

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola

**Otimização da detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*
por PCR e estudo da movimentação sistêmica**

Rita de Cássia Cerqueira Melo

Cruz das Almas – BA
2014

**Otimização da detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*
por PCR e estudo da movimentação sistêmica**

**Rita de Cássia Cerqueira Melo
Bacharela em Biologia
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012**

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-Graduação da
Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia (UFRB),
como requisito final para
obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola.

Orientador: Saulo Alves Santos de Oliveira

Coorientadores: Carlos Augusto Dórea Bragança

Harllen Sandro Alves Silva

**Cruz das Almas – BA
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

M528o

Melo, Rita de Cássia Cerqueira.

Otimização da detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* por PCR e estudo da movimentação sistêmica / Rita de Cássia Cerqueira Melo. _ Cruz das Almas, BA, 2014.

62f.; il.

Orientador: Saulo Alves Santos de Oliveira.

Coorientador: Carlos Augusto Dórea Bragança.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Mandioca – Cultura. 2.Microbiologia – Doenças e pragas. 3.Plantas – Controle biológico.
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.
II.Silva, Harllen Sandro Alves. III.Título.

CDD: 581.2

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola

Comissão examinadora da defesa de dissertação de
Rita de Cássia Cerqueira Melo



Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientador)



Prof.ª Dr.ª Edna Lôbo Machado
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB



Dr.ª Cláudia Fortes Ferreira
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola em _____.

Cruz das Almas – BA

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por me dar tranquilidade e disposição para alcançar meus objetivos;

A todos da minha família, pelo amor, apoio, incentivo, cuidados e confiança que depositam em mim, eles são e serão os mais importantes sempre;

A todos os amigos, da Embrapa, da UFRB, da cidade, aos meus vizinhos... A todos no geral, por todos os momentos legais compartilhados, pelas conversas, conselhos, viagens e companheirismo sempre;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade do curso e a todos os professores pelos conhecimentos transmitidos;

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pela estrutura na qual pude realizar os trabalhos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao Dr. Saulo Oliveira pela disponibilidade, paciência, conhecimento transmitido nesses dois anos de orientação;

Ao Dr. Carlos Bragança pela coorientação, por toda contribuição principalmente nas análises moleculares e correções, foi fundamental;

Ao Dr. Harllen Silva pela coorientação e ao analista Luciano Pinheiro do laboratório de Microbiologia, por toda ajuda e empréstimo de material;

À Dr.^a Cláudia Fortes e a Prof.^a Dr.^a Edna Lôbo por participarem da banca e pela contribuição ao trabalho;

A todos dos laboratórios de Virologia Vegetal e Biologia Molecular pelos conhecimentos transmitidos, e principalmente a todos do laboratório de Fitopatologia onde realizei maior parte dos trabalhos, pelo companheirismo, amizade, troca de conhecimento, conversas e distração, o que algumas vezes aliviava a tensão dos trabalhos. Agradecimento especial a Francisco Paulo que me 'atura' há 5 anos, desde a iniciação científica, por todo o auxílio nos trabalhos e conselhos para a vida e, ao Dr. Hermes, por várias vezes permitir o acesso ao laboratório fora do horário

de expediente e por ser um 'pai' pra nós do laboratório de Fitopatologia, sempre muito gentil e prestativo.

À turma do setor campo, sempre muito prestativa... Bizunga, Sinésio, Zara, mestre e demais;

Enfim... A todos que direta e/ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

*Não se limite ao que lhe é oferecido,
esteja sempre disposto a explorar.*

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA..... 16

OBJETIVO GERAL..... 18

OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 18

CAPÍTULO I..... 19

Revisão de literatura 19

1 A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e sua importância..... 20

2 Bacteriose da mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) 23

3 Diagnose utilizando iniciadores (*primers*) moleculares..... 28

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 33

CAPÍTULO II..... 39

Otimização da detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* por PCR e estudo da movimentação sistêmica 39

RESUMO..... 40

INTRODUÇÃO 40

MATERIAL E MÉTODOS 42

1 Desenho dos iniciadores 42

2 Obtenção, cultivo e preservação dos isolados bacterianos..... 42

3 Teste de especificidade de detecção 45

3.1 Extração do DNA bacteriano 45

3.2 Reação de PCR 45

4 Sensibilidade dos iniciadores (avaliação do limite de detecção) 45

5	Detecção de <i>Xam</i> em tecido vegetal infectado.....	46
5.1	Obtenção do material com sintomas.....	46
5.2	Extração do DNA total e detecção por PCR.....	46
6	Uso dos iniciadores como ferramenta de estudos relacionados à movimentação sistêmica da bactéria e à resistência da planta	47
6.1	Detecção em diferentes porções da haste	47
6.2	Relação entre a movimentação sistêmica da bactéria e a resistência da planta.....	48
	RESULTADOS.....	49
	Iniciadores obtidos	49
	Especificidade dos iniciadores	50
	Sensibilidade dos iniciadores.....	50
	Eficiência da detecção de <i>Xam</i> por PCR em tecido vegetal infectado.....	51
	Relação entre a movimentação sistêmica da bactéria e a resistência da planta ...	52
	DISCUSSÃO	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Produção de raiz de mandioca em milhões de toneladas nos principais estados brasileiros ao longo dos anos 2008 a janeiro de 2014. Fonte: IBGE elaborado pela CONAB.....21
- Figura 2.** Aspecto das colônias de *Xam* em meios de cultura. A: 48 horas de crescimento em 28 °C em meio YDC (SCHAAD, 2001); B: 48 horas de crescimento a 28 °C em meio YPG (VERDIER *et al.*, 1998). Fotos: Rita Melo.25
- Figura 3.** Diferentes sintomas causados por *Xam* em plantas suscetíveis de mandioca. A – Início do aparecimento dos sintomas com pequenos pontos amarelos nas folhas. B – Lesões angulares na folha com aspecto encharcado. C – Necrose da folha. D – Murcha das folhas. E – Exsudação na haste. F – Morte da ponteira e perda das folhas. Fotos: Miguel A. Dita.....26
- Figura 4.** Diferentes pontos na haste de mandioca infectada com *Xam*. A: 1 cm na base da haste; B: 1 cm no ponto de inoculação; C: 8 cm acima do ponto de inoculação e, D: 16 cm acima do ponto de inoculação. Foto: Rita Melo.48
- Figura 5.** Gel de agarose a 1%. Produto de PCR do teste de sensibilidade com isolados bacterianos de diferentes espécies e gêneros. (A):1: *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*; 2: *X. axonopodis* pv. *passiflora*; 3: *Xanthomonas campestris*; 4: *Ralstonia solanacearum*; 5: *Pseudomonas marginalis*; 6: *Pseudomonas maculicula*; 7: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; 8: *Pseudomonas viridiflava*; 9: *Enterobacter aerogenes*; 10: *Enterobacter cloacae*; 11: *Enterobacter mori*; 12: *Klebsiella oxycota*; 13: *Pantoea agglomerans*; 14: *Klebsiella variicola*; 15: *Bacillus* sp.; 16: amostra controle sem DNA. (B): Isolados de *Xam*. 1: IBSBF 278; 2: IBSBF 1998; 3: IBSBF 291; 4: IBSBF 436, 5: CBEMF 9; e 6: controle negativo *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflora* (CBEMF 8). M: marcador DNA Ladder 200pb.50
- Figura 6.** Gel de agarose 1% com reação de PCR utilizando o DNA do isolado IBSBF 278 *Xam* em diferentes concentrações, seguindo a ordem: 100, 75, 50, 25, 1, 0,25 ng com três repetições cada (1, 2 e 3). A: Reação com os iniciadores XV e XK_MOD; B: Reação com os iniciadores XV e XK (VERDIER *et al.*, 1998). M: marcador DNA Ladder 200pb.....51

Figura 7. Gel de agarose a 1%. Produto de PCR do teste de detecção em plantas infectadas com *Xam*. 1: Tapioqueira (haste); 2: Cigana (folha); 3: Cigana (haste); 4: Salangor (folha); 5: Poti Branca (folha); 6: Poti branca branca (haste); 7: controle negativo (material vegetal não infectado com *Xam*); 8: controle positivo (isolado *Xam* IBSBF 278). M: marcador DNA Ladder 200pb.51

