mostrado uma ferramenta promissora devido à sua maior precisão em caracterizar micro-organismos e de apresentar resultados mais rápidos no processo de detecção e identificação (HALFELD-VIEIRA et al., 2000; LOUWS et al., 1999).

A escolha para o estabelecimento de procedimentos de análise de rotina deve basear-se, principalmente, na sensibilidade, na especificidade, na reprodutibilidade e na precisão, bem como, na eficiência, nos custos e na flexibilidade (MARIANO; SILVEIRA, 2005; DEZORDI et al., 2005; MOURA et al., 2005; DENARDIN, 2004; DENARDIN, 2002).

Assim, o presente projeto teve por objetivo o desenvolvimento de metodologia que permitisse detectar e identificar a presença de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de soja, por meio de *primers* espécie-específicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. A cultura da soja

A soja pertence ao grupo das Fanerógamas, divisão Angiospermae, classe Dicotyledoneae, ordem *Rosales*, família *Leguminosae*, subfamília *Faboideae*, (sinônimo *Papilionoideae*) e gênero *Glycine* L. Essa cultura teve seu centro de origem na costa leste da Ásia, na China, onde foi domesticada e expandiu-se lentamente para o sul da China, Coréia, Japão e sudeste da Ásia (PROBST; JUDD, 1973). No ocidente, a soja apareceu no final do século XV e início do século XVI, com a chegada dos navios europeus à Ásia, e permaneceu apenas como curiosidade botânica nos jardins da Inglaterra, França e Alemanha durante os quatro séculos que se seguiram (MORAES et al., 1996). Somente no século XVIII pesquisadores europeus iniciaram estudos do grão de soja como fonte de óleo e nutriente animal. Nos EUA, o primeiro registro data de 1804 na região da Pensilvânia, enquanto que no Canadá, Argentina, Cuba, Filipinas e Egito, essa cultura se tornou conhecida somente no século XIX (PROBST; JUDD, 1973).

A soja cultivada atualmente é muito diferente dos ancestrais que lhe deram origem. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais, entre duas espécies de soja selvagens, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas chineses (GOMES, 1990). Nos Estados Unidos, a soja começou a ser comercializada no século XX e a partir de então, houve um rápido crescimento na produção, com o desenvolvimento de cultivares comerciais (EMBRAPA, 2007).

No Brasil, a mais antiga referência vem do Estado da Bahia em 1882, através de Gustavo D'Utra, professor da Escola de Agronomia da Bahia, responsável pelos primeiros estudos com a cultura no país. Em São Paulo, a soja foi cultivada pela primeira vez no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em 1901, onde se iniciaram os estudos para a obtenção de cultivares aptos à região. Por volta de 1914, foi introduzida no Rio Grande do Sul por F. C. Craig, da Escola Superior de Agronomia e Veterinária, e foi nessa região que a cultura encontrou condições ideais para seu desenvolvimento, provavelmente pela similaridade do clima da região sul do país com o clima do sul dos EUA, local de origem dos primeiros genótipos da soja brasileira (BLACK, 2000; BONETTI, 1981). As estatísticas oficiais de produção foram registradas pela primeira vez em 1945 no Estado de São Paulo, e em 1949, o Brasil começou a aparecer como produtor de soja no cenário internacional, tendo seu verdadeiro impulso nas décadas de 60 e 70, quando se iniciou o cultivo sucessivo trigo-soja no Rio Grande do Sul e com o crescente interesse da indústria de óleo e demanda do mercado internacional. (MORAES; SILVA, 1996; SEDIYAMA et al., 1996).

## 2.2. Importância da cultura da soja

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, perdendo apenas para os EUA em área plantada e produção total (USDA, 2012). Segundo levantamento do CONAB (2014), a cultura da soja apresentou um crescimento na área a ser plantada de 6,6%, passando de 27,7 milhões hectares plantados na safra anterior, para uma área aproximada de 29,5 milhões de hectares. A produtividade nacional na safra 2013/14 foi de aproximadamente 3.056 kg/ha, um aumento em torno de 4,0% em relação à safra anterior. Se as condições climáticas forem favoráveis durante o desenvolvimento vegetativo da lavoura, a produção prevista atingirá 90.331,4 mil toneladas, representando um incremento de 10,8% em relação à produção anterior, constituindo-se assim, em um novo recorde na produção nacional (CONAB, 2014). Em termos globais, o Brasil participa com cerca de 29,8% da produção e 38,8% das exportações mundiais de soja em grão (USDA, 2013). Em torno de 85% da colheita mundial de soja é processada para produzir óleo e resíduos de extração (torta no caso da prensagem e farelo no caso de extração por solvente), os quais são utilizados na preparação de rações para animais; sendo que de 4% a 5% desses resíduos são reprocessados em farinhas e proteínas para uso alimentício (EMBRAPA/CNPSO, 2003). O alto valor comercial dessa leguminosa rica em proteínas está relacionado com aumento do consumo na alimentação humana e animal em todo o mundo, sendo que o consumo médio anual per capita em nível mundial é de 2,4 kg, o que equivale a cerca de 6,5 g de soja por dia, ou ainda, 2,4 g de proteína de soja per capita por ano (EMBRAPA/CNPSO, 2003). Além disso, o grão de soja possui, em média, 40% de proteína, 20% de lipídios (óleo), 5% de minerais e 34% de carboidratos. De acordo com o USDA *Nutrient Database for Standard Reference* (2012), 100 gramas de grãos de soja fornecem 36,5 gramas de proteínas, 227 mg de cálcio, 15,7 gr de ferro, 280 gr de magnésio, 704 mg de fósforo, 1797 mg de potássio, 4,9 mg de zinco, bem como vitaminas A, E, C, B1, B2, B3, B5, B6 e ácido fólico.

A expansão do setor de soja está relacionada principalmente a fatores associados ao comércio internacional e ao comportamento de grandes mercados de exportação. No Brasil, o consumo de soja e de seus derivados vem crescendo desde a década de 90, mas a maior parte da produção é exportada na forma de grãos ou, em menor escala, dos subprodutos do processamento primário, farelo e óleo de soja. O aumento da produção também está ligado ao aumento no consumo mundial de proteína animal, proveniente de aves, suínos e bovinos que são alimentados com uma dieta contendo altos teores de farelo de soja. No mercado europeu a demanda por soja aumentou devido à proibição do uso de proteínas de carne e osso na alimentação de animais (PINTO, 2005).

### 2.3. As principais doenças da soja

A cultura da soja pode ser afetada por mais de 100 tipos de doenças em todo o mundo, sendo que, no Brasil, 40 delas são causadas por vírus, fungos, bactérias e nematóides (HARTMAN; SINCLAIR, 1999). As perdas anuais de produção causadas por doenças são estimadas em cerca de 15% a 20%, podendo chegar a quase 100% em casos extremos (EMBRAPA, 2007). A importância de cada uma delas varia com o ano, a região, as cultivares predominantes, a data de semeadura e as práticas agrônômicas adotadas (SILVA et al., 2008).

As principais doenças fúngicas que afetam a cultura da soja são: ferrugem (*Phakopsora pachirhizi*) Syd; P. Syd; antracnose (*Colletotrichum truncatum*) (SCWEIN.) Andrus, W. D. Moore; cancro da haste [*Diaporthe phaseolorum* (CKE.; ELL) f. sp. *meridionalis*], crestamento foliar e mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*) (TAK. MATSUMOTO; TOMOY.) M. W. Gardner; mancha parda (*Septoria glycinis*) Hemmi; mela ou requeima (*Rhizoctonia solani*); míldio (*Peronospora manchurica*) (NAUMOV) Syd; oídio (*Erysiphe diffusa*) (COOKE; PECK) U. Braun; S. Takamatsu; entre outras (EMBRAPA, 2007).

Dentre as doenças bacterianas destacam-se o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (COERPER, 1919) (GARDAN et al., 1992); a pústula bacteriana da soja, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (NAKANO, 1919) e a murcha de *Curtobacterium* causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (HEDGES) (COLLINS; JONES, 1983; HENNING et al., 2005).

#### 2.3.1. A murcha de *Curtobacterium*

Relatada primeiramente no feijoeiro em 1920, no estado de Dakota do Sul, EUA, (HEDGES, 1922), a murcha de *Curtobacterium* também foi descrita posteriormente em países como Bélgica, Hungria, Grécia, Romênia, Tunísia, Iugoslávia e Austrália (COSAVE, 2003).

Essa doença é causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), que pertence a Classe *Actinobacteria*, Ordem *Actinomycetales*, Família *Microbacteriaceae* e Gênero *Curtobacterium*. Cff é uma bactéria aeróbia, móvel com flagelos laterais ou polares, Gram-positiva, ocorrendo individualmente ou em pares, além de apresentar colônias com pigmentação amarela, laranja ou rosa. É quimioheterotrófica, não apresenta esporos e ácidos graxos (BRADBURY, 1986). A temperatura ótima de crescimento está entre 24-27° C e a máxima está na faixa de 35-37 °C (SINCLAIR, 1999). Colônias com 2-4 mm de diâmetro crescem em 3-4 dias em ágar com extrato de glicose e levedura (GUIMARÃES, 1997).

Os principais sintomas são murcha nas mudas durante o dia e recuperação da turgescência à noite; necrose marginal nas folhas inferiores e, posteriormente, nas folhas superiores, a qual não é precedida por encharcamento (Figura 1). Plantas mais velhas não murcham, e em condições de seca, as folhas desenvolvem diversas manchas cloróticas de tamanho reduzido; quando ocorre uma sutura em vagens, essas se desenvolvem de forma anormal e vazias (EPPO, 2011). Além disso, quando sementes contaminadas são semeadas, as plântulas podem ser raquíticas, os folíolos fundidos e, posteriormente as vagens ocas (SINCLAIR, 1999; SWEETS, 2002). Estes sintomas ocorrem porque a bactéria coloniza exclusivamente o xilema, levando à formação de fenóis, que causam o enegrecimento vascular. As células bacterianas obstruem os feixes vasculares causando a interrupção do fluxo de água para a parte aérea, e, com isto, ocasiona a murcha das folhas e a morte da parte aérea (AGRIOS, 1997; GUIMARÃES, 1997).

De acordo com Hedger (1926), a via mais conhecida de disseminação de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* é através de sementes infectadas e material propagativo contaminado. De acordo com Zaumeyer (1932), citado por Guimarães (1997), a penetração da bactéria pode ocorrer por hidatódios e estômatos, além de injúrias causadas pelo nematóide *Meloydogine incognita* (COSAVE, 2003). A disseminação pode se dar pelo vento, chuva, granizo, enxurradas e irrigações. A bactéria é muito resistente ao dessecamento e pode permanecer viável no solo por até dez meses. Outros fatores que favorecem a doença são as altas temperaturas (32 °C), o estresse de umidade e a chuva de granizo (COSAVE, 2003).

O controle desta fitobactéria está fundamentado no uso de cultivares resistentes, rotação de culturas e uso de sementes sadias (MARINGONI; CAMARA, 2006; ALENCAR et al., 2008; HERBES et al., 2008), uma vez que o controle químico não é uma opção presente, pois não há produtos registrados. Após o surgimento na lavoura, o controle da doença somente é possível com a erradicação da cultura (ROMEIRO, 2005).

O método de tratamento de sementes, contaminadas interna ou externamente, mais utilizado é a termoterapia para erradicação de fitobactérias (KIMURA, 1991; ZAMBOLIM, et al., 1997). No entanto, este método pode causar retardamento ou redução da germinação e do vigor da semente e a sua eficiência depende da localização do patógeno, do vigor e da sensibilidade da semente a temperaturas elevadas (MENTEN, 1995).

De acordo com a Instrução Normativa SDA nº 38 de 14 de Outubro de 1999, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) é considerada praga quarentenária A1 para soja, porém essa espécie bacteriana foi relatada pela primeira vez no país, em 1995 em feijoeiro no Estado de São Paulo (MARINGONI; ROSA, 1997). Hoje essa fitobactéria se

encontra distribuída em várias regiões produtoras de feijão e soja, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Ainda, há relatos da doença nos Estados de Goiás e Distrito Federal, também no feijoeiro (UESUGI et al. 2003). Recentemente, a murcha de *Curtobacterium* foi relatada pela primeira vez em soja na Alemanha, na cidade de Dornburg (SAMMER; REIHER, 2012) e no Brasil, no Estado do Paraná (SOARES et al., 2013).

Com relação aos métodos moleculares de detecção de Cff em feijão, *primers* denominados CF4 e CF5 foram desenvolvidos a partir de biblioteca genômica por Guimarães e colaboradores (2001), entretanto, segundo Deuner (2007) esses *primers* não se mostraram específicos na identificação de alguns isolados de Cff provenientes do Estado de São Paulo. Tegli e colaboradores (2002) também desenvolveram *primers* denominados *Cff*FOR2 e *Cff*REV4, os quais foram utilizados para detecção da fitobactéria em extratos de sementes de feijão.

Recentemente, Soares e colaboradores (2013) descreveram a presença de Cff em plantas de soja a partir de folhas que apresentavam os sintomas típicos da doença através do isolamento em meio de cultura CNS modificado (NUNES et al., 2004) e posterior confirmação da identidade por PCR utilizando os *primers* desenvolvidos por Tegli e colaboradores (2002). Embora Cff tenha sido detectado recentemente em plantas de soja no Brasil, ainda não existem estudos relacionados à metodologia de detecção dessa fitobactéria diretamente de sementes de soja.



**Figura 1.** Murcha de *Curtobacterium*, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, em soja. (A) Murcha nas folhas ; (B) Clorose oval ou alongada, ao longo da margem da folha progredindo na direção da nervura. Fonte: EMBRAPA SOJA, 2007.

### 2.3.2. O crestamento bacteriano

As espécies de *Pseudomonas syringae* são grandes causadoras de doenças em uma diversidade de espécies de plantas agronomicamente importantes. Linhagens pertencentes a essa espécie bacteriana exibem um elevado grau de especificidade de hospedeiro, infectando apenas

algumas espécies de plantas ou mesmo alguns genótipos de uma única espécie. Assim, as espécies de *P. syringae* foram subdivididas em mais de 50 patovares, os quais foram baseados em uma vasta gama de hospedeiros. Baseado em uma análise genética detalhada, através de ribotipagem e na homologia DNA-DNA, algumas espécies de *P. syringae* foram reclassificadas como *P. savastanoi*, incluindo os patovares *savastanoi*, *glycinea*, *tabaci*, e *phaseolicola* (ZHAO et al, 2011).