Figura 8. Gel de agarose a 1%. Produto de PCR do teste de detecção em diferentes fragmentos da haste. A – Acesso 962409; B – Caipira; C – Cigana; D – Tapioqueira; E – Kirirís; F – Poti Branca; G – acesso 98150-09; H – Solangor; I – Verdinha; T – Testemunha; X – Controles.....52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Espécies utilizadas para os testes de especificidade.....44

Tabela 2. Valores médios da análise da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para severidade de cada variedade.....53

RESUMO

MELO, R. C. C. Otimização da detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* por PCR e estudo da movimentação sistêmica

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) apresenta alto valor energético, tendo suas raízes ricas em carboidratos e sua parte aérea rica em proteína, sendo utilizada na alimentação humana e animal. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) é o agente causal da bacteriose da mandioca, a qual pode causar prejuízo na produção de até 100%. *Xam* é capaz de infectar toda a parte aérea da planta, afetando a planta em qualquer estágio do seu desenvolvimento. Para minimizar os danos ou mesmo impedir a disseminação da doença faz-se necessária a busca por métodos rápidos e eficientes de diagnose. Apesar de já existirem iniciadores descritos para a diagnose molecular de *Xam* por PCR, houve falha na tentativa de utilização nas populações amostradas, gerando a necessidade de modificação no iniciador reverso a fim de permitir o seu uso em procedimentos de diagnóstico de rotina. Assim, este trabalho teve como principal objetivo aprimorar a diagnose de *Xam* por PCR, utilizando um par de iniciadores modificado, em adição, uso deste na indexação de plantas e em estudos envolvendo a movimentação sistêmica da bactéria. A otimização da diagnose foi realizada utilizando um par de iniciadores (XV – XK_MOD), uma modificação no iniciador reverso já descrito em literatura, em que houve a retirada dos dois nucleotídeos iniciais. Para os testes de validação dos iniciadores, foram utilizadas cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, um *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, quatro isolados de espécies fitopatogênicas gram negativas, seis espécies de bactérias endofíticas isoladas de material vegetal de mandioca associadas à sintomas de bacteriose e, uma amostra de bactéria Gram positiva. O limite de detecção foi avaliado utilizando seis diluições do DNA de *Xam*. Houve amplificação do DNA de *Xam* e nas concentrações de 100, 75, 50 e 25 ng. Os iniciadores também foram capazes de detectar o patógeno em haste e folhas de mandioca com sintomas e em diferentes partes da haste infectada, sintomática e assintomática, tornando o método de diagnose mais eficiente. Além disso, foi verificada a possível utilização dos iniciadores no estudo da movimentação sistêmica da bactéria e sua possível relação com a resistência de diferentes variedades de mandioca. Para isso, nove variedades foram inoculadas com *Xam*, tendo o seu DNA total extraído de quatro diferentes pontos na haste para posterior

utilização na PCR. Este procedimento permitiu verificar a movimentação sistêmica da bactéria nos diferentes genótipos, entretanto, não houve correlação entre a movimentação sistêmica da bactéria e resistência da planta hospedeira.

Palavras-chave: Doenças da mandioca, Controle de doenças, *Xam*, Dinâmica da bacteriose.

ABSTRACT

MELO, R. C. C. Optimization of detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR and study of systemic movement.

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is highly energetic, with its roots rich in carbohydrates and shoots rich in protein is used for food and feed. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) is the causal agent of cassava bacterial blight, which can lead to losses in production up to 100%. *Xam* is capable of infecting all aerial parts of the plant, affecting the plant at any stage of its development. To minimize damage or even prevent the spread of the disease it is necessary to search for fast and efficient methods of diagnosis. Although there are primers described for the molecular diagnosis of *Xam* PCR, an attempt to use the sampled populations failed, creating the need for change in the reverse primer to allow its use in routine diagnostic procedures. This work aimed to enhance the diagnosis of *Xam* by PCR using a modified pair of primers, and indexation of plants and studies involving systemic movement of bacteria. The optimization of the diagnosis was carried out using a pair of primers (XV - XK_MOD), a modification in the reverse primer described in literature, in which there was the removal of the first two nucleotides. For the test of the validation of the primers five isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* one *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* four strains of gram-negative plant pathogens, six species of endophytic bacteria isolated from cassava plant material associated with symptoms of fire blight, and one Gram positive sample, were used. The detection limit was evaluated using six *Xam* DNA dilutions. There was *Xam* amplification of DNA and the concentrations of 100, 75, 50 and 25 ng. The primers were also capable of detecting the pathogen in the stem and cassava leaves with symptoms and in different parts of the infected stem, symptomatic and asymptomatic, making the diagnosis a more efficient method. Furthermore, the possible use of the primers in the study of systemic movement of bacteria and their possible relationship with the resistance of different cassava varieties was detected. Furthermore, nine varieties were inoculated with *Xam*, and their total DNA isolated from four different points in the stem for subsequent use in PCR. This procedure demonstrated the systemic movement of bacteria in different genotypes, however, there was no correlation between systemic movement of bacteria and host plant resistance.

Keywords: Cassava Disease, Disease Control, *Xam*, Dynamics of bacterial blight.

INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), pertencente à família *Euphorbiacea*, apresenta alto valor energético, tendo suas raízes ricas em carboidratos de grande importância na alimentação humana e animal e, sua parte aérea, rica em proteína. Essa cultura possui crescente importância no mundo tropical, sendo utilizada na alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas em todo o mundo, além de ser estratégica na mitigação da pobreza e diminuição do êxodo rural, já que é produzida principalmente por agricultores familiares e em pequenas propriedades, geralmente de baixa renda (NASSAR *et al.*, 2001; CARVALHO, 2006; Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2014).

De fácil adaptação, a mandioca é cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os dez primeiros produtos agrícolas do País, em termos de área cultivada, e, em quantidade de produção, estando entre os cinco produtos agrícolas mais produzidos (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2013).

Apesar de ser uma cultura bastante tolerante às condições edafoclimáticas marginais, a mandioca é afetada por muitas pragas e doenças, o que compromete significativamente sua produção e comercialização (LÓPEZ; BERNAL, 2012). Dentre as doenças que acometem esta cultura, a bacteriose da mandioca, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), é uma das doenças mais destrutivas (LOZANO, 1986; FOKUNANG *et al.*, 2000; VERDIER *et al.*, 2001).

Xam é uma bactéria Gram negativa com forma de bastonete pertencente à Família Xanthomonadaceae, a qual foi identificada pela primeira vez no Brasil em 1912 em São Paulo e atualmente é amplamente disseminada em áreas de produção de mandioca no mundo (BONDAR, 1912 *apud* VERDIER *et al.*, 1992; MASSOLA; BENDENDO, 1997; RYAN *et al.* 2011). A bactéria pode penetrar no tecido da planta por estômatos, hidatódios e por ferimentos, sendo capaz de infectar toda a parte aérea, afetando a planta em qualquer estágio do seu desenvolvimento. Os prejuízos causados por esta bactéria na produção podem variar de 5 a 100%, dependendo das condições climáticas, variedades utilizadas, inóculo inicial e variação na virulência/agressividade de isolados desta bactéria (MARAITE, 1993; MASSOLA; BENDENDO, 1997; VERDIER, *et al.*, 2001; LÓPEZ; BERNAL, 2012).

As doenças de plantas são responsáveis por grandes perdas na produção agrícola mundial, sejam causadas por fungos, bactérias, vírus ou outros micro-

organismos, juntamente com pragas que aumentam o desequilíbrio de tal produção (SANKARAN, 2010). Neste contexto, métodos de diagnose sensíveis, específicos e rápidos, são primordiais no estudo e trabalhos da Fitopatologia, uma vez que a detecção do patógeno no tecido vegetal é extremamente importante para subsidiar estudos de métodos de controle e erradicação da doença (MENDONZA, 2012). No Brasil, o estudo sobre diagnose de *Xam* ainda é escasso, no entanto, Verdier *et al.* (2001) realizaram um trabalho de comparação de técnicas já desenvolvidas utilizadas para detecção de *Xam* - ELISA, PCR, Nested-PCR e Dot-blot, a fim de verificar qual técnica possuía o melhor desempenho, onde verificou-se que o método de PCR foi o mais rápido e específico.

Embora Verdier *et al.* (1998) tenham desenvolvido um método eficiente de detecção de *Xam* utilizando iniciadores específicos, testes realizados no Laboratório de Virologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, utilizando estes iniciadores específicos, não foi possível verificar a amplificação do fragmento esperado, mesmo após sucessivas tentativas de amplificação e otimização das condições de PCR (dados não publicados). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar as condições que causaram a ausência de amplificação com os iniciadores específicos descritos em literatura, propor modificações em um dos iniciadores a fim de permitir a amplificação da região alvo e validar a utilização deste novo par de iniciadores na identificação de isolados de *Xam*, bem como seu uso na indexação de plantas e em estudos envolvendo a movimentação sistêmica da bactéria.

OBJETIVO GERAL

- Otimizar a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), agente causal da bacteriose da mandioca, por PCR, e avaliar sua aplicação na indexação e estudo da movimentação sistêmica da bactéria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificar os iniciadores propostos por Verdier *et al.* (1998);
- Validar o par de iniciadores modificado;
- Realizar amplificação específica com isolados de *Xam*;
- Detectar, por meio da PCR, a presença de *Xam* em tecido vegetal infectado;
- Realizar análise exploratória do uso dos iniciadores como ferramenta de estudos da movimentação da bactéria na planta;
- Relacionar a movimentação sistêmica da bactéria e a resistência da planta.

CAPÍTULO I

Revisão de literatura

1 A cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e sua importância

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), conhecida em outros países como “yuca” (Espanhol), “manioc” (Francês), “manihot”, “cassava” (Inglês), “cassave” (Holandês), “tapioca” (países da Ásia) e “maniok” (Alemão) (FAO, 2000), teve sua origem na América do Sul e hoje seu cultivo encontra-se distribuído em mais de 100 países, principalmente da América do Sul, África e Ásia (NASSAR *et al.*, 2008). Esta cultura pertence ao gênero *Manihot*, o qual é constituído por cerca de 100 espécies, das quais a mandioca detém grande valor e é amplamente cultivada (FAO, 2013).

O cultivo dessa cultura garante diretamente o sustento de mais de 500 milhões de agricultores em todo o mundo (FAO, 2014). Uma prática que gera emprego e renda principalmente para famílias de baixa renda, por ser uma cultura bastante versátil, sendo aproveitadas todas as suas partes, podendo ser consumida *in natura* ou na forma de doces, beijus e farinha (AKINBO *et al.*, 2012; Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2013).

Em 2012, a produção mundial desta cultura alcançou aproximadamente 270 milhões de toneladas, ocupando a nona posição em relação aos produtos agrícolas mais produzidos mundialmente, tendo como maiores produtores a Nigéria, Tailândia, Indonésia e, em quarto lugar, o Brasil com cerca de 23 milhões de toneladas (FAO, 2014). Em 2013, o Brasil alcançou uma produção em torno de 21,2 milhões, com uma estimativa de 23,5 milhões de toneladas para 2014. Neste cenário brasileiro, a região Nordeste se destaca com grande produção, aumentando 12,8% em relação ao ano anterior, tendo a Bahia como o terceiro estado com maior produção, chegando a janeiro de 2014 com aproximadamente 2,5 milhões de toneladas (Fig. 1) (IBGE, 2014; CONAB, 2014).

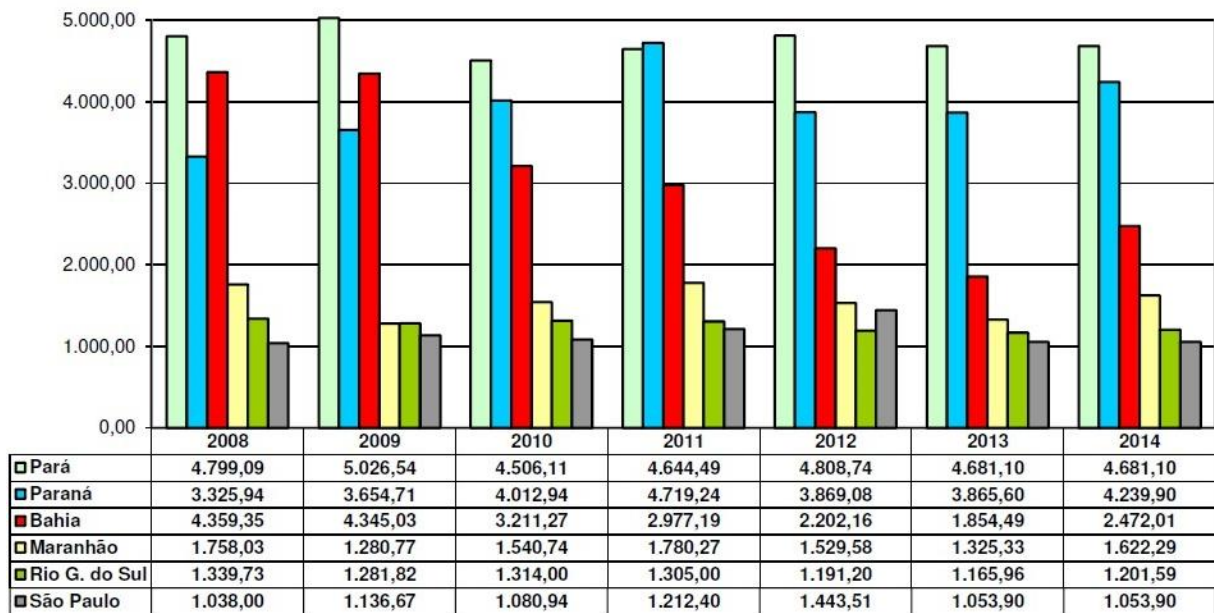


Figura 1. Produção de raiz de mandioca em milhões de toneladas nos principais estados brasileiros ao longo dos anos 2008 a janeiro de 2014. Fonte: IBGE elaborado pela CONAB.

Esta expressiva produção mundial de mandioca tem aumentado ao longo dos anos. Em 2012, um estudo da FAO estimou um aumento da produção mundial de 60% em relação ao ano 2000 (FAO, 2013).

Há uma grande variedade fenotípica dentro da espécie *M. esculenta* Crantz. Suas raízes podem ser cônicas, cilíndricas ou irregulares, pouco fibrosas e espessas lateralmente, com coloração creme, amarela e marrom claro a escuro, com superfície lisa; suas folhas podem apresentar-se com 3 a 11 folíolos, sendo lisos ou enrolados, arranjados em forma de espiral em torno do pecíolo, características estas que as diferem da maioria das espécies selvagens, as quais apresentam suas raízes mais fibrosas e esguias além de possuírem superfície áspera e, com algumas espécies alcançando mais de 20 metros de altura (NASSAR, 2001; FAO, 2013).

Além dessas características fenotípicas que ajudam na adaptação a diferentes ambientes, a mandioca é bastante tolerante às condições edafoclimáticas marginais, sendo eficiente na obtenção da água e dos nutrientes do solo. Portanto, tem o potencial de produzir rendimentos consideráveis usando poucos aditivos agrícolas ou mesmo nenhum, o que permite que esta seja cultivada em diferentes ecossistemas, dispendo de pouco investimento para implantação e manejo do mandiocal (THOMSON, 2008; DUPUTIE´ *et al.*, 2011; FAO, 2013).

Ao longo dos anos, a observação das vantagens quando se utiliza a mandioca em diferentes áreas, bem como as deficiências nutricionais e de

suscetibilidade das principais variedades utilizadas economicamente às pragas e doenças, despertou o interesse de implementação de estudos envolvendo a mandioca principalmente no que tange ao melhoramento genético.

Dentre as vantagens em utilizar a mandioca pode-se citar: o estímulo ao desenvolvimento rural; substituição de importações, uma vez que a farinha de mandioca pode ser utilizada na substituição da farinha de trigo; cultura adaptada às mudanças climáticas, um fator que já é uma realidade mundial (FAO, 2013); cultura geralmente disponível durante todo o ano, dependendo das condições ambientais e de plantio; utilização em novos produtos industriais; fonte renovável de energia, com a produção de etanol (THOMSON, 2008; NASSAR *et al.*, 2008; FAO, 2013). Por outro lado, a raiz tuberosa da mandioca, parte mais utilizada para a alimentação de milhões de famílias de baixa renda, apresenta uma deficiência nutricional de vitamina A, ferro e zinco, importantes micronutrientes indispensáveis para a nutrição e saúde humana (BLAGBROUGH *et al.* 2010).