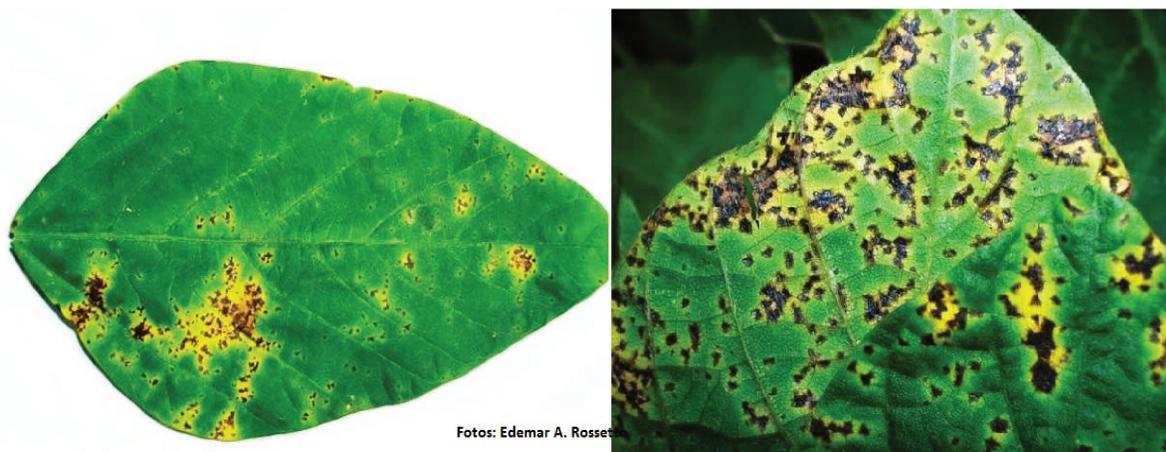
O crestamento bacteriano, causado pela bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg), é uma das doenças mais importantes da soja, estando distribuída mundialmente. Os danos causados por essa doença podem variar de 5-40%, ocorrendo com maior frequência e severidade em regiões de clima temperado, tendo grande capacidade de destruição foliar (HARTMAN, 1999). No entanto, não há estudos conclusivos sobre os danos causados pela bactéria nos cultivares de soja do Brasil (EMBRAPA SOJA, 2007).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) é uma bactéria hemibiotrófica, classificada como Gram-negativa, pertencente à Classe *Gammaproteobacteria*, Ordem *Pseudomonadales*, Família *Pseudomonadaceae* e gênero *Pseudomonas*. Apresentam-se sob a forma de bastonetes retos ou curvos, móveis, normalmente com mais de um flagelo polar (lofótricas), aeróbicas estritas, capazes de produzir pigmentos fluorescentes em meios especiais. Ainda, formam colônias redondas, brancas, lisas, brilhantes, com bordos ligeiramente ondulados em meios nutritivos, tendo sua temperatura ótima de crescimento entre 24-25 °C (SCHAAD et al., 2001).

Segundo Farhatullah e colaboradores (2010), primeiramente a bactéria infecta os cotilédones e posteriormente as mudas, penetrando na planta através dos estômatos ou ferimentos. As folhas são geralmente atacadas por essa bactéria porque ela existe epifiticamente sobre superfícies foliares. Segundo Almeida e colaboradores (2005), os sintomas nas folhas surgem como pequenas manchas, de aparência translúcida e circundadas por um halo de coloração verde-amarelada. A maior ou menor largura do halo está diretamente ligada à temperatura, sendo largo sob temperaturas amenas e estreito ou quase inexistente em temperaturas mais altas. Mais tarde essas manchas necrosam e adquirem contornos aproximadamente angulares, chegando a coalescer e formar extensas áreas de tecido morto entre as nervuras secundárias. Na face inferior da folha, as manchas são de coloração quase negra apresentando uma película brilhante nas horas úmidas da manhã, formadas pelo exsudato da bactéria. Nos estádios jovens da planta, infecções severas conferem aparência enrugada às folhas, como se estivessem sido infectadas por vírus (Figura 2).

Embora seja uma doença comum em folhas, essa pode ser encontrada em outros órgãos da planta, como hastes, pecíolos e vagens (HENNING et al., 2005). As infecções primárias desta bacteriose têm origem em sementes infectadas, em resíduos culturais de safras anteriores ou no próprio solo, enquanto as transmissões secundárias são favorecidas por períodos úmidos e temperatura média entre 20-26 °C. Dias secos permitem que escamas finas de exsudato bacteriano se disseminem na lavoura, requerendo, contudo, um filme de água na superfície da folha para haver a infecção do hospedeiro (EMBRAPA SOJA, 2007). Em região de clima temperado, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) sobrevive fora da estação de cultivo, sendo viável por até 16 meses em semente de soja (AGARWAL; SINCLAIR, 1987). As principais medidas de controle incluem uso de sementes de boa qualidade fitossanitária, rotação de culturas, bom preparo do solo, seleção de variedades resistentes, uso de pesticidas e cuidadosa destruição de restos culturais (ALMEIDA et al., 2005).

Com relação à descrição de metodologias de detecção e identificação de Psg, somente são mencionados relatos envolvendo técnicas convencionais. Nicholson e Sinclair (1971) detectaram Psg em sementes de soja através do isolamento em meio LBA (*Lima-Bean Agar*). Kennedy (1969) detectou o patógeno por meio de inoculação de uma suspensão de sementes maceradas em plântulas de soja e posterior isolamento; Alvarez e colaboradores (1995) detectaram a bactéria em lotes de sementes por meio de semeadura do extrato obtido a partir de uma suspensão de sementes de soja infectadas em meio modificado KBC (*King's medium* com cefalexina).



**Figura 2.** Folhas de soja com sintomas de crestamento. Fonte: EMBRAPA SOJA, 2007

### 2.3.3. A pústula bacteriana

A pústula bacteriana é também uma das principais doenças que afetam a cultura da soja em todo mundo, sendo favorecida em ambientes com alta temperatura e umidade. Chuvas fortes

esporádicas aumentam a severidade da doença e os danos podem superar 40% da produção (PRATHUANGWONG; AMNUAYKIT, 1987). Segundo Kim e colaboradores (2011), ela reduz o rendimento dos grãos de 15-40% em altas temperaturas e umidade, principalmente por meio de degradação da clorofila e desfolha prematura. Seu agente causal, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Xag), foi descrito primeiramente no Japão em 1919 (NAKANO, 1919). Xag pertence à Classe *Gammaproteobacteria*, Ordem *Xanthomonadales*, Família *Xanthomonadaceae* e gênero *Xanthomonas*. É uma bactéria gram-negativa, móvel por um único flagelo polar, medindo entre 0.5-0.9 x 1.4-2.3 micrômetros; em ágar-carne, ágar-nutriente e Wakimoto, suas colônias são de cor amarela pálida, circulares, lisas com a margem inteira, e sua temperatura ótima de crescimento em meio batata-dextrose-agar é 25-30 °C, com a máxima de 35 °C e mínima de 10 °C (HOKAWAT, 1978).

Os sintomas que caracterizam a pústula bacteriana iniciam-se por pequenas manchas, nunca de aparência translúcida, de coloração verde-amarelada, com centro elevado de cor amarelo-palha, que se tornam necróticas em pouco tempo, geralmente com estreito halo amarelo circundante, que pode alargar-se nas lesões mais velhas (Figura 3). As manchas, dispostas irregularmente na superfície das folhas, aumentam de tamanho com a evolução da doença e, em ataques intensos, essas lesões coalescem, causando desfolha prematura ou tornando a superfície foliar quase totalmente necrosada (NARVEL et al., 2001; THOWTHAMPITAK et al., 2008). Inicialmente se diferencia a pústula bacteriana do crestamento bacteriano pela existência de uma pequena elevação de cor esbranquiçada no centro da mancha, na face abaxial da folha. Ainda, ocorre diferença entre a coloração das lesões necróticas, que no caso da pústula, apresenta coloração parda com contornos arredondados e ausência de brilho, enquanto o crestamento apresenta contornos angulares, de coloração pardo-escura a negra, com brilho na face inferior (PRATHUANGWONG; AMNUAYKIT, 1987).

O patógeno é transmitido pela semente, a qual não apresenta sintoma típico. Os restos de cultura são também fonte de inóculo. A bactéria penetra na planta através de ferimentos e aberturas naturais. Infecções secundárias são favorecidas por chuva e vento, aliados às condições de umidade elevada e temperatura alta (acima de 28 °C) e pode sobreviver na rizosfera da cultura do trigo e, assim, manter o inóculo para a lavoura de soja a ser instalada posteriormente. A principal medida de controle é o uso de variedades tolerantes ou resistentes (HWANG; LIM, 1998).

Diante de sua importância econômica e das perdas na produção causadas pela pústula bacteriana, diversos estudos para detecção desse patógeno em sementes e em tecidos vegetais vem sendo desenvolvidos. Khaeruni e colaboradores (2007) desenvolveram, a partir de

sequências parciais do gene de patogenicidade *hrp*, um conjunto de *primers* específicos para a rápida detecção de Xag em folhas sintomáticas; Kang e colaboradores (2009) detectaram a bactéria diretamente das sementes por meio da PCR utilizando *primers* específicos (Xag F1/Xag R1) desenhados a partir do gene *glycinecin A*. Ainda, Lee e colaboradores desenvolveram uma metodologia para detecção de espécies patogênicas de *Xanthomonas* spp. através do isolamento em meio seletivo (Xan-D) e pela construção de *primers* específicos a partir do gene *estA*.

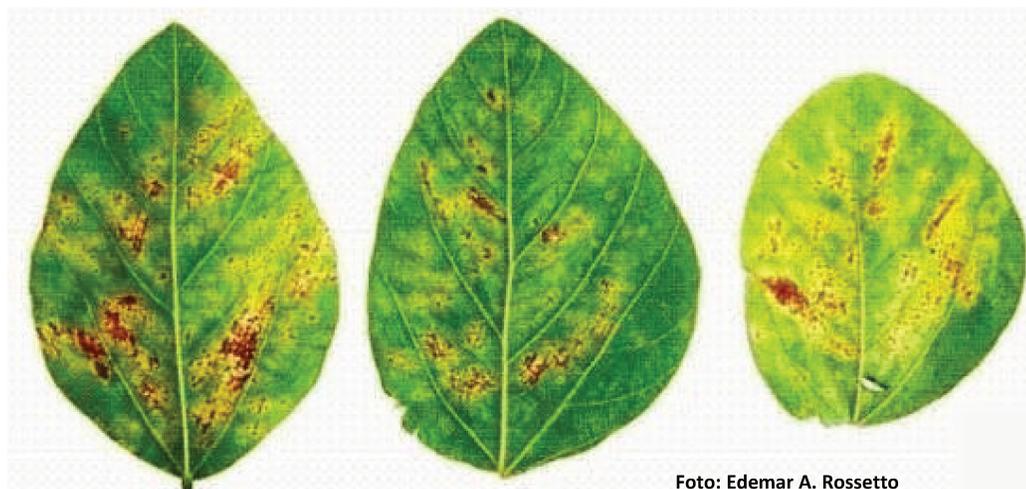


Foto: Edegar A. Rossetto

**Figura 3.** Folhas de soja com encharcamento nos tecidos, com formação de pústulas ao redor, circuncidadas por halo amarelo. Fonte: EMBRAPA SOJA, 2007.

## 2.4 Região espaçadora 16S-23S RNAr como marcador molecular na identificação de fitopatógenos

A região espaçadora 16S-23S RNAr, localizada entre genes ribossomais altamente conservados, é a mais estudada das duas regiões intergênicas transcritas (ITS), e varia significativamente quanto ao comprimento e sequência de nucleotídeos entre espécies e dentro de uma mesma espécie de bactéria. Assim, a variabilidade da região 16S-23S RNAr é espécie-específica e de múltiplas cópias dentro de qualquer ITS, podendo ocorrer dentro da própria bactéria (DINGMAN, 2012). Dependendo do grau de variação encontrado nessa região, o polimorfismo pode ser utilizado para distinção no nível de gênero, espécie (BARRY et al., 1991) ou linhagem (DOLZANI et al., 1994).

A análise da região espaçadora 16S-23S RNAr tem se mostrado uma abordagem promissora para a caracterização de bactérias, explorando a variação genética presente nessa região. Ela tem sido usada para desenvolver procedimentos de identificação rápida, fácil e precisa de espécies bacterianas (DINGMAN, 2009). Uma vez que o comprimento da região 16S-23S

RNAr varia entre as diferentes espécies de bactérias e uma única espécie pode possuir regiões ITS de diferentes tamanhos, a eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação dessa região produz padrões de bandas de DNA (*fingerprint*) que é único para cada espécie (MAS; GONZÁLEZ, 2011).

Na região espaçadora podem ser encontrados genes que codificam para tRNAs, que na maioria das bactérias são encontrados na forma de *clusters*, separados por uma curta região espaçadora, sendo que as variações encontradas nessa região são devido em parte ao número e tipo de genes de tRNA nela presentes (GURTLER; STANISICH, 1996).

Através da técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) desta região, foi possível a diferenciação em nível infra-específico de *Pseudomonas syringae*, indicando grande variabilidade destas sequências nesse grupo de fitopatógenos (MANCEAU; HORVAIS, 1997). Ainda, Kong e colaboradores (2005) realizaram estudos filogenéticos com linhagens pertencentes aos patovares de *P. savastanoi* e *P. syringae* utilizando-se sequências da região espaçadora 16S-23S RNAr. Nesse mesmo estudo, os resultados obtidos possibilitaram a diferenciação de *P. syringae* pv. *tagetis* e *P. syringae* pv. *helianthi* dos outros patovares analisados e também foi observada uma baixa diversidade genética entre linhagens de *P. syringae* pv. *tagetis*.

A região espaçadora 16S-23S RNAr também tem sido utilizada em diversos estudos com o gênero *Xanthomonas*. Honeycutt e colaboradores (1995) desenvolveram um par de *primers* que detectou variações no tamanho das sequências desta região em algumas espécies do gênero *Xanthomonas* incluindo *X. albilineans*, indicando que este marcador molecular pode ser utilizado para o diagnóstico dessas espécies. Destéfano e Rodrigues Neto (2002) realizaram um estudo com linhagens de *Xanthomonas* patogênicas ao citros utilizando a técnica de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S RNAr e obtiveram a diferenciação da espécie *X. citri*, agente causal do cancro cítrico e praga quarentenária A2, das espécies *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, agentes causais da cancriose C e mancha bacteriana das folhas dos citros, respectivamente. Os resultados obtidos nesse trabalho foram de grande importância, uma vez que as espécies *X. citri* e *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* causam sintomas bastante semelhantes e a correta identificação destes patógenos torna-se fundamental para que sejam executadas medidas de controle adequadas. Ainda, Destéfano e colaboradores (2003) utilizaram essa mesma técnica com o objetivo de diferenciar quatro espécies do gênero *Xanthomonas* patogênicas a cana de açúcar. Os autores obtiveram a diferenciação das espécies *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, *X. vasicola* pv. *vasculorum*, *X. albilineans* e *X. sacchari*. Nesse estudo também foi possível

identificar linhagens de *X. campestris* pv. indeterminado e *Xanthomonas* sp. como pertencentes às espécies *X. axonopodis* pv. *vasculorum* e *Xanthomonas sacchari*, respectivamente. A técnica de PCR-RFLP do gene *rpoB* permitiu também a clara diferenciação de espécies de *Xanthomonas*, principalmente aquelas que afetam a mesma planta hospedeira, tais como *X. albilineans* e *X. sacchari*, patogênicas à cana de açúcar; *X. cucurbitae* e *X. melonis*, que causam doença em melão; e *X. gardneri*, *X. vesicatoria* e *X. euvesicatoria*/*X. perforans*, patogênicas ao tomate ( FERREIRA-TONIN et al., 2012).

## **2.5. Detecção de fitobactérias em sementes**

A semente é um dos principais insumos da agricultura moderna, sendo que cerca de 90% dos alimentos são produzidos através delas. Todas as espécies cultivadas propagadas por sementes apresentam doenças como um fator responsável pela redução no rendimento ou aumento do custo de produção. Estas podem ser evitadas ou minimizadas pela utilização de sementes sadias e/ou tratadas (MENTEN, 1991a).

A sanidade das sementes foi totalmente negligenciada durante muito tempo, porém, atualmente todos os setores envolvidos na indústria reconhecem que a qualidade das sementes também inclui a incidência de patógenos (MENTEN, 1991a). A preocupação com a utilização de sementes infestadas/infectadas ou contaminadas não reside apenas nos danos diretos que isso pode causar à cultura, mas também nas consequências deste fato, considerando-se a possível ocorrência de uma epidemia (MACHADO, 1987).