Tais variações fenotípicas e genéticas estão relacionadas à diversidade da espécie. O Brasil é o maior centro de diversidade de espécies do gênero *Manihot* (NASSAR *et al.*, 2008) e muitos Bancos de Germoplasma foram criados para a preservação da diversidade deste gênero, uma vez que eles abrangem variedades muito antigas, variedades novas – melhoradas geneticamente - e as silvestres (VIEIRA *et al.*, 2008). Estas variedades são muito utilizadas para diversos fins em prol da melhoria da cultura, tanto nutricional, como para resistência a doenças, doenças estas que representam prejuízos significativos para a produção de mandioca mundial.

Na Embapa Mandioca e fruticultura encontra-se o maior Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Manihot esculenta* e *Manihot* ssp. do Brasil e o segundo maior da América Latina, compreendendo cerca de 1271 acessos de diferentes ecossistemas, contribuindo para diversos programas de melhoramento da mandioca no Brasil e outros países da América Latina e da África (EMBRAPA, 2014).

No entanto, alguns fatores limitam a produção vegetal de qualidade e dentre elas, as doenças causadas por bactérias são responsáveis por perdas significativas na produção de culturas de grande valor econômico, sejam agindo individualmente ou em associação com outros patógenos, pragas ou condições climáticas desfavoráveis ao hospedeiro (BERIAM, 2007; SANKARAN *et al.*, 2010; MANSFIELD *et al.*, 2012). Tamanha importância das bactérias como causadoras de doenças em

plantas não se deve somente ao fato que estas são extremamente severas às culturas de grande importância econômica, mas também ao fato que são facilmente disseminadas entre regiões produtoras e também pela dificuldade que existe em encontrar métodos de controle eficientes. Como mostrado no trabalho realizado por Night *et al.* (2011) em Ruanda (Continente Africano), por exemplo, onde a mandioca é a terceira cultura alimentar mais importante, as pragas e doenças causam prejuízos significativos na produção, a exemplo da mosca branca, cochonilha, ácaro verde, vírus causador do mosaico da mandioca, podridões radiculares causadas por fungos e, a bacteriose da mandioca, que é uma das doenças mais importantes da cultura.

2 Bacteriose da mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*)

O gênero *Xanthomonas* (do grego “*xantho*” amarelo e “*monas*” entidade), é formado por bactérias Gram negativas, aeróbicas com forma bacilar e monotríquia (um único flagelo polar), pertencente à Família Xanthomonadaceae, bactérias estas que apresentam como característica em comum a produção de xantomonadina (pigmento que confere coloração amarelada à colônia), com exceção apenas de *Xam*, a qual não produz tal pigmento, apresentando então, coloração esbranquiçada (SCHAAD *et al.*, 2001; MAYER, 2006; FACINCANI, 2007; RYAN *et al.*, 2011).

O gênero das *Xanthomonas* apresenta grande diversidade patogênica, compreendendo cerca de 27 espécies de bactérias identificadas que causam doenças em aproximadamente 400 hospedeiros vegetais. Muitas destas espécies apresentam inúmeros patovares, cerca de 80 já conhecidos, os quais possuem alto grau de especificidade com diferentes hospedeiros e, dentre estes hospedeiros, muitos de importância econômica, gerando perdas expressivas na produção (SCHAAD *et al.*, 2001; RYAN *et al.*, 2011).

Em estudo comparativo do genoma de várias espécies do gênero *Xanthomonas*, Ryan *et al.* (2011), perceberam um grande número de transições e transversões, e um grande conjunto de sequências de inserção presentes no genoma das bactérias, os quais podem estar diretamente relacionado à diversidade genômica do grupo e com a ampla gama de plantas hospedeiras e tecidos do hospedeiro que estas bactérias são capazes de colonizar, além de suas adaptações diante de tamanha diversidade. Embora ainda não se compreenda totalmente esta relação genotípica

com a patogenicidade das espécies, alguns casos específicos tornam possível a elaboração de algumas hipóteses, como o caso de *Xanthomonas albilineans*, uma espécie que tem apresentado em suas linhagens um genoma reduzido, em comparação às outras espécies deste gênero, podendo-se pensar que pode estar associado ao fato que esta seja encontrada quase que exclusivamente dentro do xilema da cana de açúcar, sua planta hospedeira (RYAN *et al.*, 2011).

No gênero *Xanthomonas*, existem alguns genes relacionados à patogenicidade que estão presentes em todas as espécies deste grupo (RYAN *et al.*, 2011), estes envolvidos na produção de um arsenal de proteínas que permitem a colonização e a sobrevivência da bactéria no tecido hospedeiro e o gene *Hrp* (reação de hipersensibilidade e patogenicidade) que codifica para o Sistema de secreção tipo III (T3SS), são bastante conservados nesse grupo e essencial para a patogenicidade das bactérias (TRINDADE, *et al.*, 2007; RYAN *et al.*, 2011).

As doenças de plantas são responsáveis pelas maiores perdas na produção agrícola mundial, sejam causadas por fungos, bactérias, vírus ou outros micro-organismos juntamente com pragas que aumentam o desequilíbrio de tal produção (SANKARAN *et al.*, 2010). A bacteriose da mandioca é uma das doenças mais importantes da mandioca, a qual é causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) (MASSOLA; BEDENDO, 1997; LÓPEZ; BERNAL, 2012).

Em laboratório, o cultivo desta bactéria pode ser feito em meios de cultura artificiais (Fig. 2). *Xam* se apresenta apigmentada, não produzindo xantomonadina (pigmento amarelo) como as demais *Xanthomonas*, as colônias são côncavas, brilhantes e de bordas lisas, com aspecto mucóide e crescem em temperatura ideal de 28 °C (SCHAAD *et al.*, 2001; DESTÉFANO; ROGRIGUES NETO, 2012).

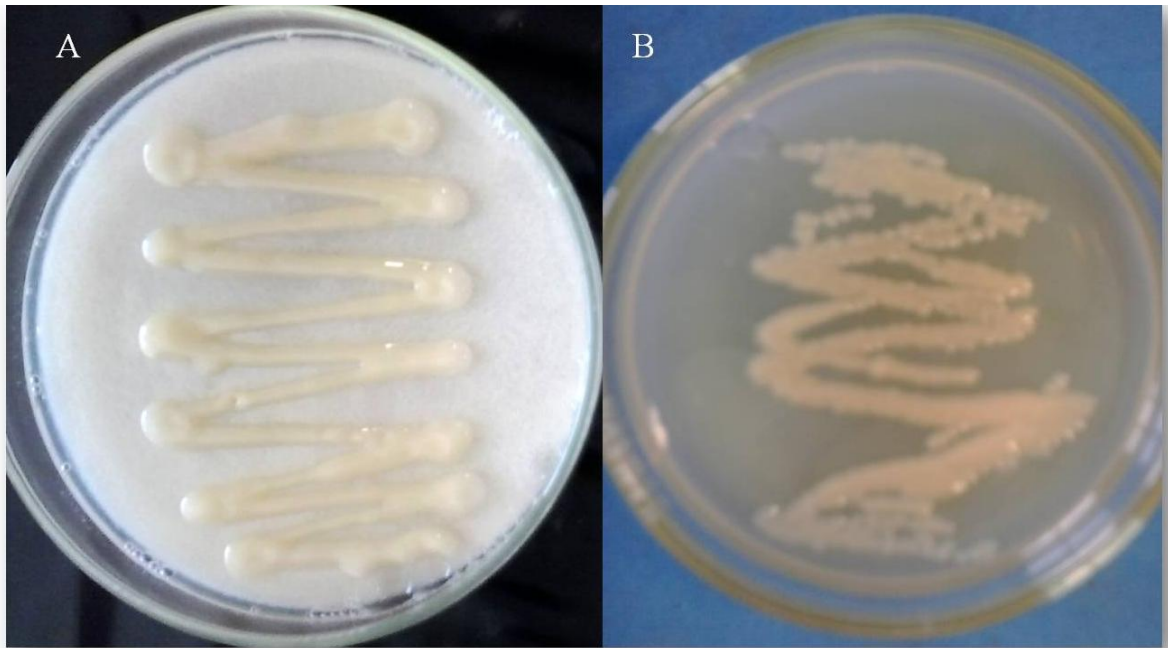


Figura 2. Aspecto das colônias de *Xam* em meios de cultura. **A:** 48 horas de crescimento em 28 °C em meio YDC (SCHAAD, 2001); **B:** 48 horas de crescimento a 28 °C em meio YPG (VERDIER *et al.*, 1998). Fotos: Rita Melo.

Em *Xam* foi constatado um alto nível de diversidade patogênica em estudo em distintas zonas edafoclimáticas e com isolados de diferentes países, apresentando diferenças tanto na velocidade do desenvolvimento dos sintomas, quanto na agressividade dos diferentes isolados (VERDIER *et al.*, 1993; BOHER ; VERDIER, 1994; RESTREPO *et al.*, 2000, 2000a). *Xam* é capaz de desenvolver diferentes sintomas, colonizar o mesofilo e o sistema vascular, sendo considerada uma das únicas bactérias fitopatogênicas a causar tal variedade de sintomas no hospedeiro, o que reflete na dificuldade em desenvolver métodos de controles eficientes (VERDIER *et al.*, 2001; OGUNJOBI, *et al.*, 2008; RYAN *et al.*, 2011; MASFIELD *et al.*, 2012).

Em 2012 *Xam* foi considerada umas das 10 mais importantes bactérias causadoras de doenças em plantas de importância econômica, ocupando a 6ª posição (MANSFIELD *et al.*, 2012). Detectada pela primeira vez em São Paulo em 1912, atualmente encontra-se distribuída em todas as regiões produtoras de mandioca do mundo, sendo considerada uma doença de importância internacional, causando perdas significativas na produção (LOZANO, 1986; BONDAR, 1912 *apud* VERDIER *et al.*, 1992; VERDIER *et al.*, 2004).

Inicialmente *Xam* cresce epifiticamente, multiplicando-se principalmente em locais de maior umidade (como próximo das regiões de exsudação dos hidatódios),

o que contribui para uma penetração mais eficiente, uma vez que o inóculo inicial aumenta (LOZANO, 1986; BOHER; VERDIER, 1994; VERDIER *et al.*, 2004). A penetração ocorre principalmente por meio de aberturas estomáticas e por hidatódios, regulada por ciclos de mudanças de umidade, e por ferimentos do tecido vegetal, a partir daí, os sintomas são de lesões angulares nas folhas, exsudação na haste de coloração esbranquiçada, necrose da haste, morte de ponteiros e murcha da planta (Fig. 3). A infecção pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo mais comum em tecidos mais jovens, com aparecimento dos sintomas com 11 a 13 dias após a penetração da bactéria (LOZANO, 1986; VERDIER *et al.*, 2004; RYAN *et al.*, 2011; DESTÉFANO; ROGRIGUES NETO, 2012).

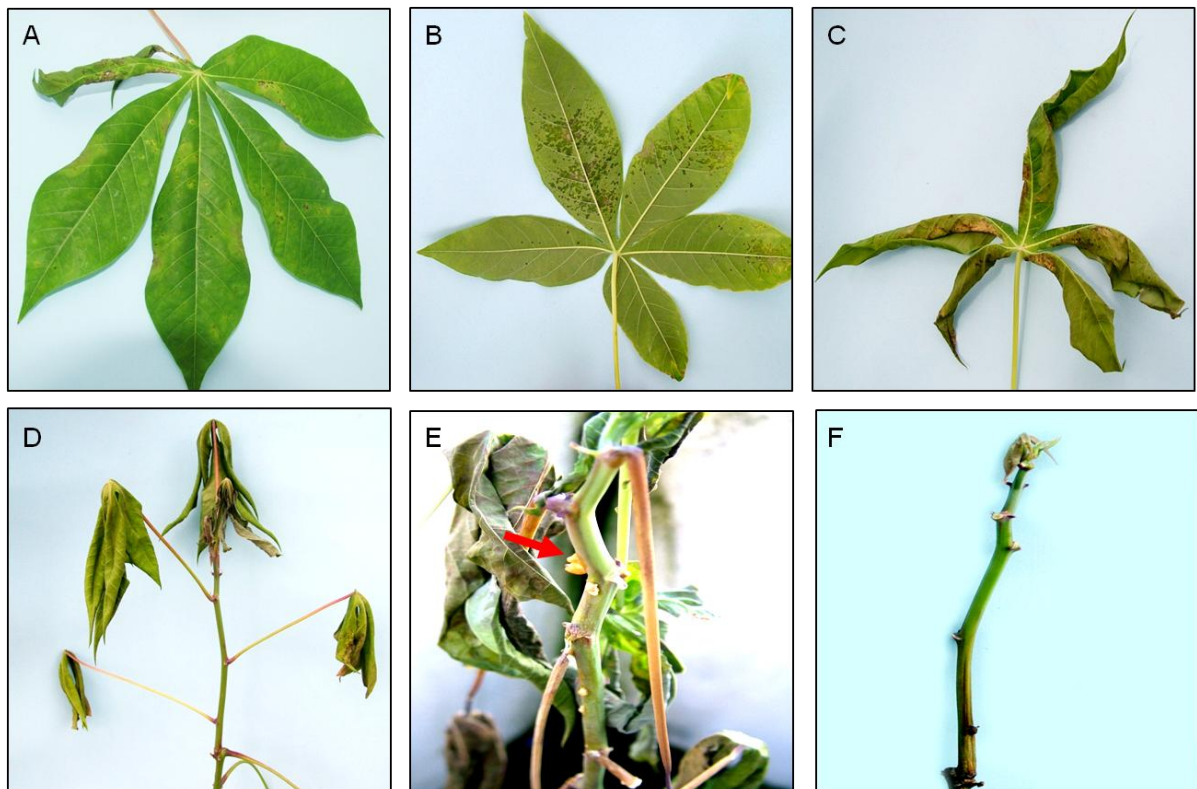


Figura 3. Diferentes sintomas causados por *Xa* em plantas suscetíveis de mandioca. **A** – Início do aparecimento dos sintomas com pequenos pontos amarelos nas folhas. **B** – Lesões angulares na folha com aspecto encharcado. **C** – Necrose da folha. **D** – Murcha das folhas. **E** – Exsudação na haste. **F** – Morte da ponteira e perda das folhas. Fotos: Miguel A. Dita.

Com o avanço da doença, os sintomas se intensificam, ocasionando a morte precoce da planta, principalmente quando a planta hospedeira e as condições ambientais são altamente propícias para o desenvolvimento do patógeno. Para o bom desenvolvimento da doença e sobrevivência do patógeno, as condições ambientais ideais devem ser temperatura em torno de 28 °C, com vento e chuva ou,

alta umidade (LÓPEZ; BERNAL, 2012). Essa doença pode-se apresentar em variadas intensidades, dada à diversidade tanto das variedades de mandioca como também do patógeno (PORTZ *et al.*, 2006).

A doença é disseminada principalmente por manivas, que são utilizadas para a propagação vegetativa da mandioca, entre locais que muitas vezes estão livres de doença e apresentam cuidados fitossanitários precários (LOZANO; SEQUEIRA, 1973).

Dentro de um mandiocal, a disseminação ocorre por meio de ferramentas infectadas, respingos de chuva que espalham o inóculo bacteriano e contato entre plantas sadias e infectadas. Além disso, o movimento do homem e de animais dentro do mandiocal, principalmente em épocas chuvosas, pode aumentar o processo de disseminação (LOZANO, 1986; RESTREPO *et al.*, 2000). Material de plantio livre de infecção e de alta qualidade genética para produção é uma das formas mais indicadas para evitar a disseminação da doença e ter uma renda significativa da produção (FAO, 2013).

As formas de controle mais indicadas da bacteriose são: (i) uso de variedades resistentes (método mais eficiente), (ii) práticas culturais – rotação de cultura, melhoria nas condições nutricionais da cultura, material propagativo (maniva) livre de doença, plantio no final da estação chuvosa, podas, retirada do material infectado do campo (pouco eficiente, mas utilizado quando as condições para o desenvolvimento do patógeno na planta não são favoráveis) - e (iii) adoção de medidas fitossanitárias, barreiras que evitam a disseminação do patógeno entre regiões, que podem ser através de regulamentos, processos e métodos de produção, testes diagnósticos, inspeção, tratamentos de quarentena (LOZANO, 1986; BOHER; VERDIER, 1994; LÓPEZ; BERNAL, 2012).

Apesar de existirem medidas de controle para bacteriose da mandioca, é necessária a aplicação de técnicas rápidas e precisas de diagnose para prevenir o transporte de material de plantio infectado entre regiões, o que representa um dos primeiros passos para a disseminação da doença.