Potencialmente, todos os organismos fitopatogênicos podem ser transportados pelas sementes, embora a transmissão de inúmeros deles, por esse meio, não seja bem conhecida (MACHADO, 1987). Segundo Baker (1972), o transporte de patógenos por sementes pode ser realizado de três modos: misturado com a semente (parte da fração impura do lote), aderido passivamente à superfície da semente ou presente em seu interior. Destes, a presença do inóculo no interior da semente é considerada a maneira de transporte mais comumente utilizada pelos fitopatógenos. Vale ressaltar que o patógeno pode estar simultaneamente presente na semente nas três condições descritas. O cultivo de sementes contaminadas em mistura com sementes sadias é um dos meios mais eficientes de se introduzir ou acumular patógenos em áreas novas ou tradicionais de cultivo. Tal eficiência está relacionada ao fato de que sementes contendo patógenos constituem o foco primário de infecção na fase inicial da cultura, pois não são facilmente reconhecidas em um lote e, por conseguinte, acabam sendo distribuídas aleatoriamente

no campo (MACHADO, 1987; NEEGAARD, 1977). Nestas circunstâncias, os testes de sanidade de sementes têm como fundamento fazer com que os patógenos, uma vez associados a essas estruturas, sejam direta ou indiretamente evidenciados, permitindo ao analista a sua identificação rápida e segura. Desse modo, o uso de sementes comprovadamente sadias é uma forma simples, segura e econômica de se evitar a ocorrência de diversas enfermidades no campo. Assim, a produção, a avaliação e a subsequente utilização de sementes livres do patógeno são medidas importantes para o controle de diversas doenças bacterianas (SCHAAD; DONALDSON, 1980).

Na literatura são descritas as seguintes metodologias de detecção: análise de sintomas diretamente nas sementes (exame visual de sementes a olho nu ou com auxílio de lupa ou microscópio), *grow out*, inoculação em plantas indicadoras, isolamento de bactérias em meios seletivos ou semi seletivos e técnicas de isolamento direto em meio de cultura sem seletividade, exame microscópico das células bacterianas, bacteriófagos, testes bioquímicos e fisiológicos, testes de patogenicidade, testes sorológicos (imunoflorêscencia – direta, indireta e citometria de fluxo), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent*); IDGA (imunodifusão em gel de ágar), reação de precipitação, *imunoblot*, *Western Blot*, e técnicas moleculares como PCR, PCR Multiplex, RAPD, *Real Time PCR* e Chips DNA – DNA *arrays* (RODRIGUES NETO, 1998; DENARDIN et al., 2004).

Estas técnicas são utilizadas isoladas ou combinadas e variam quanto ao custo, ao tempo para a obtenção de resultados, ao espaço físico, aos equipamentos necessários, ao grau de sensibilidade, especificidade, precisão, robustez, interpretação de resultados e à possibilidade de serem utilizadas em testes de rotina (SAETTLER et al., 1989; CHITARRA, 2001; ROMEIRO; RODRIGUES NETO, 2001; DENARDIN; MOURA; MENTEN, 2004). Não existe, portanto, um método padronizado e que atenda a diferentes necessidades. A escolha do método depende de vários fatores e, basicamente, será necessário adaptá-lo para cada sistema biológico em estudo (KRUPPA, 1993; SAETTLER et al., 1995; SCHAAD et al., 2001; ROMEIRO, 2001;). Schaad e colaboradores (2001), cita que, de modo geral, três itens importantes devem ser considerados quando do desenvolvimento de metodologias para testes de sanidade em sementes: 1) extração ou detecção da bactéria; 2) identificação da espécie; e 3) determinação de sensibilidade e níveis de tolerância.

A Tabela 1 apresenta um resumo das principais técnicas utilizadas para detecção de fitopatógenos em sementes e suas características.

**Tabela 1.** Características gerais de testes de detecção em sementes incluindo tempo requerido para análise, sensibilidade, facilidade de aplicação, e especificidade, para detecção de fungos, bactérias e vírus.

Técnica	Tempo requerido	Sensibilidade	Facilidade de aplicação	Especificidade
Inspeção visual	5-10 min	Baixa	Simples e barata (necessita experiência)	Baixa
Meios semi seletivos	2-14 dias	Moderada	Simples e barata	Baixa-moderada
<i>Grow-out</i>	2-3 semanas	Baixa	Simples, barata e robusta	Baixa
Sorologia	2-4 h	Moderada-alta	Simples, moderadamente cara e robusta	Moderada-alta
Extração convencional de DNA e PCR	5-6 h	Alta	Complicada; fácil interpretação, cara	Muito alta
BIO-PCR	2-3 dias	Muito alta	Complicada, cara	Muito alta
RT-PCR ( PCR em tempo real)	40-60 min	Muito alta	Complicada, cara	Muito alta
Micro-chips de DNA	6 h	Muito alta	Complicada, muito cara	Muito alta

Fonte: Adaptado de Walcott (2003).

### 2.5.1 Métodos convencionais

Anteriormente ao advento da biologia molecular e suas ferramentas, os métodos convencionais representavam a única alternativa de diagnóstico de fitobactérias em sementes. Muitos deles apresentam algumas limitações no que se refere à sensibilidade e especificidade. Contudo, quando se deseja detectar e/ou quantificar fitobactérias em sementes é preciso lembrar que a superfície das sementes abriga uma flora microbiana muito diversa, o que pode comprometer e mascarar resultados. Há também que se lembrar que a percentagem de sementes veiculando fitobactérias em um lote é usualmente muito baixa, quase sempre menor que 1% (ROMEIRO, 2001; SAETTLER, 1995), e sementes às quais fitobactérias estão associadas não costumam exibir sintomas visuais distintos (ROMEIRO, 2001).

Os meios de cultura seletivos são valiosas ferramentas em fitobacteriologia, para o diagnóstico de doenças, estudos epidemiológicos e de patologia de sementes (KRUPPA, 1993). No entanto, o termo “semi-seletivo” é mais adequado, pois dificilmente um meio é inteiramente seletivo. Os meios semi-seletivos são definidos como um meio de cultura empregado para suprimir ou prevenir o crescimento de um grupo de organismos, enquanto permite o crescimento de outro grupo, quando presentes na mesma microflora (KLEMENT et al., 1990). Os dois principais critérios para avaliação de um meio semi-seletivo são a sua eficiência na detecção e sua seletividade (KLEMENT et al., 1990). A seletividade dos meios de cultura semi-seletivos

pode ser obtida utilizando-se fontes específicas de carbono e nitrogênio, as quais podem estimular o crescimento de uma determinada espécie e inibir outra; ou quando as enzimas bacterianas reagem com os constituintes do meio de cultura e propiciam uma distinção cultural entre duas espécies que antes pareciam similares. A adição de substâncias antibióticas ao meio de cultura também é um artifício que visa reduzir o número de contaminantes e favorecer o desenvolvimento da espécie desejada (McGUIRE et al., 1986).

Tratando-se de sementes, o isolamento em meio de cultura para detecção de algumas espécies de bactérias, através de métodos convencionais, é usado em alguns casos (TAYLOR, 1970). Existem meios de cultura de rotina, tradicionalmente utilizados para o cultivo de fitobactérias, que proporcionam boas condições nutricionais para suportar o crescimento da maioria delas, como o meio 523 de Kado e Heskett (1970), caldo nutriente-glucose-ágar ou NGA (KLEMENT et al., 1990), NYGA (SCHAAD, 1988), dentre outros. Esses meios são de uso geral, não tendo sido desenvolvidos especificamente para um determinado gênero ou espécie de fitobactéria.

Além disso, existem os métodos de análise de sintomas diretamente nas sementes, tais como exame visual de sementes a olho nu ou com auxílio de lupa ou microscópio. Ao realizar a inspeção visual direta de sementes secas, não incubadas, considera-se o seu aspecto geral, com relação à ocorrência de deformações e descolorações (VIEIRA et al., 2006). As amostras de trabalho são examinadas a olho nu ou com um microscópio estereoscópico (lupa com 50-60x aumento) para a detecção de material inerte ou sinais dos patógenos aderidos ou misturados às sementes (VIEIRA; RAVA, 2000). Este método permite obter uma rápida informação sobre o estado sanitário das sementes, não requerendo equipamentos sofisticados, e pode ser útil somente para patógenos causadores de sintomas visíveis externamente. Entretanto, essa abordagem apresenta limitações quanto à sensibilidade e à segurança para ser utilizada em rotina e não oferece informações sobre a viabilidade do patógeno (VALARINI; MENTEN 1991).

### **2.5.2 Métodos moleculares**

As técnicas moleculares constituem uma ferramenta de grande importância na detecção e identificação de bactérias de forma rápida e segura, uma vez que oferecem vantagens quando comparada aos métodos tradicionais de diagnose, como alta sensibilidade e especificidade. Dentre as técnicas moleculares mais utilizadas, destacam-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, além do uso de chips de DNA (*DNA arrays*) (SAETTLER, 1995).

Detectar seqüências de DNA via PCR, é um método rápido, específico e sensível. A técnica oferece maiores vantagens para diagnosticar patógenos de plantas se comparadas àqueles procedimentos tradicionais, dispensando, inclusive o seu cultivo em meio de cultura. A PCR pode ter uma seletividade baixa ou alta, dependendo dos *primers*, podendo se detectar um único patógeno ou vários membros de um grupo de patógenos relacionados (HARTUNG; DANIEL; PRUVOST, 1993). Além disso, essa técnica é rápida, acurada e versátil na identificação de bactérias fitopatogênicas (OH et al., 1999) e, em alguns casos, pode detectar bactérias sem a obtenção de cultura pura (SCHAAD et al., 1995; REEVES, 1997; MADDOX, 1998).

Atualmente, a PCR é utilizada como técnica de rotina em laboratórios de diagnose de muitas doenças de plantas (SCHAAD et al., 2001), incluindo espécies de reduzida concentração populacional em materiais propagativos assintomáticos, tais como *Pectobacterium atrosepticum* (sinônimo *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) responsável pela podridão mole em tubérculos de batata (VAN DER WOLF et al., 1996) e *Xylella fastidiosa*, responsável pela clorose variegada dos citros (CVC) em borbulhas de laranjeiras contaminadas (COLETTA FILHO et al., 2000).

Existe, ainda, a possibilidade de se combinar técnicas para a detecção de bactérias, como é o caso da BIO-PCR, uma técnica relatada por Schaad e colaboradores (1995) que combina amplificação biológica e enzimática, pelo uso do meio seletivo e técnica da PCR, respectivamente. Esta técnica foi utilizada para detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola* em extrato de sementes de feijão, em que foram feitas as análises das colônias bacterianas primeiramente obtidas em meio seletivo, seguidas de lavagens das placas produzindo uma suspensão e posterior amplificação do segmento da região do gene *tox*. A partir daí, muitos outros trabalhos foram desenvolvidos utilizando-se esta mesma técnica para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (KOBAYASTI, 2002), *Xanthomonas albilineans* (WANG et al., 1999), *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (SCHAAD et al., 2001; SONG et al., 2004), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (SAKTHIEVEL; MORTENSEN; MATHUR, 2001). A vantagem da técnica de BIO-PCR sobre a técnica de PCR inclui a eliminação de falsos positivos, resultantes da presença de células não viáveis associadas às sementes, e de falsos negativos, devido aos inibidores potenciais da PCR presentes em extratos de sementes, aumentando, assim, a sensibilidade da detecção.

Manulis e colaboradores (1998) compararam as técnicas de BIO-PCR e PCR modificada com a PCR clássica para detectar a presença de *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*, formadora de galhas em plantas de *Gypsophila paniculata*, utilizando *primers* específicos. A bactéria pode ser detectada pela PCR modificada e pela BIO-PCR em plantas sem sintomas sete dias após a

inoculação, sendo estas mais sensíveis que a PCR clássica. Wang e colaboradores (1999) compararam a eficiência e a confiabilidade da PCR clássica e da BIO-PCR com o isolamento em meio semi-seletivo M-XAM para *Xanthomonas albilineans*, agente da escaldadura da folha da cana-de-açúcar. O meio semi-seletivo e a BIO-PCR foram consistentemente mais sensíveis que *dot immunobinding assay* (DIBA), ELISA ou PCR clássica. Por meio da PCR clássica foram detectados  $2 \times 10^4$  UFC/mL, enquanto que por BIO-PCR o resultado foi 100 vezes mais sensível. A utilização de meio semi-seletivo, normalmente, requer sete dias para a identificação da bactéria, enquanto a BIO-PCR requer somente quatro dias e tem a vantagem de não requerer testes de patogenicidade para a confirmação das identidades das colônias.

Em 2005, Berg e colaboradores descreveram o conjunto de *primers* específicos DLH-120/DLH-125 para a identificação de isolados de *Xanthomonas* patogênicas às crucíferas. Estes *primers* foram desenhados a partir de sequências do gene *hrpF* (*hypersensitive response and pathogenicity F*), uma vez que esta porção do gene revelou baixa homologia em relação a sequências obtidas de outras espécies como *X. citri* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. oryzae* pv. *oryzae*. Este conjunto de *primers* permitiu a amplificação de um produto de 619 pb diretamente a partir de colônias ou de extratos de DNA de *X. campestris* (Xc). Os autores afirmam que o ensaio de PCR para o gene *hrpF* permitiu a detecção de isolados de *X. campestris* capazes de provocar sintomas de escurecimento de vasos, manchas ou crestamento foliares, quer sejam provocados por diferentes patovares ou não. Por outro lado, os mesmos autores verificaram que a maioria dos isolados de Xc para os quais não foi possível a amplificação do gene, apresentava incapacidade de produzir doença, quando inoculados em várias espécies hospedeiras, o que indica que o gene *hrpF* está diretamente envolvido no processo de patogênese, sendo um alvo preferencial para a detecção destes micro-organismos.

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

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Desenvolvimento de metodologia para detecção e identificação de fitobactérias em sementes de soja.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- desenvolvimento de *primers* espécie-específicos para *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*;
- validação da metodologia desenvolvida por meio de testes com sementes de soja infectadas artificialmente.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Linhagens**

As linhagens a serem utilizadas nesse estudo foram cedidas pela Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas, SP (Tabela 2).

**Tabela 2.** Linhagens utilizadas no estudo.

Bactérias	IBSBF	Outras coleções	Hospedeiro	Procedência
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> .	1290 <sup>P</sup>	ICMP 2584	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hungria
	2205	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	desconhecida
	2868	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Avaré-SP
	2869	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Avaré-SP
	2870	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Avaré-SP
	2871	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Avaré-SP
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	1462 <sup>P</sup>	ICMP 2189	<i>Glycine max</i>	Nova Zelândia
	355	-	<i>Glycine max</i>	Viçosa-MG
	2685	-	<i>Glycine max</i>	Hungria
	3033	-	<i>Glycine max</i>	Altinópolis-SP
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	2440 <sup>P</sup>	NCPPB 554	<i>Glycine max</i>	Sudão
	327	-	<i>Glycine max</i>	Campinas-SP
	333	-	<i>Glycine max</i>	Campinas-SP
	2447	UnB 1266	<i>Glycine max</i>	Brasília-DF
	2448	UnB 1267	<i>Glycine max</i>	Brasília-DF

<sup>P</sup> linhagem Patotipo; IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico); ICMP (*International Collection of Micro-organisms from Plants*, New Zealand); NCPPB (*National Collection of Plant Pathogenic Bacteria*, United Kingdom); UnB (Universidade de Brasília).

#### 4.2. Reativação de culturas e condições de cultivo

As linhagens de Cff, Psg e Xag preservadas por liofilização foram reidratadas com água destilada esterilizada durante 1 hora e posteriormente, uma alíquota de 200 µL foi semeada em meio de cultivo NA- Nutrient Ágar (extrato de carne 3,0 g; peptona 5,0 g; cloreto de sódio 5,0 g e ágar 15 g, q.s.p. 1000 mL) e incubada a 28 °C por 48 h. As linhagens foram mantidas no mesmo meio de cultura.