3 Diagnose utilizando iniciadores (*primers*) moleculares

Pode-se definir diagnose ou diagnóstico como método por meio do qual se identifica uma doença (EIRAS; GALLETI, 2012). Este método é um fator muito significativo no estudo e trabalhos da fitopatologia, uma vez que a detecção precisa do patógeno no tecido vegetal é extremamente importante para se determinar, recomendar métodos de controle e erradicar a doença no local. Uma diagnose eficaz se dá inicialmente com uma investigação precisa e detalhada do comportamento do patógeno em relação ao hospedeiro, sua etiologia, do entendimento da influência dos fatores ambientais no desenvolvimento deste e sua identificação utilizando características morfológicas, biológicas, culturais e/ou moleculares (MENDONZA, 2012; EIRAS; GALLETI, 2012). Este procedimento evita que a doença se instale em locais ainda livres, como também permite, uma vez o patógeno já instalado no local, medidas de controles rápidas e eficientes.

Como demonstrado no trabalho de Horie (2007), muitas doenças podem ser evitadas em regiões ainda isentas, utilizando-se um método diagnóstico eficiente, principalmente quando produtores introduzem culturas oriundas de outras regiões ou países, dessa forma, evitando a introdução de patógenos exógenos. Além do mais, pode-se proporcionar medidas de controles que vão agir diretamente sobre o patógeno. Este fato é importante, pois muitos países possuem a agricultura como base da economia, havendo sempre exportação e importação de produtos e, sendo muito dos patógenos limitantes do processo produtivo, é de extrema importância o desenvolvimento e aplicação de métodos diagnósticos precisos para garantir a sanidade e qualidade dos produtos agrícolas (EIRAS; GALLETI, 2012)

O diagnóstico de fitobactérias pode ser feito de forma presuntiva (por meio dos sintomas e observação em campo) ou por diagnóstico em laboratório, o qual envolve várias técnicas, que vão desde a coleta de material e anotações das condições do desenvolvimento da doença – local, hospedeiro, práticas culturais realizadas, evolução dos sintomas, condições ambientais – até técnicas mais desenvolvidas de detecção, como: identificação dos sintomas e sinais (com testes de exsudação, obtenção de cultura pura, teste de reação de hipersensibilidade, características das colônias), testes bioquímicos, sorológicos e moleculares (ROMEIRO, 2001; DESTÉFANO; RODRIGUES NETO, 2012).

A diagnose não é um processo tão simples. Alguns métodos, aqueles mais convencionais, como o morfológico, que se baseia na comparação dos sintomas com os já descritos em literatura, detecção indireta utilizando imunoenaios (ELISA), avaliação macroscópica dos tecidos danificados, observação direta do patógeno no tecido lesionado, apresentam limitações, embora sejam de grande valor, principalmente no que se refere à detecção precoce do patógeno.

Estes métodos não são tão sensíveis e específicos quanto às técnicas modernas baseadas em biologia molecular, uma vez que, cada grupo de patógeno possui características específicas, necessitando de procedimentos que garantam a especificidade e sensibilidade em cada caso, tanto para o diagnóstico, quanto para o controle (AMORIM; SALGADO, 1995; GUIMARÃES; SÁ, 2002; EIRAS; GALLETI, 2012).

Com a diminuição do custo das técnicas moleculares e biotecnológicas e com as novas descobertas na área da genética, houve um grande avanço no desenvolvimento de técnicas de detecção de micro-organismos, principalmente aquelas envolvendo tecnologia de DNA, o que facilitou o conhecimento e entendimento de sequências, estrutura e funcionamento do material genético, permitindo o desenvolvimento de métodos moleculares baseados em sequências específicas do patógeno, tornando a detecção muito mais específica e sensível (GUIMARÃES; SÁ, 2002; KUMAR *et al.*, 2011; FAO, 2013).

A técnica mais importante baseada na análise do DNA, que é extensivamente utilizada em várias áreas da ciência, é a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), a qual foi desenvolvida por Kary Mullis em 1987 e desde então vem possibilitando a criação de métodos variados aplicáveis em diferentes ramos da pesquisa (GUIMARÃES; SÁ, 2002; DESTÉFANO; RODRIGUES NETO, 2012).

O sequenciamento da região 16S, a análise e comparação de fragmentos específicos do genoma estão entre as técnicas, muitas vezes, baseadas em PCR utilizadas para identificação de bactérias, contudo, a utilização de iniciadores específicos nas reações de PCR a fim de identificar fitopatógenos é a mais utilizada, dada a sua especificidade, rapidez e eficiência de execução (ENGELBREKTSON, *et al.*, 2010; DESTÉFANO; RODRIGUES NETO, 2012; KLINDWORTH, *et al.*, 2013).

Estes iniciadores são pequenos fragmentos sintéticos de DNA de fita simples que normalmente possuem entre 15 a 30 nucleotídeos e que são complementares a sequências que flanqueiam a região alvo a qual se quer amplificar, propiciando a

reprodução da região específica ou, muitas vezes, exclusiva do genoma do patógeno (GUIMARÃES; SÁ, 2002; DESTÉFANO; ROGRIGUES NETO, 2012). Estes podem ser utilizados para variados fins de pesquisa, amplificação de regiões conservadas para estudos filogenéticos e identificação de espécies, detecção de regiões que codificam enzimas específicas e, muito importante para fitopatologia, detecção de fitopatógenos, e devem apresentar características ideais para um bom funcionamento (GUIMARÃES; SÁ, 2002; ADIKINI *et al.*, 2011).

Muitas dessas características estão relacionadas ao conteúdo CG, as quais apresentam tripla ligação de hidrogênio, caracterizando uma ligação do iniciador com a fita molde mais forte; a região do DNA alvo da qual o iniciador será desenhada, a qual necessariamente deve ser específica do patógeno. O tamanho do iniciador pode influenciar na especificidade do mesmo e na formação de estruturas secundárias.

A temperatura de *melting* (T_m), que é a temperatura em que metade dos iniciadores estão anelados à fita molde, é determinada levando em consideração principalmente a composição do iniciador; a repetição sequencial de uma fração do iniciador ou mesmo de uma única base. Essas características podem influenciar na formação de estruturas secundárias e de dímeros, comprometendo a amplificação da região desejada, uma vez que a quantidade de iniciadores disponíveis é comprometida por tais formações e o anelamento com a região alvo é dificultada. Tais fatores são cruciais para uma eficiente reação de PCR (WENSING, *et al.*, 2011; PREMIERBIOSOFT, 2014).

Em trabalhos como o de Wensing *et al.* (2011), os mesmos mostram que, além da eficiência na detecção do agente etiológico da doença, quando o iniciador é desenhado com base em uma região específica do DNA alvo, esta é mais rápida e específica, uma vez que há inúmeras bactérias endófitas associadas à doença e, que muitas vezes, confundem os resultados, quando se utiliza outros métodos de diagnose menos específicos, dificultando a diagnose.

Iniciadores específicos já vêm sendo utilizados há bastante tempo. Audy *et al.* (1994 e 1996) visando a diagnose rápida e específica de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e *X. c.* pv. *phaseoli* var. *fuscans* causadoras do crestamento bacteriano do feijoeiro, baseada na reação de PCR, desenvolveram iniciadores específicos utilizando várias amostras bacterianas de diferentes países, no intuito de tornar a detecção rápida e eficiente, evitando falsos positivos, os quais eram comumente

gerados por métodos menos específicos ainda utilizados. Em 2001, Halfeld-Vieira *et al.* verificaram a eficiência destes iniciadores em vários isolados *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e *X. c.* pv. *phaseoli* var. *fuscans* de diferentes regiões produtoras do Brasil, dada a sua grande importância econômica e necessidade de um método de diagnóstico preciso.

Silva (2011) desenvolveu iniciadores específicos para detecção de *Erwinia psidii*, bactéria causadora da bacteriose ou seca dos ponteiros da goiabeira encontrada apenas no Brasil até 2011, a qual causa danos significativos em plantios de goiabeira. Silva (2011) utilizou sequências parciais específicas do gene *recA*, para *E. psidii*, o qual codifica a recombinase A.