#### 4.3. Extração de DNA genômico

As culturas foram submetidas à extração de DNA genômico de acordo com a metodologia descrita por Pitcher e colaboradores (1989). Cerca de 100 mg de biomassa das bactéria foram transferidos para 5 mL de meio NB (Nutrient Broth - NA sem adição de ágar) e incubadas a 28 °C por 16 horas, sob agitação constante de 150 rpm. A cultura líquida foi submetida à

centrifugação, as células foram suspensas em 100 µL de solução de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris; 1 mM EDTA) contendo 2 mg/mL de lisozima, homogeneizadas com a utilização de agitador de tubos e incubadas a 37 °C por uma hora. Após esse período, foram adicionados 500 µL de solução de tiocianato de guanidina 5 M e a mistura foi agitada brevemente. Em seguida, adicionou-se 250 µL de acetato de amônio 7,5 M misturando-se por inversão e incubando-se as amostras no gelo por dez minutos. Adicionou-se, posteriormente, 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) e após agitação manual vigorosa, a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos sendo a fase aquosa transferida para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 0,54 volume de isopropanol (cerca de 450 µL), a solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 2 minutos e o sedimento foi lavado três vezes com etanol 70%, aplicando-se pulsos curtos de centrifugação. O sedimento foi seco à temperatura ambiente e depois suspenso em 200 µL de tampão TE pH 8,0. Adicionou-se 2 µL de RNase (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 37 °C por uma hora. Posteriormente, adicionou-se 40 µL de LiCl 4 M e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), cerca de 240 µL. Após centrifugação de 10 min a 12.000 rpm, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto (cerca de 400 µL) e o sedimento lavado duas vezes com etanol 70%. Após secar em temperatura ambiente, o DNA foi suspenso em 20 a 50 µL de água ultra pura e estocado a 20 °C negativos.

A quantificação do DNA das amostras foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,6% em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato/0,001 M EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação Alpha Innotech 2200.

#### **4. 4. *Primers* e condições de amplificação da região espaçadora 16S-23S RNAr**

O par de *primers* utilizado para a amplificação da região espaçadora 16S-23S foi pHr (5' TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT 3') (MASSOL-DEYA et al., 1995) e p322-anti (5' GGT TCT TTT CAC CTT TCC CTC 3') (HONEYCUTT et al., 1995).

A quantidade de DNA utilizada foi de aproximadamente 50 a 100 ng de DNA genômico em reações de 25 µL contendo 2,0 U de Taq polimerase; tampão da enzima Taq 1X; 1X BSA (*Bovine Serum Albumine*) (10 mg/mL); 0,2 µM de uma mistura de dNTPs; e 0,4 µM de cada *primer*. O programa de amplificação das amostras consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C/2 min.; seguido de 30 ciclos a 94 °C/1 min.; 60 °C/1 min. e 72 °C/3 min; e um ciclo a 72 °C/5 min. (extensão final). As amplificações foram conduzidas em termociclador da marca Perkin Elmer modelo 9700. A observação dos produtos de amplificação obtidos foi realizada

através de eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato/0,001 M EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados em fonte de luz U.V. e fotografados em sistema digital Alpha Innotech 2200.

#### **4.5. Análise de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) da região espaçadora 16S-23S RNAr**

A região espaçadora foi utilizada como marcador molecular para a diferenciação de *C flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), *P savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) e *X axonopodis* pv. *glycines* (Xag). Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à digestão enzimática com as seguintes endonucleases: *Hae* III, *Dde* I, *Hpa* II, *Mbo* I, *Rsa* I e *Alu* I. Nas reações foram utilizados de 5 a 7 µL dos produtos de amplificação contendo 5U da enzima por reação. As digestões foram conduzidas de acordo com instruções do fabricante (Fermentas). Os perfis de restrição obtidos foram analisados por meio de eletroforese em géis de agarose 3%, corados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados e fotografados em sistema digital Alpha Innotech 2200.

#### **4.6. Sequenciamento da região espaçadora 16S-23S RNAr e desenho de *primers***

As reações para sequenciamento foram efetuadas utilizando-se o kit Big Dye (Applied Biosystems) e empregando-se os mesmos *primers* da amplificação por PCR (item 4.4). As amostras de DNA foram secas, suspensas em tampão apropriado e submetidas à eletroforese em sequenciador automático, marca Applied Biosystems-Hitachi, modelo ABI Prism 3700 DNA Analyzer. O sequenciamento foi realizado em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas - CBMEG/UNICAMP. Posteriormente, as sequências foram alinhadas utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999) e alinhadas com o uso do programa ClustalW (THOMPSON et al., 1997).

Com base nas diferenças observadas nas sequências da região espaçadora 16S-23S DNAr, foram desenhados dois *primers* específicos para cada gênero das bactérias utilizadas no estudo, num total de seis *primers*. Todos os *primers* foram desenhados no sentido *forward* (F), já que as sequências analisadas não apresentaram diferenças suficientes para que fossem desenhados *primers* no sentido *reverse* (R), sendo utilizado o *primer* p322anti, já descrito anteriormente, como *primer reverse* para todas as amplificações.

Os testes de amplificação para os novos *primers* foram realizados preparando-se reações de 25 µL, contendo 200 ng de DNA cromossômico da bactéria de interesse, 1X tampão da

enzima Taq DNA polimerase (Fermentas) e 1X BSA (*Bovine Serum Albumine*) (10 mg/mL). As concentrações dos reagentes e os programas de amplificação foram padronizados para todas as linhagens utilizadas no estudo, através de experimentos de gradiente de temperatura e variação nas quantidades dos reagentes utilizados nas reações. Dos seis *primers* desenhados, os três que apresentaram melhores resultados foram selecionados para a continuidade dos experimentos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Pares de *primers*, sequências dos *primers*, tamanho dos fragmentos (em pares de bases, pb) e programas de amplificação utilizados nos experimentos.

<i>Primers</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'→3')	Fragmento (pb)	Condições de amplificação
Curto2F/p322 anti	CCAGGCTTCCTACTGTCA	675	95 °C/2 min; 30X (94 °C/1 min, 62 °C/1 min, 72 °C/3 min); 72 °C/5 min
Psgl/p322 anti	TCGTCTTCACAGTATAAC	500	95 °C/2 min; 30X (94 °C/1 min, 57 °C/30 seg, 72 °C/2 min); 72 °C/5 min
Xanth2F/p322 anti	GAGTCCCTAAATAATTGA	545	95 °C/2 min; 30X (94 °C/1 min, 62 °C/30 seg, 72 °C/2 min); 72 °C/5 min

As sequências dos *primers* desenhados foram testadas contra sequências já disponíveis em banco de dados especializados como RDP (Ribosomal Database Project) e GenBank a fim de se verificar a possibilidade de anelamento com sequências não-alvo.

#### 4.7. Níveis de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se os *primers* desenvolvidos

O grau de sensibilidade da técnica de PCR empregando-se os *primers* desenhados foi determinado por meio de testes com culturas puras utilizando-se suspensões bacterianas de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (IBSBF 1290<sup>P</sup>), *P. savastanoi* pv. *glycinea* (IBSBF 1462<sup>P</sup>) e *X. axonopodis* pv. *glycines* (IBSBF 2440<sup>P</sup>), e com diluições dos respectivos DNAs genômicos.

No caso das culturas puras, foi utilizada uma suspensão bacteriana obtida após cultivo em meio Nutriente líquido por 16 horas e diluída em série em água destilada esterilizada até 10<sup>-7</sup>. Alíquotas de 5 µL dessas diluições foram utilizadas em reações de PCR empregando-se os *primers* desenhados. Paralelamente, alíquotas de 5 µL das diluições de 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-7</sup> foram acrescidas de 95 µL de água destilada esterilizada e semeadas em placas de Petri contendo meio NA para contagem do número de células presentes em cada alíquota.

Foram preparadas também diluições seriadas do DNA genômico das linhagens Patotipo utilizadas como controle positivo de amplificação: 200; 100; 10; 1; 0,1; 0,01 e 0,001 ng.

Os produtos da PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e fotografado em sistema digital Alpha Innotech 2200 (Alpha Innotech Corporation).

#### 4.8. Detecção de fitobactérias em sementes contaminadas artificialmente

Sementes de soja foram inoculadas artificialmente utilizando-se o método descrito por Valarini e Menten (1991), com modificações. Culturas puras de Psg, Xag e Cff foram obtidas em placas de Petri, em meio de cultura NA, após a incubação em estufa a 28 °C, por 48 h. Posteriormente, foram colocadas cinco sementes de soja por placa e mantidas sob agitação manual por alguns instantes, até que o inóculo envolvesse completamente as sementes. As sementes foram mantidas por 48 h em contato com as colônias bacterianas em estufa a 28 °C. Em seguida, as sementes foram retiradas do contato com o meio de cultura, colocadas sobre papel absorvente esterilizado e mantidas à temperatura ambiente por quatro dias para a secagem. Posteriormente, as sementes foram armazenadas em frascos de vidro com tampa de rosca e mantidas em geladeira até a utilização.

Para os experimentos de detecção com Psg, Xag ou Cff em amostras de sementes de soja, foram utilizadas sub-amostras com 1% de infecção (duas sementes infectadas em 198 sementes saudáveis); 0,5% de infecção (duas sementes infectadas em 398 sementes saudáveis) e 0,1% de infecção (uma semente infectada em 999 sementes saudáveis). Nos dois primeiros tratamentos, acrescentou-se 150 mL de água destilada esterilizada, enquanto que para o terceiro tratamento, acrescentou-se 300 mL. Em seguida, os recipientes foram acondicionados em geladeira durante a noite (por aproximadamente 18 h). Após esse período, foram acrescentados 30 µL de Tween 20 a 0,2% (v/v) para promover desprendimento das células que ainda pudessem estar aderidas à superfície das sementes. Os frascos foram submetidos a uma leve agitação durante 30 minutos em incubadora tipo orbital, à temperatura ambiente. As suspensões obtidas foram filtradas em papel filtro e transferidas para tubos de 15 mL, os quais foram centrifugados a 5.000 rpm por 30 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados suspensos em 1,0 mL de tampão TE pH 8,0.

Para o processo de enriquecimento da cultura (BIO-PCR), foi retirada uma alíquota de 200 µL do extrato e incubado em 500 µL de meio líquido semi-seletivo (fosfato de potássio monobásico 1,3 g; fosfato de potássio dibásico 1,7 g; sulfato de magnésio hidratado 0,1 g; cloreto de sódio 4,2 g; celobiose 2,0 g; extrato de levedo 1,0 g; 1,6 mL de cefalexina; q.s.p 500 mL) durante uma noite e mantido em agitador a temperatura ambiente.

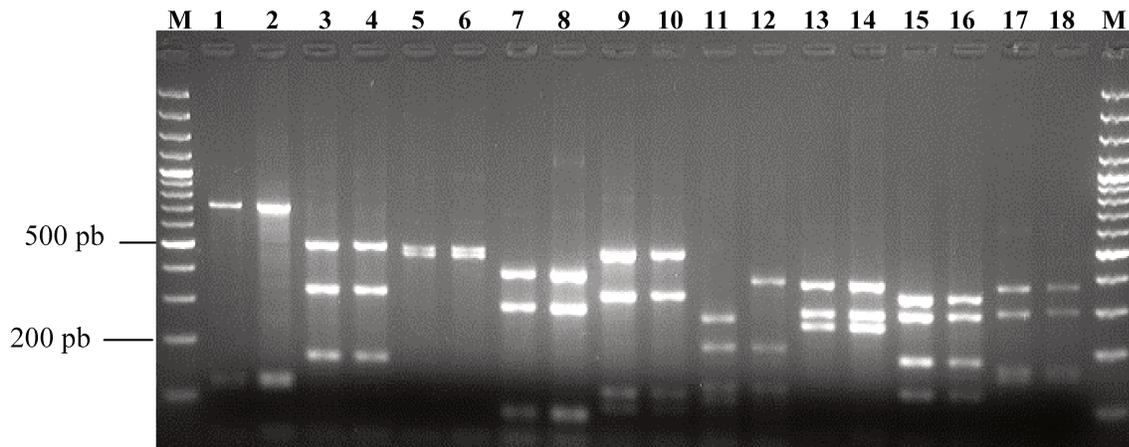
A detecção das fitobactérias foi efetuada por meio de ampliações utilizando-se os *primers* espécie-específicos desenhados a partir de alíquotas de 1; 2,5 e 5,0 µL das suspensões obtidas no processo de extração do patógeno das sementes e após o enriquecimento das culturas (BIO-PCR). As condições de amplificação utilizadas estão na Tabela 3. Os perfis obtidos foram

visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta e fotografado em sistema digital Alpha Innotech 2200.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) da região espaçadora 16S-23S RNAr

Os produtos obtidos através da amplificação por PCR da região espaçadora foram submetidos a digestões com as endonucleases *Mbo* I, *Rsa* I e *Alu* I (dados não apresentados) e *Hae* III, *Dde* I, *Hpa* II (Figura 4), gerando perfis de restrição diferentes para cada um dos gêneros analisados.



**Figura 4.** Digestão dos produtos de amplificação correspondentes à região espaçadora: (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); Linhagens de Xag: (1) IBSBF 2440<sup>P</sup>; (2) IBSBF 2448; (7) IBSBF 2440<sup>P</sup>; (8) IBSBF 2448; (13) IBSBF 2440<sup>P</sup>; (14) IBSBF 2448; Linhagens de Psg : (3) IBSBF 1462<sup>P</sup>; (4) IBSBF 355 ; (9) IBSBF 1462<sup>P</sup>; (10) IBSBF 355; (15) IBSBF 1462<sup>P</sup>; (16) IBSBF 355; Linhagens de Cff: (5) IBSBF 1290<sup>P</sup>; (6) IBSBF 2868; (11) IBSBF 1290<sup>P</sup>; (12) IBSBF 2868; (17) IBSBF 1290<sup>P</sup>; (18) IBSBF 2868.

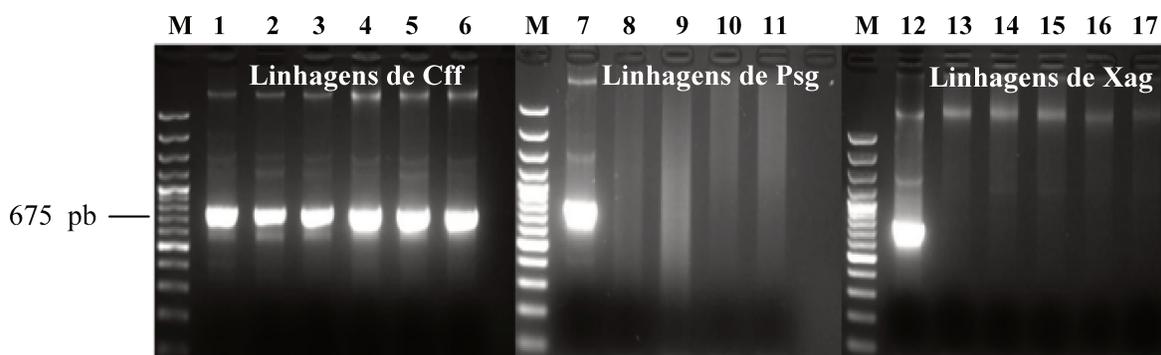
Nas digestões com *Hae* III, as linhagens de Xag apresentaram dois fragmentos de aproximadamente 750 pb e 120 pb; as linhagens de Psg apresentaram três fragmentos de aproximadamente 500 pb, 320 pb e 180 pb; e as linhagens de Cff apresentaram dois fragmentos de aproximadamente 500 pb e 480 pb. Nas digestões com a endonuclease *Dde* I as linhagens de Xag apresentaram dois fragmentos de aproximadamente 400 pb, 300 pb e dois fragmentos abaixo de 100 pb; as linhagens de Psg apresentaram quatro fragmentos de aproximadamente 450 pb, 320 pb, 120 pb e um abaixo de 100 pb; e as linhagens de Cff (IBSBF 1290<sup>P</sup> e IBSBF 2868) apresentaram variação no tamanho de um dos fragmentos obtidos, possivelmente devido a uma

diferença infra-específica. Nas digestões com a endonuclease *Hpa* II, as linhagens de Xag apresentaram três fragmentos de aproximadamente 390 pb, 300 pb e 270 pb; as linhagens de Psg apresentaram quatro fragmentos de aproximadamente 320 pb, 300 pb, 180 pb e 110 pb; e as linhagens de Cff apresentaram três fragmentos de aproximadamente 500 pb, 300 pb e 180 pb. Os resultados de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S RNAr mostraram que essa abordagem pode ser uma ferramenta importante na diferenciação das fitobactérias que afetam a soja.

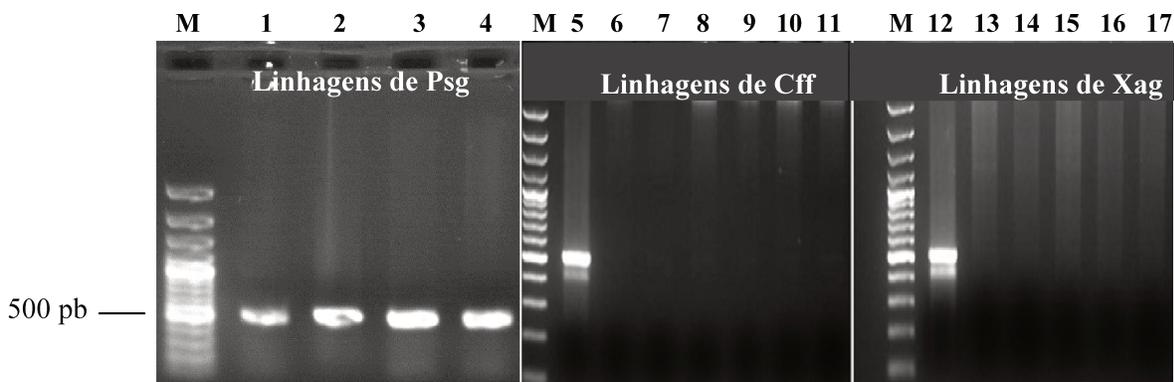
## 5.2 Desenho de *primers* espécie específicos e testes de especificidade

Os produtos da amplificação da região espaçadora 16S-23S RNAr foram sequenciados e suas sequências analisadas, as quais apresentaram diferenças em regiões que possibilitaram o desenho dos *primers* espécie-específicos. Todos os *primers* desenhados (Tabela 3) foram submetidos a experimentos de gradiente de temperatura variando de 58 °C a 70 °C, os quais apresentaram diferentes temperaturas de anelamento para cada gênero em questão.

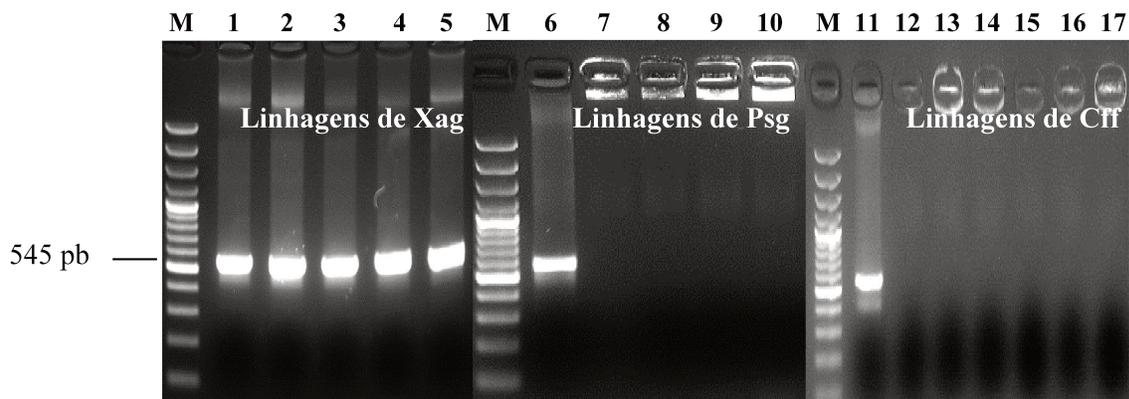
Cada conjunto de *primers* foi testado com DNAs das linhagens dos diferentes gêneros e o sinal positivo de amplificação somente foi observado nas linhagens do gênero correspondente, que resultou em fragmentos únicos com tamanhos aproximados de 675 pares de bases (pb) para Cff, 500 pb para Psg e 545 pb para Xag, como esperado, confirmando, assim, a especificidade dos respectivos *primers* (Figuras 5, 6 e 7).



**Figura 5.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Curto2F/p322 anti. (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) (7) (12) IBSBF 1290<sup>P</sup>– Controle positivo; Linhagens de Cff: (2) IBSBF 2205; (3) IBSBF 2868; (4) IBSBF 2869; (5) IBSBF 2870; (6) IBSBF 2871; Linhagens de Psg: (8) IBSBF 1462<sup>P</sup>; (9) IBSBF 2685; (10) IBSBF 3033; (11) IBSBF 355; Linhagens de Xag: (13) IBSBF 2440<sup>P</sup>; (14) IBSBF 2447; (15) IBSBF 2448; (16) IBSBF 327; (17) IBSBF 333.



**Figura 6.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Psgl/p322 anti. (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) (5) (12) IBSBF 1462<sup>P</sup> – Controle positivo; Linhagens de Psg: (2) IBSBF 2685; (3) IBSBF 355; (4) IBSBF 3033; Linhagens de Cff: (6) IBSBF 1290<sup>P</sup>; (7) IBSBF 2205; (8) IBSBF 2868; (9) IBSBF 2869; (10) IBSBF 2870; (11) IBSBF 2871; Linhagens de Xag: (13) IBSBF 2440<sup>P</sup>; (14) IBSBF 2447; (15) IBSBF 2448; (16) IBSBF 327; (17) IBSBF 333.

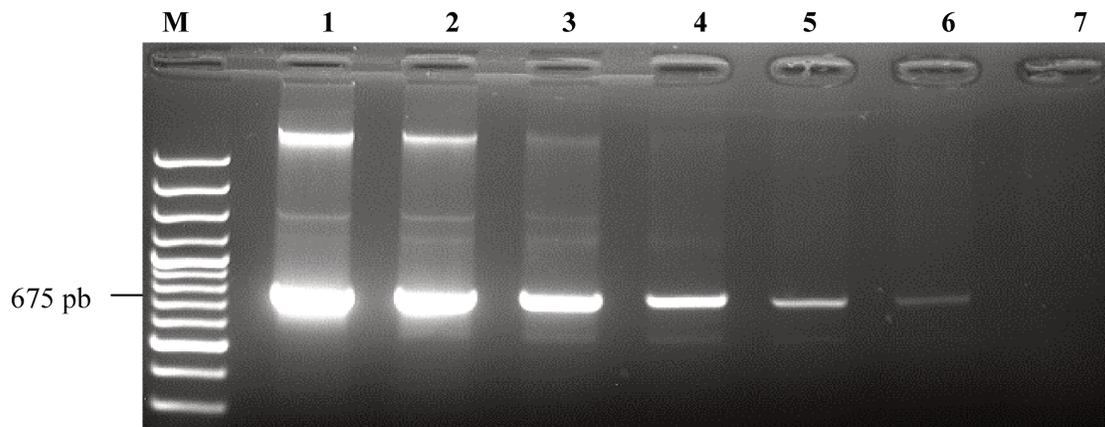


**Figura 7.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Xanth2F/p322 anti. (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); Linhagens de Xag: (1) (6) (11) IBSBF 2440<sup>P</sup> – Controle positivo; (2) IBSBF 2447; (3) IBSBF 2448; (4) IBSBF 327; (5) IBSBF 333; Linhagens de Psg: (7) IBSBF 1462<sup>P</sup>; (8) IBSBF 2685; (9) IBSBF 355; (10) IBSBF 3033; Linhagens de Cff (12) IBSBF 1290<sup>P</sup>; (13) IBSBF 2205; (14) IBSBF 2868; (15) IBSBF 2869; (16) IBSBF 2870; (17) IBSBF 2871.

O desenvolvimento de *primers* espécie-específicos tem se mostrado de grande importância para a detecção de bactérias fitopatogênicas (LORETI; GALLELLI, 2001). No presente estudo, analisando-se sequências da região espaçadora 16S-23S RNAr de Cff, Psg e Xag, foi possível o desenho dos *primers* Psgl, Curto2F e Xanth2F no sentido *forward*, que associados ao *primer reverse* p322anti em experimentos de amplificação, mostraram-se específicos para as espécie *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *X. axonopodis* pv. *glycines* respectivamente.

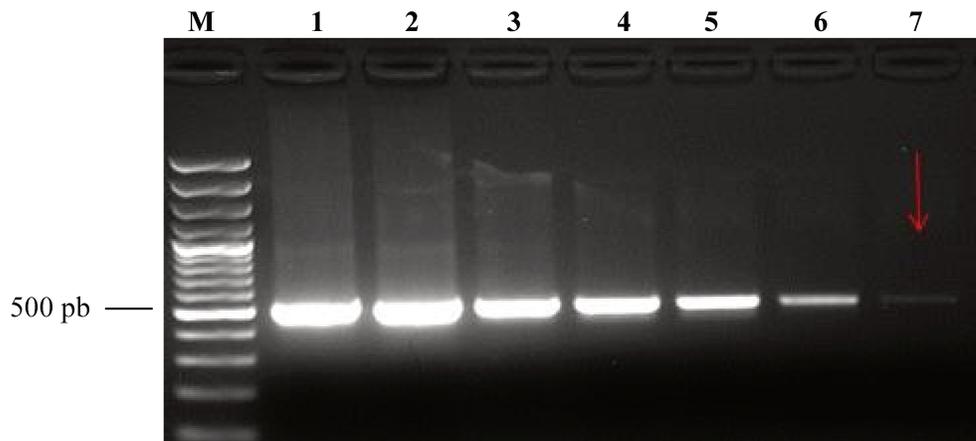
### 5.3 Níveis de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se os *primers* desenvolvidos

Testes para se determinar o nível de sensibilidade da técnica de PCR foram efetuados empregando-se os pares de *primers* específicos desenhados para cada gênero de fitobactérias, em reações com diferentes quantidades de DNA, variando de 200 ng a 0,001 ng. Para o par de *primers* Curto2F/p322anti foi possível observar o sinal positivo de amplificação do fragmento de 675 pb em até 0,01 ng de DNA genômico de Cff (Figura 8, canaleta 6).



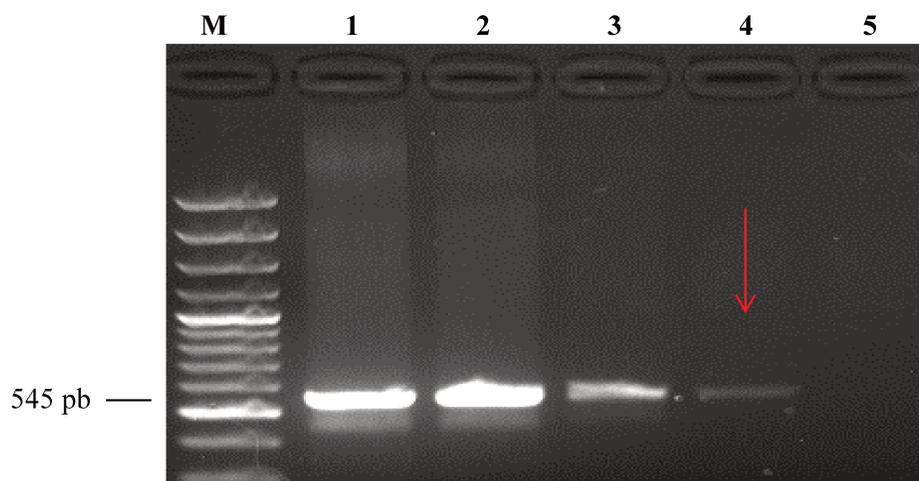
**Figura 8.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Curto2F/p322anti com diferentes quantidades de DNA da linhagem de Cff (IBSBF 1290<sup>P</sup>). (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) 200 ng; (2) 100 ng; (3) 10 ng; (4) 1 ng; (5) 0,1 ng; (6) 0,01 ng; (7) 0,001 ng.

Nos testes com o par de *primers* Psgl/p322anti, foi possível observar sinal positivo de amplificação do fragmento esperado de 500 pb em quantidade equivalente a 1 pg de DNA genômico (Figura 9, canaleta 7).



**Figura 9.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Psgl/p322anti com diferentes quantidades de DNA da linhagem de Psg (IBSBF 1462<sup>P</sup>). (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) 200 ng; (2) 100 ng; (3) 10 ng; (4) 1 ng; (5) 0,1 ng; (6) 0,01 ng (7) 0,001 ng.

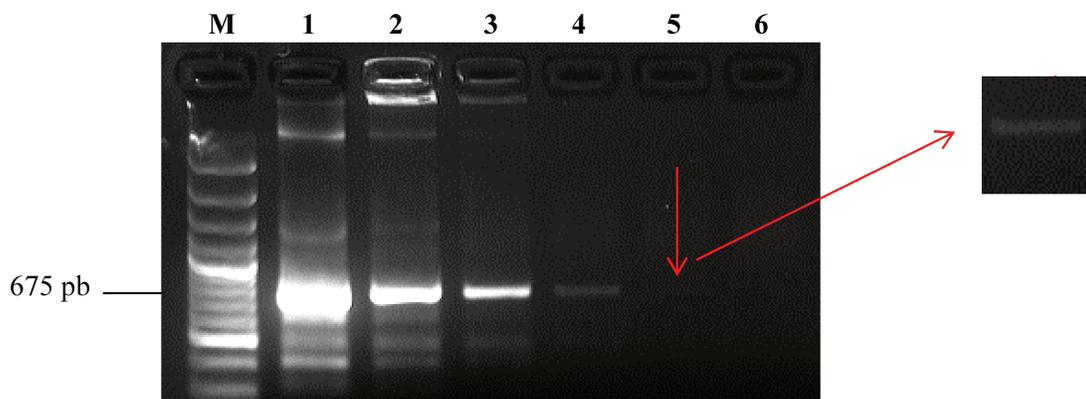
O nível de sensibilidade da técnica de PCR utilizando-se o par de *primers* Xanth2F/p322anti foi de 1 ng de DNA genômico, onde foi possível observar o sinal positivo de amplificação do fragmento de 545 pb (Figura 10, canaleta 4).



**Figura 10.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Xanth2F/p322anti com diferentes quantidades de DNA da linhagem de Xag (IBSBF 2440<sup>P</sup>). (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) 200 ng; (2) 100 ng; (3) 10 ng; (4) 1 ng; (5) 0,1 ng.