Trindade *et al.* (2007) e Adikini *et al.* (2011) desenvolveram iniciadores específicos para dois patovares da espécie *Xanthomonas campestris* utilizando regiões específicas dos genes *Hrp* (reação de hipersensibilidade e patogenicidade), regiões estas que são altamente conservadas no gênero *Xanthomonas*, as quais podem ser utilizadas para diferenciação de estirpes de *Xanthomonas*, tanto em nível de espécie quanto de patovar (TRINDADE *et al.*, 2007). Em 2012, Freitas testou os iniciadores desenhados por Trindade (2007) para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, causadora do cancro bacteriano da videira, com o objetivo de otimizar um diagnóstico rápido e eficiente para este patógeno com base na reação de PCR.

Ao longo da evolução, as bactérias fitopatogênicas desenvolveram diversas estratégias para penetrar, colonizar e causar doença na planta hospedeira, estando essa capacidade associada a um arsenal de proteínas efetoras que são secretadas para as células hospedeiras. Em *Xam*, ao comparar isolados patogênicos e não patogênicos, foi encontrado apenas nos isolados não patogênicos a ausência de uma região, uma deleção de 8 kb no plasmídeo. O estudo desta região mostrou um novo fragmento de 3,6 kb que codifica a proteína *PthB* nas bactérias patogênicas, embora sua importância na patogenicidade de *Xam* seja clara, sua função fisiológica e molecular ainda não é bem conhecida. Essa proteína pertence à família das proteínas efetoras TAL (*Transcriptional Activator-Like proteins*), antes denominadas *avrBs3/PthA* (*Avirulence and pathogenicity*), classe de efetores tipo III, a qual está relacionada com sinais de localização nuclear, produção e exportação de proteínas durante a interação destas com seus hospedeiros, estando envolvida com a especificidade e virulência das fitobactérias com seus hospedeiros (VERDIER,

comunicação pessoal *apud* GONZALEZ *et al.*, 2002; RYAN *et al.*, 2011; GIL *et al.*, 2011; LÓPEZ; BERNAL, 2012; CASTIBLANCO *et al.*, 2013).

Com base na região que codifica a proteína *PthB* em *Xam*, Verdier *et al.* (1998) desenharam o par de iniciadores XV (5' -TTC-GGC-AAC-GGC-AGT-GAC-CAC-C-3') e XK (5' -TCA-ATC-GGA-GAT-TAC-CTG-AGC-G-3') utilizados para a diagnose molecular por PCR, o qual serviu como base para a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIKINI, S. *et al.* Development of a specific molecular tool for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. **Plant Pathology**, v. 60, p. 443–452, 2011.
- AKINBO, O.; LABUSCHAGNE, M.; FREGENE, M. Introgression of whitefly (*Aleurotrachelus socialis*) resistance gene from F₁ inter-specific hybrids into commercial cassava. **Euphytica**, vol. 183, p. 19-26. 2012.
- AMORIM, L.; SALGADO, C. L. Diagnose. In.: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**, São Paulo. Editora: Agnômica Ceres, p. 224-230. 1995.
- AUDY, P. *et al.* A rapid and Sensitive PCR-Basead Assay for Concurrent Detection of Bacteria Causing Common and Halo Bligghts in Bean Seed. **Techniques**. v. 86, n 4, p. 361-366, 1996.
- AUDY, P. *et al.* Detetion of the Bean Common Blinght Bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans* Using the Polymerase Chain Reaction. **Molecular Plant Pahology**, v. 84, n. 10, p. 1184-1192, 1994.
- BERIAM, L. O. S. Doenças bacterianas em hortaliças. **Palestra**. Instituto Biológico, São Paulo. v. 69, n. 2, p. 81-84. 2007.
- BLAGBROUGH, I. S. *et al.* Cassava: An appraisal of its phytochemistry and its biotechnological prospects. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1940–1951. 2010.
- BOHER, B.; VERDIER, V. Cassava bacterial blight in África: the state of knowledge and implications for designing control strategies. **African Crop Science Journal**, v. 2, nº 2, p. 505-509. 1994.
- CAMPANHA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB), 2013. Perspectivas para a agropecuária. v. 1 – Safra 2013-2014. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso: 26 ago. 2014.
- CARVALHO, P. C. L.; FUKUDA, W. M. G. Estrutura da planta e morfologia. In: **Aspectos socioeconômicos e agronômicos da mandioca**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas, p.:126-137. 2006.
- CASTIBLANCO, L. F. *et. al.* TALE1 from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* acts as a transcriptional activator in plant cells and is important for pathogenicity in cassava plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, p. 84–95. 2013.
- CONAB. MANDIOCA – RAIZ, FARINHA E FÉCULA: Período de 3 a 7/2/2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_02_12_09_50_34_conjunturamandioca03a07022014.pdf> Acesso: 26 ago. 2014.

DESTÉFANO, S. A. L.; RODRIGUES NETO, J. Bactérias. In.: EIRAS, M.; GALLETI, S. R. (Ed. Técnicos) Técnicas de diagnóstico de fitopatógenos. Editora: Devir Livraria. São Paulo. 2012.

DUPUTIE´, A. *et al.* Evolutionary biogeography of *Manihot* (*Euphorbiaceae*), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. **Journal of Biogeography**, v. 38, p. 1033–1043. 2011.

EIRAS, M.; GALLETI, S. R. Técnicas de diagnóstico de fitopatógenos. Editora: Devir Livraria, São Paulo. 2012.

EMBRPA, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1580205/cultivo-e-processamento-de-mandioca-sao-abordados-em-curso>> Acesso: 22 out. 2014.

ENGELBREKTSON, A. *et al.* Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. International Society for Microbial Ecology. **The ISME Journal**, v. 4, p. 642-647. 2010.

FACINCANI, A. P. **Análise proteômica do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2007. 170f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP. 2007.

FAO, 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/009/x4007e/X4007E03.htm>> Acesso em: 13 ago. 2014.

FAO, 2013. Save and Grow: Cassava a guide to sustainable production intensification. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)**. 2013.

FAO, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcids/index_en.html> Acesso: 13 ago. 2014.

FAOSTAT, 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso em: 13 ago. 2014.

FOKUNANG, C. N., *et al.* Evaluation of a cassava germplasm collection for reaction to three major diseases and the effect on yield. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, p. 63–71. 2000.

FREITAS, A. C. **Detecção molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *viticila* em videiras**. Dissertação (Mestrado). 2012. 90f. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

GIL, J. *et al.* LA PROTEÍNA PTHB DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* ES AUTOACTIVA EN ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO. **Acta biológica**. Colombiana, v. 16, n. 1, p. 109–120. 2011.

GONZALEZ. C. *et al.* Characterization of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* by PCR-based DNA fingerprinting techniques. **FEMS Microbiology Letters**. v. 215, p. 21-33, 2002.

GUIMARÃES, P. M.; SÁ, M. F. G. O uso de PCR na diagnose e caracterização de microrganismos. In.: MELO, I. S *et al.* (Eds). **Recursos genéticos & Melhoramento - Microrganismos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. p. 130-147.

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

HORIE, H. Studies on diagnosis, ecology, and control of plant diseases on various horticultural crops in Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 73, p. 414–417. 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2013. Indicadores IBGE: Estatística da produção agrícola. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201203.pdf > Acesso em: 05 fev. 2013.

IBGE. 2013. Indicadores IBGE: Estatística da produção agrícola. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201203.pdf > Acesso em: 05 fev. 2013.

KLINDWORTH, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1. 2013.

KUMAR, V. *et al.* Traditional and novel references towards systematic normalization of qRT-PCR data in plants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, p. 1455-1469. 2011.

LÓPEZ, C. E.; BERNAL, A. J. Cassava Bacterial Blight: Using Genomics for the Elucidation and Management of an Old Problem. **Tropical Plant Biol**, v. 5, p. 117–126. 2012.

LOZANO, J. C. Cassava bacterial blight: a manageable disease. **Plant Disease**, v. 70, p. 1089–1093. 1986.

LOZANO, J. C.; SIQUERA, L. Bacterial Blight of Cassava in Colombia: Epidemiology and control. **Phytopatology**, v. 63, p. 82-88. 1973.

MANSFIELD, J. *et al.* Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13 (6), p. 614–629. 2012.

MARAITE, H. *Xanthomonas campestris* pathovars on cassava, cause of bacterial blight and bacterial necrosis. *Xanthomonas*. **Chapman & Hall**, v. 1, p. 8–24. 1993.

MASSOLA, N. S. J.; BEDENDO, I. P. Doenças da mandioca, in: KIMATI, H. *et al.* **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ed: Agronômica Ceres, v. 2, p. 501-510. 1997.