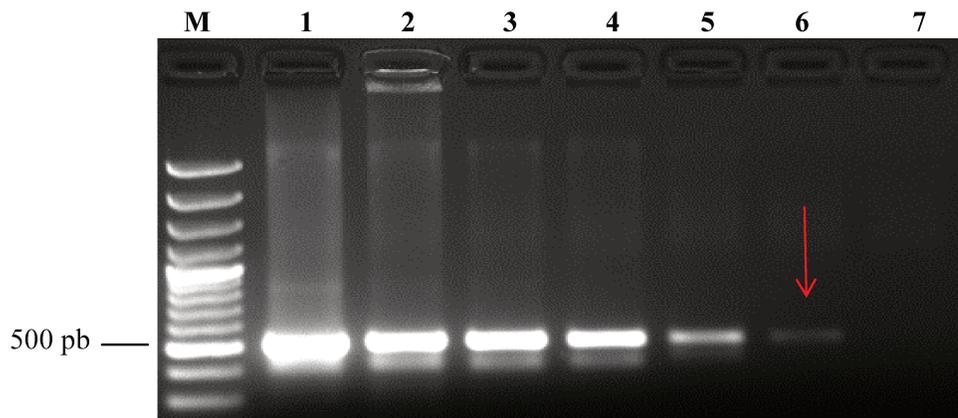
Nos ensaios para avaliação do grau de sensibilidade da técnica de PCR, por meio de testes com cultura pura de cada linhagem Patotipo, a contagem das colônias em placa foi realizada em três ou quatro dias após a semeadura.

Nos testes com o par de *primers* Curto2F/p322anti, foi possível observar o sinal positivo de amplificação do fragmento de 675 pb até a concentração de  $5 \times 10^3$  UFC/PCR, como mostra a Figura 11 (canaleta 5).



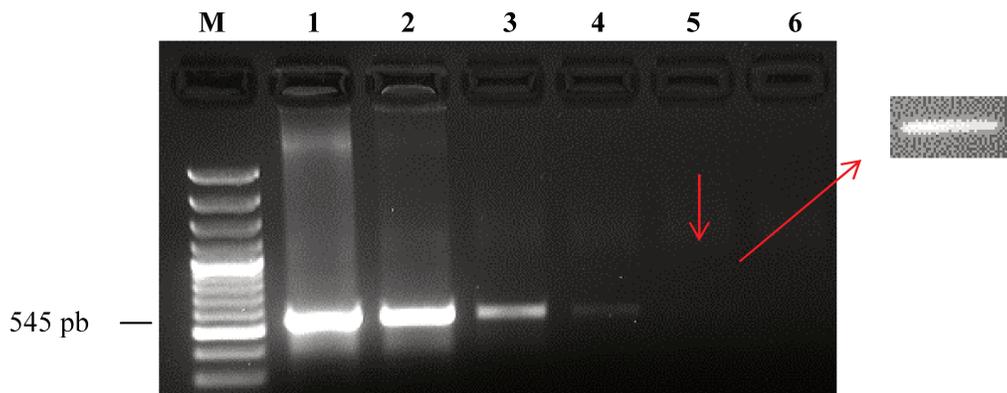
**Figura 11.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Curto2F/p322anti em diluição seriada de suspensão bacteriana da linhagem de Cff (IBSBF 1290<sup>P</sup>). (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) DNA genômico; (2)  $10^{-1}$ ; (3)  $10^{-2}$ ; (4)  $10^{-3}$ ; (5)  $10^{-4}$ ; (6)  $10^{-5}$

Nos testes com o par de *primers* Psgl/p322anti foi possível observar o sinal positivo de amplificação de 500 pb até a concentração de 80 UFC/PCR (Figura 12, canaleta 6).



**Figura 12.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Psgl/p322anti em diluição seriada de suspensão bacteriana da linhagem de Psg (IBSBF 1462<sup>P</sup>). (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) DNA genômico; (2) 10<sup>-1</sup> (3) 10<sup>-2</sup>; (4) 10<sup>-3</sup>; (5) 10<sup>-4</sup>; (6) 10<sup>-5</sup>; (7) 10<sup>-6</sup>

Nos ensaios com o par de *primers* Xanth2F/p322anti foi possível a observação do sinal positivo de amplificação do fragmento esperado de 545 pb até a concentração de 700 UFC/PCR (Figura 13, canaleta 5).

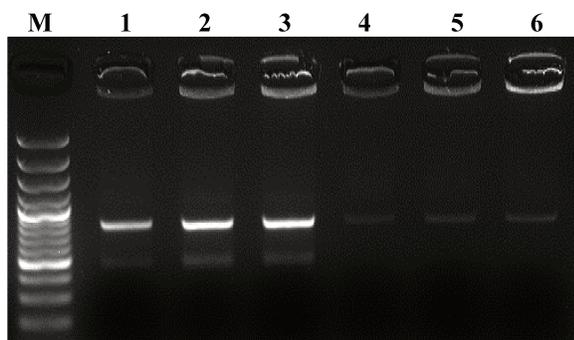


**Figura 13.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Xanth2F/p322anti em diluição seriada de suspensão bacteriana da linhagem de Xag (IBSBF 2440<sup>P</sup>). (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) DNA genômico; (2) 10<sup>-1</sup> (3) 10<sup>-2</sup>; (4) 10<sup>-3</sup>; (5) 10<sup>-4</sup>; (6) 10<sup>-5</sup>

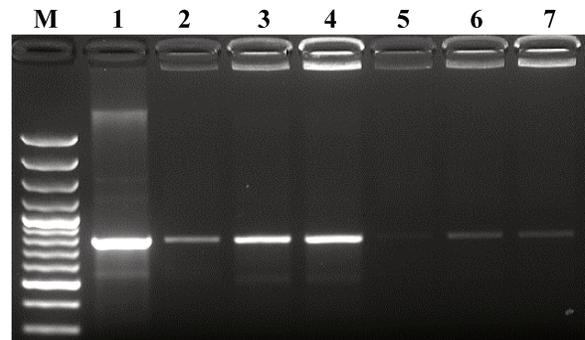
## 5.4 Validação da metodologia de detecção em sementes

Sementes de soja infectadas artificialmente com as linhagens Patotipo de Cff (IBSBF 1290<sup>P</sup>), Psg (IBSBF 1462<sup>P</sup>) e Xag (IBSBF 2440<sup>P</sup>) foram utilizadas para a validação da metodologia de detecção, utilizando-se os *primers* espécie-específico desenhados. Foram realizados diversos testes para a padronização do protocolo de infecção e detecção, optando-se pelo método descrito por Valarini e Menten (1991) com modificações.

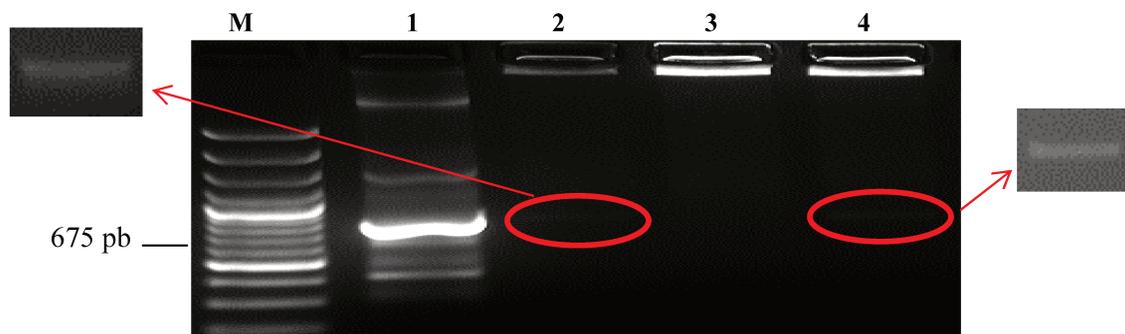
Para a detecção de Cff em sementes de soja, o par de *primers* Curto2F/p322anti mostrou-se bastante eficiente, sendo possível observar o sinal positivo de amplificação do fragmento de 675 pb diretamente do extrato bruto das sementes antes e após o enriquecimento da cultura (BIO-PCR) em todos os níveis de infecção testados (1; 0,5 e 0,1%) (Figuras 14, 15, 16 e 17).



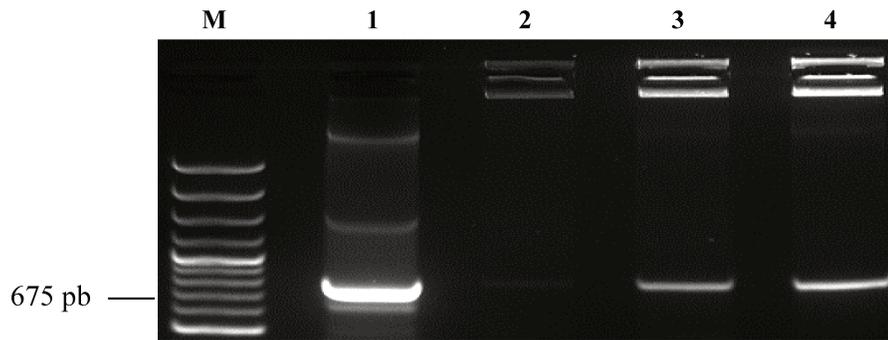
**Figura 14.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Curto2F/p322anti diretamente no extrato bruto das sementes infectadas com Cff (IBSBF 1290<sup>P</sup>). (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); **1% de infecção:** (1) 1 µL (2) 2,5 µL; (3) 5 µL; **0,5% de infecção:** (4) 1 µL; (5) 2,5 µL; (6) 5 µL .



**Figura 15.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Curto2F/p322anti após enriquecimento (BIO-PCR) do extrato bruto das sementes infectadas com Cff (IBSBF 1290<sup>P</sup>). (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) DNA genômico IBSBF 1290<sup>P</sup> – controle positivo; **1% de infecção:** (2) 1 µL (3) 2,5 µL ; (4) 5 µL; **0,5% de infecção:** (5) 1 µL; (6) 2,5 µL; (7) 5 µL .

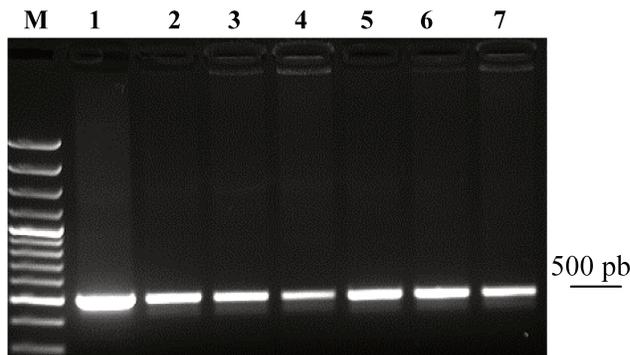


**Figura 16.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Curto2F/p322anti diretamente no extrato bruto das sementes infectadas com Cff (IBSBF 1290<sup>P</sup>) em **0,1% de infecção.** (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) DNA genômico IBSBF 1290<sup>P</sup> – controle positivo; (2) 1 µL; (3) 2,5 µL (4) 5 µL.

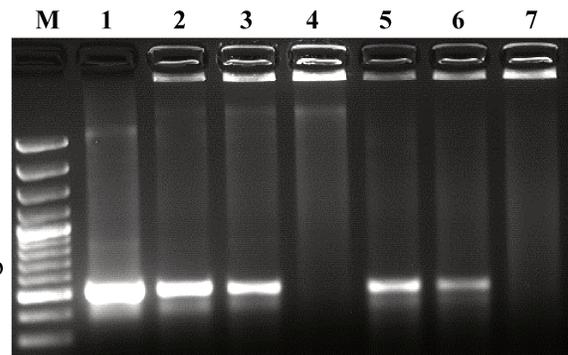


**Figura 17.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Curto2F/p322anti após enriquecimento (BIO-PCR) do extrato bruto das sementes infectadas com Cff (IBSBF 1290<sup>P</sup>) em **0,1% de infecção**. (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) DNA genômico IBSBF 1290<sup>P</sup> – controle positivo; (2) 1 µL (3) 2,5 µL ; (4) 5 µL.

O par de *primers* Psgl/p322anti também se mostrou altamente sensível nos testes para a detecção de Psg em sementes de soja artificialmente infectadas, sendo o sinal positivo de amplificação de 500 pb visível nos níveis de 1% e 0,5% de infecção antes do enriquecimento da cultura (Figuras 18 e 19).



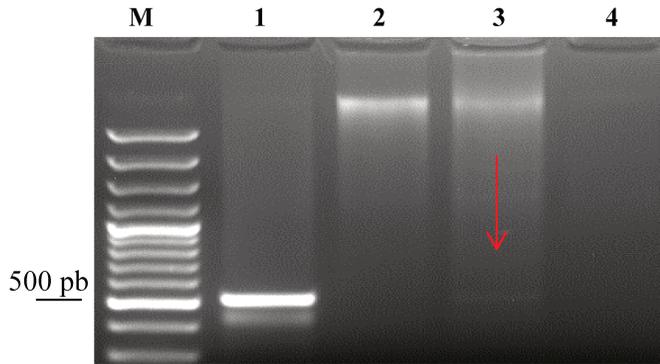
**Figura 18.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Psgl/p322anti diretamente no extrato bruto das sementes infectadas com Psg (IBSBF 1462<sup>P</sup>). (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) DNA genômico IBSBF 1462<sup>P</sup> – controle positivo; **1% de infecção**: (2) 1 µL (3) 2,5 µL ; (4) 5 µL; **0,5% de infecção**: (5) 1 µL; (6) 2,5 µL; (7) 5 µL .



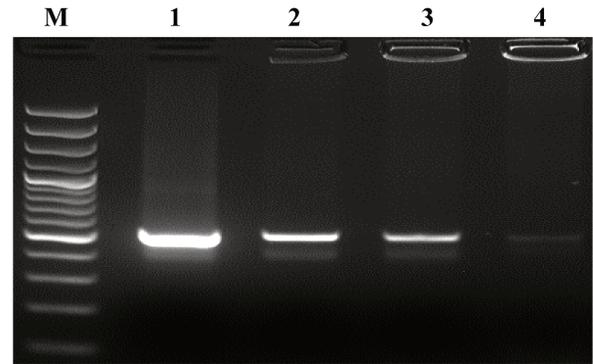
**Figura 19.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Psgl/p322anti após enriquecimento (BIO-PCR) do extrato bruto das sementes infectadas com Psg (IBSBF 1462<sup>P</sup>). (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) DNA genômico IBSBF 1462<sup>P</sup> – controle positivo; **1% de infecção**: (2) 1 µL (3) 2,5 µL ; (4) 5 µL; **0,5% de infecção**: (5) 1 µL; (6) 2,5 µL; (7) 5 µL .

Foi possível observar na Figura 19 que algumas bandas que antes estavam presentes nas alíquotas de 5 µL em 1% e 0,5% de infecção diretamente do extrato, desaparecem após a etapa de enriquecimento (canaletas 4 e 7). Isso possivelmente ocorreu devido à presença de inibidores da PCR.

Já para as sementes com 0,1% de infecção, o sinal foi melhor visualizado somente após a etapa de enriquecimento (Figuras 20 e 21).

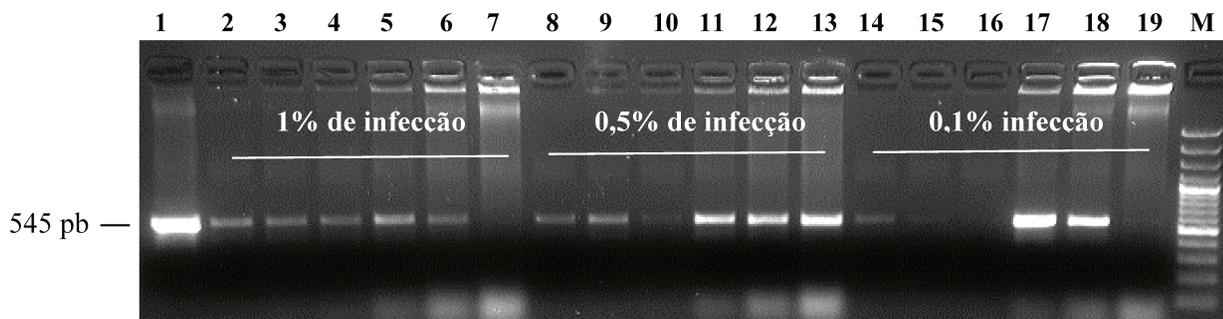


**Figura 20.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Psgl/p322anti diretamente no extrato bruto das sementes infectadas com Psg (IBSBF 1462<sup>P</sup>), em **0,1% de infecção**. (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) DNA genômico IBSBF 1462<sup>P</sup> – controle positivo; (2) 1 µL (3) 2,5 µL ; (4) 5 µL.



**Figura 21.** Produtos de amplificação utilizando-se o par de *primers* Psgl/p322anti após enriquecimento (BIO-PCR) do extrato bruto das sementes infectadas com Psg (IBSBF 1462<sup>P</sup>), em **0,1% de infecção**. (M) marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas); (1) DNA genômico IBSBF 1462<sup>P</sup> – controle positivo; (2) 1 µL (3) 2,5 µL ; (4) 5 µL.

Para a detecção de Xag nas sementes de soja infectadas artificialmente utilizando-se o par de *primers* Xanth2F/p322anti foi possível detectar a presença da bactéria diretamente no extrato bruto em todos os três níveis de infecção, sendo o sinal positivo de amplificação de 545 pb potencializado após a etapa de amplificação biológica (BIO-PCR) (Figura 22).



**Figura 22.** Produtos de amplificação utilizando o par de *primers* Xanth2F/p322anti. (1) DNA genômico IBSBF 2440<sup>P</sup> – controle positivo; Aliquotas diretamente do extrato bruto: (2) 1 µL (3) 2,5 µL ; (4) 5 µL; (8) 1 µL (9) 2,5 µL ; (10) 5 µL; (14) 1 µL (15) 2,5 µL ; (16) 5 µL; Aliquotas pós enriquecimento: (5) 1 µL (6) 2,5 µL ; (7) 5 µL; (11) 1 µL (12) 2,5 µL ; (13) 5 µL; (17) 1 µL (18) 2,5 µL ; (19) 5 µL; (M) marcador de peso molecular (Fermentas).

## 6. DISCUSSÃO

Inicialmente, no presente estudo, a técnica de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S RNAr foi empregada visando à diferenciação das fitobactérias de Cff, Psg e Xag, patogênicas à soja e os perfis de restrição gerados pelas endonucleases utilizadas separaram claramente esses patógenos. Essa mesma técnica foi empregada em diversos trabalhos envolvendo diferenciação de espécies bacterianas. Espécies pertencentes ao gênero *Xanthomonas* foram claramente separadas por PCR-RFLP dos genes *rpfB* e *atpD* (SIMÕES et al., 2007). Ferreira-Tonin e colaboradores (2012) conseguiram diferenciar claramente espécies de *Xanthomonas* que afetam a mesma planta hospedeira por meio da técnica de PCR-RFLP do gene *rpoB*. Ainda, *X. citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico (praga quarentenária A2), foi nitidamente diferenciada das espécies *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, agentes causais da canrose C e da mancha bacteriana dos citros, respectivamente, por meio de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S RNAr (DESTÉFANO; RODRIGUES NETO, 2002). *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, *X. vasicola* pv. *vasculorum*, *X. albilineans* e *X. sacchari*, patogênicas a cana de açúcar, puderam também ser separadas por meio dessa última técnica (DESTÉFANO et al., 2003).

Os resultados do presente estudo, juntamente com os relatos de literatura, indicam que essa técnica pode ser utilizada como uma ferramenta eficiente, rápida e barata em testes laboratoriais de diagnóstico de identificação e diferenciação de espécies bacterianas.

A partir dos dados de PCR-RFLP obtidos, verificou-se que as diferenças observadas entre os perfis indicavam a possibilidade do desenho de *primers* espécie-específicos para Cff, Psg e Xag. O par de *primers* Curto2F/p322 anti mostrou-se altamente específico quando testado com DNAs de linhagens de Psg e Xag e nos experimentos de níveis de sensibilidade da técnica de PCR, esse par de *primers* alcançou um limite de detecção de 0,01 ng de DNA genômico e  $10^3$  UFC/PCR da bactéria. Esses resultados corroboram com os resultados de Tegli e colaboradores (2002), que desenvolveram um par de *primers* (CffFOR2 e CffREV4) para a detecção de Cff em sementes de feijão, tendo um limite de detecção de 5 pg de DNA e  $10^2$  UFC/mL.

O par de *primers* Psg1/p322 anti também mostrou-se altamente específico quando testados com DNAs de linhagens de Cff e Xag, apresentando um grau mínimo de sensibilidade de 1 pg de DNA genômico e 80 UFC/PCR.

Alta especificidade também foi observada para o par de *primers* Xanth2F/p322anti nos testes com DNAs de linhagens de Cff e Psg e os níveis de sensibilidade da técnica de PCR utilizando esses *primers* foram de 1 ng de DNA genômico e 700 UFC/PCR. No trabalho de Kang

e colaboradores (2009), *primers* desenvolvidos a partir do gene *glicinecin A* para detecção de Xag em sementes de soja, mostraram-se mais sensíveis nos testes com DNA genômico, alcançando níveis de até 0,002 pg de DNA. Entretanto, os autores obtiveram nível de detecção de células de  $1,8 \times 10^3$  UFC/mL, enquanto que no presente estudo os níveis alcançados foram na ordem de  $10^2$ .

*Primers* específicos para detecção e identificação de fitobactérias tem sido amplamente descritos. Schaad e colaboradores (1995) desenvolveram *primers* para detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola* em extratos de sementes de feijão, que se mostraram sensíveis em até 250 pg de DNA e  $1,2 \times 10^2$  UFC/mL. Ainda, para a detecção de *P. corrugata* em tecidos de tomateiro infectado, Catara (2000) desenvolveu *primers* com níveis de detecção que alcançaram até 20 pg de DNA e  $4 \times 10^3$  UFC/mL. Já no trabalho de Leite e colaboradores (1995), para detecção de *X. vesicatoria* em sementes de tomate e pimentão, o nível de sensibilidade foi de  $10^3$  UFC/mL.

Nos experimentos de validação da metodologia desenvolvida diferentes níveis de infecção das sementes (1; 0,5 e 0,1%) foram testados empregando-se os *primers* desenhados para Cff, Psg e Xag. Os resultados mostraram que foi possível verificar a presença de sinal positivo de amplificação diretamente do extrato bruto das sementes, sem a necessidade da etapa de enriquecimento da cultura (BIO-PCR), ressaltando a alta eficiência dos *primers* desenvolvidos. Cabe ressaltar que, dependendo da alíquota utilizada (1; 2,5 e 5  $\mu$ L), o sinal positivo de amplificação não foi visível, ou seja, a realização de testes com diferentes alíquotas de cada material se faz necessária para garantir a confiabilidade dos resultados. No trabalho de Deuner (2007), utilizando os *primers* descritos por Tegli e colaboradores (2002), não foi possível detectar a presença de Cff no extrato bruto de sementes de feijão independente do número de sementes infectadas, sendo necessária a etapa de BIO-PCR para que o sinal positivo de amplificação fosse observado. Schaad e colaboradores (1995), ao realizarem estudos para detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola* diretamente do extrato de sementes, não obtiveram êxito em suas análises, sendo necessário usar a técnica de BIO-PCR para a visualização do sinal. Sakthivel e colaboradores (2001) obtiveram êxito em suas análises ao detectarem *X. oryzae* pv. *oryzae* em sementes de arroz naturalmente infectadas utilizando a metodologia de BIO-PCR, após plaqueamento do extrato das sementes em meio semi-seletivo.

No presente estudo, os *primers* desenhados para Cff, Psg e Xag também foram testados em experimentos de BIO-PCR com os três diferentes níveis de infecção do patógeno e verificou-se sinal positivo de amplificação para a maioria dos casos. Pensando nos questionamentos acerca do emprego da técnica de PCR com resultados positivos em amostras que podem conter apenas células não viáveis, a etapa de BIO-PCR torna-se imprescindível para comprovar a viabilidade

das células na amostra, eliminando, assim, a possibilidade de resultado falso positivo. Ainda, verificou-se que alíquotas que apresentaram ausência de sinal de amplificação nas amostras retiradas do extrato bruto apresentaram sinal positivo após a etapa de enriquecimento. Nesse sentido, esse resultado salienta para a necessidade da etapa de amplificação biológica, visto que a mesma elimina também a possibilidade de resultados falsos negativos, devido à presença de inibidores da PCR, à presença de populações bacterianas que podem influenciar negativamente o crescimento da bactéria de interesse e a distribuição irregular da mesma em sementes/tecidos contaminados. Além disso, o enriquecimento de células viáveis de bactérias em meios de cultivo permite a detecção de patógenos mesmo quando presentes em baixos níveis de infecção nas sementes ou outros materiais propagativos, já que essa etapa possibilita a multiplicação do patógeno aumentando a sensibilidade de detecção.

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

O estabelecimento de um método reproduzível e confiável para a detecção de fitopatógenos em análises de rotina é de extrema importância em um programa de certificação de sementes. Desta forma pode-se evitar a utilização de sementes de qualidade sanitária duvidosa, o que, em última análise, resulta sempre em perdas quantitativas e qualitativas de produção (RABALHO, 2007).

Os resultados obtidos no presente estudo poderão contribuir de forma significativa para o diagnóstico de Cff, Psg e Xag em sementes de soja, e os *primers* desenvolvidos poderão ser recomendados para a detecção e identificação dessas fitobactérias em lotes comerciais e programas de quarentena de forma rápida e precisa, evitando, assim, as etapas laboriosas de isolamento em meios de cultura semi-seletivo, identificação por métodos bioquímicos convencionais e/ou testes de patogenicidade. Ainda, a análise completa de um lote de sementes pode ser concluída num intervalo de dois a três dias, enquanto que se utilizando os métodos convencionais, o processo se encerra em um prazo que varia de dez a 14 dias. Neste trabalho, verificou-se que os *primers* espécie-específicos desenvolvidos para a detecção de Cff, Psg e Xag em sementes de soja foram eficientes nos experimentos de detecção do patógeno em baixos

níveis de infecção, além de otimizar o tempo no diagnóstico dessas bactérias, sendo assim uma importante ferramenta para uso em rotina de laboratórios de sanidade e certificação de sementes.

## 7. CONCLUSÕES

- Os *primers* desenvolvidos no presente estudo mostraram-se altamente específicos e sensíveis. O par de *primers* **Curto2f/p322anti** apresentou um grau mínimo de sensibilidade de 0,01 ng de DNA genômico e  $5 \times 10^3$  UFC/PCR; o par de *primers* **Psgl/p322anti** alcançou um limite de detecção de até 1 pg de DNA genômico e 80 UFC/PCR; e o par de *primers* **Xanth2f/p322anti** apresentou um limite de detecção de 1 ng de DNA genômico e 700 UFC/PCR.
- Na detecção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de soja, foi possível visualizar o sinal positivo de amplificação direto do extrato bruto em todos os níveis testados, sendo o sinal potencializado pelo enriquecimento da cultura (BIO-PCR).
- Para a detecção de *P. savastanoi* pv. *glycinea*, a utilização dos *primers* diretamente nas alíquotas do extrato bruto permitiu a clara visualização do sinal positivo de amplificação em 1% e 0,5% de infecção, sendo necessária a etapa de enriquecimento da cultura para melhor visualização do sinal em 0,1% de infecção.
- Para a detecção de *X. axonopodis* pv. *glycines*, o sinal positivo de amplificação foi observado na maioria das alíquotas diretamente do extrato bruto em todos os níveis testados, e a etapa de enriquecimento proporcionou melhor visualização do sinal positivo de amplificação.
- A técnica de BIO-PCR empregada neste estudo reuniu as características de uma boa ferramenta de detecção: especificidade, sensibilidade, rapidez e simplicidade de execução. Apresentou ainda, sobre outros métodos, a vantagem de permitir a distinção entre células viáveis e não viáveis, evitando assim resultados falsos positivos e também falsos negativos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, V.K.; SINCLAIR, J.B. **Principles of seed Pathology**. vol. 2. Boca Raton: CRC Press, 1987.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4th ed. San Diego: Academic press. 423-434. 1997
- ALENCAR, N. E.; WENDLAND, A.; MELO, L. C.; COSTA, J. G. C.; DEL PELOSO, M. J.; PEREIRA, H. S.; FARIA., L. C.; CÔRTEZ, M. V. C. B.. Avaliação fenotípica de genótipos de feijoeiro comum a isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* . **Anais do Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão**, Campinas Brasil, p.957-960. 2008
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). Manual de fitopatologia, vol. 2. **Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 569-588, 2005
- ALVAREZ, E.; BRAUN. E. J; MCGEE, D.C. New assays for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in soybean seed. **Plant Disease**. v.79; p.12-14. 1995
- BALANI, D. M. Detecção e identificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodoeiro por meio de técnicas moleculares. Tese. (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 62p., 2009.
- BAKER, K.F. Seed pathology. In: KOZLOWSKI, T. (Ed.) Seed biology. New York: **Academic Press**, p.317-416. 1972
- BARRY, T., COLLERAN, G., GLENNON, M. M., DUNICAN, L. K. & GANNON, F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. **PCR Methods Appf**, v.1, p.51-56, 1991
- BERG, T.; TESORIERO, L.; HAILSTONES, D.L. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. *Plant Pathology*, v. 54, p. 426-427, 2005.
- BELLAVER C. AND. SNIZER J. P. N. Soybean processing and its implications on swine and poultry feeding. **Anais do Congresso Brasileiro de Soja**. 183-199. 1999.
- BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA , G. M. S. (Ed.). **Soja: tecnologia de produção II**. Piracicaba: ESALQ, p.1-18, 2000.
- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo : origem, história e distribuição. In : MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas : ITAL, p. 1-6, 1981.
- BRADBURY, J. F. Guide to plant pathogenic bacteria. Ferry Lane: C.A.B. **International Mycological Institute**. 332p.1986.
- CÂMARA , G. M. S. (Ed.). Soja: tecnologia de produção II. Piracicaba: ESALQ, p.1- 18, 2000.
- CATARA, V.; DAWN, A.; CIRVILLERI, G.; VIVIAN, A. Specific oligonucleotide *primers* for the rapid identification and detection of the agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugate* by PCR amplification: evidence for two distinct genomic groups. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p. 753-762, 2000.

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

CLAFLIN, L.E.; RAIMUNDO, B.A. Evaluation of the dot-immunobinding assay for detecting phytopathogenic bacteria in wheat seeds. **Journal of Seed Technology**, v. 11, p. 52-61, 1987.

COERPER, F. M. - Journal of Agricultural Research, 1919.

COLETTA FILHO, H.D.; BORGES, K.M.; MACHADO, M.A. Ocorrência de *Xylella fastidiosa* em plantas candidatas a matrizes de laranja-doce, e transmissão por borbulhas contaminadas. **Laranja**, v.21, p.327-334, 2000.

COLLINS, M. D.; JONES, D. 1983. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens*. **Journal of General Microbiology**, 129: 3545-3548.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO -. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_01\\_10\\_15\\_07\\_19\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_10_15_07_19_boletim_graos_janeiro_2014.pdf)> Acesso em 3 de fevereiro 2014

COSAVE, COMITE DE SANIDADE VEGETAL DEL CONE SUR. Plagas Cuarentenarias: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, 4p., <http://www.cosave.org.py>, 2003

DENARDIN, N., D. et al. Detecção e qualificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro. In: **7º SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES**. Resumos e palestras. Sete Lagoas, MG. 198p. 2002.

DENARDIN, N., D.; MOURA, A.B.; MENTEN, J.O.M. Detecção e identificação de bactérias em sementes. In: **Simpósio Brasileiro de patologia de sementes**. João Pessoa, In: Anais SNA, p. 62-67, 2004.

DESTÉFANO, S.A.L.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J.; FERREIRA, M.; BALANI, D.M. Differentiation of *Xanthomonas* species pathogenic to sugarcane by PCR-RFLP. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 283-288, 2003.

DESTÉFANO, S.A.L.; RODRIGUES NETO, J. Rapid Differentiation of *Xanthomonas* strains causing disease in citrus plants based on polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 167-172, 2002.

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

DEZORDI, C. et al. Avaliação da sensibilidade in vitro de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* à produtos químicos: I – Fungicidas. In: VII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES. Palestras e Resumos. João Pessoa – PB. 247p. 2004.

DEZORDI, C. et al. Meio de cultura semi-seletivo para detecção de bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* de lotes de sementes de algodão. In: **INFORMATIVO ABRATES**. v.15, no. 1, 2, 3 – Agosto. 2005.

DINGMAN D.W. DNA fingerprinting of *Paenibacillus popilliae* and *Paenibacillus lentimorbus* using PCR-amplified 16S–23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS) regions. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.100, p.16–21, 2009

DINGMAN, D.W. *Paenibacillus larvae* 16S–23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS) regions: DNA fingerprinting and characterization. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, p. 352–358, 2012

DOLZANI, L., TONIN, E., LAGATOLLA, C., MONTI-BRAGADIN, C. Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16s-23s rRNA intergenic spacer sequences. **Microbiology Letters**, v. 119, p. 167-174, 1994.

DOLZANI, L., TONIN, E., LAGATOLLA, C., PRANDIN, L., MONTI-BRAGADIN, T.; Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1108-1113, 1995.

EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Tecnologias de Produção de Soja: Paraná Londrina: **Embrapa Soja**, p. 151 e 157, 2007.

EPPO. Quarantine Pest for Europe. CAB Internacional, Wallingford (GB). p.711-715. 2011

FARHATULLAH; GROOSE, R.W.; RAZIUDDIN; AKMAL, M.; INAYATULLAH, M. Mapping gene for bacterial blight (*rpg4* locus) in soybean. **Pakistan Journal of Botanic.**, v. 42, p. 2145-2149, 2010.

FERREIRA-TONIN, M., RODRIGUES-NETO, J., HAKAKAVA, R., DESTÉFANO, S., A., L. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial *rpoB* gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 62, p.1419-1424, 2012

FRAPOLLI, M.; DÉFAGO, G.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* spp. producing the antifungal compound 2,4 diacetylphloroglucinol. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 1939-1955, 2007.

GARDAN, L., DAVID, C., MOREL, M., GLICKMANN, E., ABU-GHORRAH, M.,PETIT, A.; DESSAUX, Y.. Evidence for a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. **Applied Environmental Microbiology**. v.58, p.1780-1783, 1992

GOMES, P: A soja. São Paulo: Nobel, 5<sup>a</sup> ed. 152p, 1990.

GOULART, A.C.P. Fungos em sementes de soja: detecção e importância. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1997. 58p. (EMBRAPA-CPAO. Documentos, 11)

GUIMARAES, P. M. Development of a DNA probe and characterization of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. ( Tese PhD) . Londres. Universidade de Londres. 1997

GUIMARÃES, P.M.; PALMANO, S.; SMITH, J.J.; SÁ, M.F.G.; SADDLER, G.S. Development of a PCR test for detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.80, p.1-10, 2001

- GÜRTLER, V.; STANISICH, V.A.; New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region. **Microbiology**, v.142; p. 3-16, 1996.
- HALL, T., A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp.**, v.41, p. 95-98, 1999.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; SOUSA, R. M. de. Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. **Ciência Agrotécnica**, v. 24, p. 94-102, dez. 2000. Edição especial.
- HARTMAN, G.L. Compendium of soybean diseases. **The American Phytopathological Society**: APS Press, 1999
- HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. Soybean diseases. In: Compendium of soybean diseases 4<sup>th</sup> ed. HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. 3-4. 1999.
- HARTUNG, J., S.; DANIEL, J., F.; PRUVOST, O., P.; Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1143-1148, 1993.
- HEDGES, F. A. Bacterial wilt of bean (bacterium *flaccumfaciens*) including comparisons with bacterium *phaseoli*. **Phytopathology**, v.16, p. 1-22, 1926
- HENNING, A. A, et al. Manual de identificação de doenças da soja. Londrina: **Embrapa soja**, 2005
- HERBES, D. H.; THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C.; DAL PIVA, C. A.; ABREU, L. Detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro produzidas em Santa Catarina. **Tropical Plant Pathology**, v.33,p.153-156, 2008.
- HOKAWAT, S. 1978. Soybean Pustule Bacteria in Thailand. Dissertação de mestrado, Kasetsart University
- HONEYCUTT, R. J.; SOBRAL, B. W. S.; MCCLEELAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphism diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, v. 141, p. 3229-3239, 1995.
- HWANG, I., LIM, S. Pathogenic variability in isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. **Korean Journal of Plant Pathology**. v.14, p.19-22, 1998.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, p.969-976, 1970.
- KANG, M., H.; LEE, Y., J.; NOH, T., H.; LEE, D., K.; LEE, G., H.; KIM, S., J.; Direct PCR detection of the causal agents, soybean bacterial pustule, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. **Research in Plant Disease**, v. 15, p. 83-87, 2009.
- KHAERUNI, A.; SUWANTO, A.; TIAHJONO, B.; SINAGA, M., S.; Rapid Detection of Bacterial Pustule Disease on Soybean Employing PCR Technique with Specific Primers. **Journal of Biosciences**,v. 14, p 76-80, 2007.

KIM, D.H., KIM, K.H., VAN, K., KANG, Y. J., YOON, M. Y., MOON, J. K. RNA-Seq Analysis of a Soybean Near-Isogenic Line Carrying Bacterial Leaf Pustule-Resistant and Susceptible Alleles. **DNA Research**, v.18, p.483-497, 2011.

KIMURA, O. Controle de fitobactérias em hortaliças através do tratamento térmico de sementes. **Fitopatologia Brasileira** v.16, p.8.1991. (Resumo)

KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. (Ed.). **Methods in phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. 568p.

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

KONG, H.; BLACKWOOD, C.; BUYER, J. S.; GULYA JR, T.J.; LYDON, J. The genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* based on the 16S–23S rDNA intergenic spacer regions. **Biological Control**, v. 32, p. 356-362, 2005.

KRUPPA, P.C. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes e no interior de frutos do tomateiro pelo uso de meios de cultura semi-seletivos. 1993. 71 p. Dissertação (Mestrado em Defesa Fitossanitária) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 1993.

LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro. Londrina: **Embrapa Soja**, p. 46, 2010. (Embrapa Soja. Documentos, 319).

LEITE, Jr., R.P.; JONES, J.B.; SOMODI, G.C. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. **Plant Disease**, v.79, p.917-922, 1995.

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

LOUWS, F.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-Based genomic analysis of phytobacteria: Diversity Detection and Disease Diagnosis. **Ann. Ver. Phytopathol**, v. 37, p. 81-125, 1999.

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

MACHADO, J.C. Patologia de sementes: fundamentos e aplicações. Brasília: Ministério da Educação; Lavras: ESAL, FAEPE, 107p. 1988.

MADDOX, D.A. Implications of new technologies for seed health testing and the worldwide movement of seed. **Seed Science Research**, v.8, p.277-284, 1998.

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

MANULIS, S.; KOGAN, N.; VALINSKY, L.; DROR, O.; KLEITMAN, F. Detection of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila* in gypsophila plantas by PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.85-91, 1998

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Manual de práticas em fitobacteriologia. UFRP. Recife, PE 184p. 2005.

MARINGONI, A. C.; ROSA, E. F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.23, p.160-162, 1997.

MARINGONI, A. C.; CAMARA, R. C. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* detection in bean seeds using a semi-selective culture medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, 37: 451-455, 2006

MAS, A., GONZÁLEZ, A. Differentiation of acetic acid bacteria based on sequence analysis of 16S–23S *Rrna* gene internal transcribed spacer sequences. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, p. 217–222, 2011.

MASSOL-DEYA, A. A., ODELSON, D. A., HICKEY, R. F., TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: **AKKERMANS**, 1995.

MCGUIRE, R.G.; JONES, J. B.; SASSER, M. Tween media for semi selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. **Plant Disease**, Sant Paul,v.70, p.887-889, 1986

MENG, X.Q.; UMEXH, K. C.; DAVIS, R. M.; GILBERTSON, R.L. Development of PCR-based assays for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, the carrot bacterial leaf blight pathogen, from different substrates. **Plant Disease** v.88, p.1226-1234, 2004.

MENTEN, J.O.M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: MENTEN, J.O.M. (Ed). **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba. Anais da 2º semana de atualização em patologia de sementes. Piracicaba: ESALQ, FEALQ, 1991<sup>a</sup>, p.115-136, 1991a.

MENTEN, J. O. M. Patógenos em sementes, detecção, danos e controle químico. São Paulo. Ciba Agro. 1995.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). A soja no Brasil. Campinas : ITAL, p. 1-6,1981.

MORAES, A. A. C.; SILVA, A. L.; FILHO, A. C.; AMABILE, R. F. Histórico da soja. In: **Soja: suas aplicações**. MORAES, A. A. C.; SILVA, A. L. (Eds). MEDSI. 1-11. 1996.

MOURA, A. B. et al. Métodos de detecção de bactérias em sementes. In: **REVISÃO ANUAL DE PATOLOGIA DE PLANTAS – RAPP**. vol. 13. p. 297-319. 2005.

NARVEL JM, JAKKULA LR, PHILLIPS DV, WANG T, LEE S-H, BOERMA HR,. Molecular mapping of *Rxp* conditioning reaction to bacterial pustule in soybean. **Journal of Heredity**. v.92, 267–70, 2001

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

NUNES, L.M.; BEHLAU, F.; LEITE, R.P. Especificidade de *primers* para identificação e detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por PCR. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.243, 2004.

OH, C.; HEU, S.; CHOI, Y.; OH, C.S.; HEU, S.G.; CHOI, Y.C. Sensitive and pathovar-specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* by DNA hybridization and polymerase chain reaction analysis. **Plant Pathology Journal**, v.15, n.1, p.57-61, 1999.

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

PINTO, C., S.; Comportamento de Linhagens e Variedades de Soja (*Glycine max* (L.) Merrill) a uma Estirpe de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 84p, 2005.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 151-156, 1989.

PRATHUANGWONG, S., AND AMNUAYKIT, K. Studies on tolerance and rate reducing bacterial pustule of soybean cultivars/lines. **Natural Science**. v.21, p.408-420, 1987.

PROBST, A. H.; JUDD, R. W. Origin, U. S. history and development, and world distribution. In **Soybeans: Improvement, production, and uses**. CALDWELL, B. E. American Society of Agronomy. Madson, E.U.A. 1-15. 1973.

RABALHO, A. A. *Xanthomonas* spp. Causadoras da mancha bacteriana do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.): detecção em sementes e diferenciação (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 91p., 2007.

REEVES, J.C. Comparative tests for the detection *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds. In: KOENRAADT, H.; HUTCHINS, J.D. (Ed.). **Seed health testing: progress towards the 21<sup>st</sup> century**. CAB International, p.205-209.

RODRIGUES NETO. J. Detecção e identificação de fitobactérias em sementes In: **Simpósio Brasileiro de patologia de Sementes**. Anais. Fundação Cargill. p.123-139, 1998.

ROESSING, A. C.; GUEDES, L. C. A. Aspectos econômicos do complexo soja: sua participação na economia brasileira e evolução na região do Brasil Central. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. (Ed.). **Cultura da soja nos cerrados**. Associação Brasileira da Potassa e do Fosfato, p. 1-70, 1993

ROMEIRO, R. S. 2005. Bactérias fitopatogênicas. 2<sup>a</sup>ed. Ed. UFV, Viçosa, Brasil, 417p

ROMEIRO, R. S.; NETO, J. R. Diagnose de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. UFV –Viçosa. Imprensa Universitária. 67p. 2001.

SAETTLER, A. W. et al. Detection of bacteria in seed and other planting material. **The American Phytopathological Society**. 125p. 1995.

SAMMER, U.F; REIHER, K. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in Germany – a threat for farming. *Journal of Phytopathology* .v. 160, n.6,p. 314-316, 2012.

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

SCHAAD, N.W.; DONALDSON, R. C., Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seeds. **Seed Science and Technology**, v. 8, p. 383-391, 1980.

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

SCHAAD, N. W. et al. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third Edition. **ASP**, 373p. 2001

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

SEDIYAMA, T.; PEREIRA, M. G.; SEDIYAMA, C. S.; GOMES, J. L. L. **Cultura da soja**. 96p. 1996.

SILVA, J. R. C.; SOUZA, R. M. de; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bactérias endofíticas no controle in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência agrotecnica**. v. 32, n. 4. p. 1062-1072, 2008.

SILVA, J.F. Contribuição ao desenvolvimento de soja com resistência a patógenos. (Embrapa Soja Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento). **Embrapa Soja**, 2002.

SIMÕES, N.H.T.; GONÇALVES, R. E.; ROSATO.; MEHTA, A. Differentiation of *Xanthomonas* species by PCR- RFLP of *rpfB* and *atpD* genes. **FEMS Microbiology Letters**,v.271, p. 33-39, 2007.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. (Eds.). Compendium of Soybean Diseases. 3rd ed. St. Paul: **American Phytopathological Society**, 1999.

SOARES, R., M.; FANTINATO, G., G., P.; DARBEN, L., M.; SEIXAS, C., D., S.; CARNEIRO, G., E., S. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, vol. 38; p.452-454, 2013

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

SWEETS, L. Soybean foliage diseases may begin to show up. Integrated pest ; **Crop Management newsletter**. University of Missouri – Columbia 12, 2p. 2002.

TAYLOR, J.D. The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (*Burkh.*) Dowson. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.66, p.29-36, 1970

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

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 4876–4882, 1997.

THOWTHAMPITAK, J., SHAFFER, B. T., PRATHUANGWONG, S., LOPER, J. E. Role of *rpfF* in virulence and exoenzyme production of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, the causal agent of bacterial pustule of soybean. **Phytopathology** v.98, p.1252-1260, 2008

UESUGI, C. H., FREITAS, M. A.; MENEZES, J. R. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro, em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 324. 2003.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Production, Supply and Distribution Online. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 22 out 2012.

VALARINI, P. J; MENTEN, J. O. M.. Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e seu efeito sobre a qualidade sanitária e a germinação. *Summa Phytopathologica*, Jaboticabal, v. 17, n. 3/4, p. 227-231, jul/dez. 1991.

VAN DER WOLF, J.M.; IMÁN, L.J. JONES, D.A.; GREVESSE, C.; VAN BECKHOVEN, J.R.; VAN VUURDE, J.W.; PEROMBELON, M.C. Immunomagnetic separation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* from potato peel extracts to improve detection sensitivity on a crystal violet pectate medium or by PCR. **Journal Applied Bacteriology**, v.80, p.487-495, 1996.

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

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J. de.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 600p.

VIEIRA, E.H.N.; RAVA, C.A. Sementes de feijão: produção e tecnologia. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**., 270 p., 2000

WALCOTT, R., R., Detection of seedborne pathogens. **HortTechnology**, v. 13, p. 40–47, 2003

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

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. Controle integrado de doenças de hortaliças. Viçosa, Suprema Gráfica e Editora Ltda. 1997

ZAUMEYER, W.J. Comparative pathological histology of three bacterial diseases of bean. **Journal of Agriculture Research**, v. 44, p.605–632, 1932

ZHAO Y., WANG, M., BRADLEY, C.A, MINGSHENG, Q.I. Genome sequence analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv.*glycinea* and subtractive hybridization-based comparative genomics with nine Pseudomonads. **PLoS ONE**, v.6, 2011.