MAYER, L. **Caracterização molecular de cepas de *Xanthomonas campestris* e *Xanthomonas axonopodis* pela técnica de AFLP e relação com a produção, reologia e composição química da xantana**. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado).

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

MENDONZA, S. R. *et al.* Developing plant-based vaccines against neglected tropical diseases: Where are we? **Vaccine**. v. 31, p. 40–48, 2012.

NASSAR, N. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz and wild relatives: Their relationships and evolution. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, p. 429-436. 2001.

NASSAR, N. *et al.* Cassava diversity in Brazil: the case of carotenoid-rich landraces. **Genetics and Molecular Research**. v. 6, p. 116-121. 2007.

NASSAR, N. *et al.* Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research**. v.7, p. 16-28. 2008.

NIGHT, G. *et al.* Occurrence and distribution of cassava pests and diseases in Rwanda. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 140, p. 492–497. 2011.

OUNJOBI, A. A. *et al.* Physiological Studies on *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* (Xam) Strains Isolated in Nigeria. **Advances in Biological Research**, v. 2 p. 90-96. 2008.

PORTZ, R. L. *et al.* Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum**. Agronomy. Maringá, v. 28, n. 3, p. 413-419. 2006.

PREMIER BIOSOFT, 2014. Disponível em: <http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html> Acesso: 18 jun. 2014.

RESTREPO, S. *et al.* AFLP fingerprinting : an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Microbiology**, v. 145, p. 107-114. 1999.

RESTREPO, S. *et al.* Characterization of pathotypes among isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. **Plant Pathology**, v. 49, p. 680-687. 2000a.

RESTREPO, S. *et al.* Genetic Structure and Population Dynamics of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia from 1995 to 1999. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 255–261. 2004.

RESTREPO, S. *et al.* Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, v. 90, p. 683-690. 2000.

RESTREPO, S.; VERDIER, V. Geographical Differentiation of the Population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4427–4434. 1997

ROMEIRO, R. S. Métodos em Bacteriologia de Plantas. **Editora UFV**. Viçosa, 2001.

- RYAN, R. P. *et al.* Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Reviews**, v. 9, p. 344 -355. 2011.
- SANKARAN, S. *et al.* A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Agriculture*, v. 72, p. 1–13. 2010.
- SAYRE, R. *et al.* The BioCassava Plus Program: Biofortification of Cassava for Sub-Saharan Africa. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, p. 251–72. 2011.
- SCHAAD, N. W. *et al.* Gram-negative bacteria: *Xanthomonas*. In.: SCHAAD, N. W. *et al.* (Eds). **Plant Pathogenic Bacteria**. Third Edition. The American Phytopathological Society. p. 175-200. Minnesota, 2001.
- SILVA, C. F. **Desenvolvimento e aplicação de um método para detecção molecular de *Erwnia psidii*, agente causal da seca dos ponteiros da goiabeira.** 2011. 77f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- SOUZA. L. D. *et al.* Exigências edáficas da cultura da mandioca. In: **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca.** Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas, 2006. p. 170-208.
- THOMSON, J. A. The role of biotechnology for agricultural sustainability in África. **Philosophical Transactions of the Royal society biological sciences**, v. 363, p. 905–913. 2008
- TRINDADE, L. C. *et al.* Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.16-23. 2007.
- VERDIER, V. *et al.* Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Microbiology**, v. 139, p. 2591-2601. 1993.
- VERDIER, V. *et al.* Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction. **Plant Dis.** v. 82, p. 79-83, 1998.
- VERDIER, V. *et al.* Molecular epidemiology of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* causal agent of cassava bacterial blight. **Plant Pathogenic Bacteria**. Ed. INRA, Versailles, France, n. 66, p. 9-12. 1992.
- VERDIER, V. *et al.* Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*–cassava interaction. **Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 573–584. 2004.
- 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, E. A. *et al.* Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa cerrados acessada por meio de descritores morfológicos. **Científica**, Jaboticabal, v.36, n.1, p. 56 – 67. 2008.

WENSING, A. *et al.* Detection of *Erwinia* species from the apple and pear flora by mass spectroscopy of whole cells and with novel PCR *primers*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 147–158. 2011.

CAPÍTULO II

Otimização da detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* por PCR e estudo da movimentação sistêmica

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista Brazilian Journal of Microbiology

Otimização da detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* por PCR e estudo da movimentação sistêmica

Rita de Cássia Cerqueira Melo¹, Carlos Augusto Dórea Bragança², Harllen Sandro Alves da Silva³, Saulo Alves Santos de Oliveira³.

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Av. Rui Barbosa, 710 Cruz das Almas, Bahia, Brasil, CEP: 44.380-000. E-mail: rita_ufrb@yahoo.com.br; ²Pós-Doutorado Embrapa Mandioca e Fruticultura, E-mail: carlosadbraganca@gmail.com; ³Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, E-mail: saulo.oliveira@embrapa.br, harllen.alves@embrapa.br.

RESUMO

Modificações foram realizadas nas condições de PCR a fim de detectar o problema da não amplificação do fragmento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* (*Xam*) utilizando o par de iniciadores já descrito, no entanto, não houve amplificação do fragmento esperado. Assim, o objetivo deste trabalho foi propor modificações nos iniciadores já descritos e validar a utilização destes na identificação de *Xam*, seu uso na indexação de plantas e em estudos envolvendo a movimentação sistêmica da bactéria. A otimização da diagnose foi realizada utilizando o par de iniciadores XV – XK_MOD, uma modificação do iniciador reverso descrito em literatura. Para a validação dos iniciadores foram utilizadas cinco amostras de *Xam*, um patovar de *Xanthomonas axonopodis*, quatro espécies Gram negativas fitopatogênicas, seis espécies de endofíticas isoladas de material vegetal da mandioca associadas à bacteriose e uma amostra Gram positiva. O limite de detecção de *Xam* foi de 25 ng. Houve detecção do patógeno em haste e folha de mandioca com sintomas e em diferentes partes da haste infectada, sintomática e assintomática de nove genótipos de mandioca, tornando o método de diagnose mais eficiente. Por meio da PCR, verificou-se a movimentação sistêmica da bactéria nos diferentes genótipos e sua possível relação com a resistência das plantas. Entretanto, a correlação não foi significativa.

Palavras chave: *Xam*, bacteriose da mandioca, diagnose molecular, resistência.

INTRODUÇÃO

No cenário brasileiro, a mandioca é o terceiro produto agrícola mais produzido, atrás apenas da cana-de-açúcar e milho e, além disso, dado ao seu grande valor energético, ela é bastante utilizada tanto na alimentação diária da população humana quanto na animal e também em setores industriais (SENA, 2006; AKINBO *et al.*, 2012; IBGE, 2014).

Apesar de ser uma cultura bastante tolerante às condições edafoclimáticas marginais, muitas pragas e doenças afetam significativamente sua produção e

comercialização. E dentre as doenças que acometem essa cultura, a bacteriose da mandioca, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), é uma das doenças mais importantes (LOZANO, 1986; FOKUNANG *et al.*, 2000; VERDIER *et al.*, 2001).

Os sintomas mais característicos são de requeima das folhas, incluindo mancha angular, murcha, exsudação, necrose da haste, tombamento e, com o avanço da doença, morte precoce da planta (LOZANO, 1986; MARAITE, 1993; VERDIER *et al.*, 2001; LÓPEZ; BERNAL, 2012). Quando oriundas de plantas infectadas, as manivas servem como fonte de inóculo primário para os próximos ciclos da cultura, uma vez que *Xam* infecta a haste e o sistema vascular e, na maioria das vezes, apresentam-se assintomáticas sendo levadas para regiões livres da doença (LOZANO, 1986; FOKUNANG, *et al.*, 2000; LÓPEZ *et al.*, 2012). Como forma de controle, indica-se o uso de variedades resistentes, tratamento térmico das manivas por imersão em água quente, desinfestação de ferramentas e intercalamento de culturas para reduzir a disseminação entre plantas (FAO, 2013).

A detecção rápida e precisa do agente causal é um fator muito importante para fins de quarentena e para evitar a disseminação por meio de material infectado. Métodos clássicos e rotineiros de diagnose de fitobactérias como caracterização bioquímica, sorológica e fisiológica, demandam mais tempo e são menos precisos quando comparados aos métodos moleculares empregados atualmente (SHAAD, 2001; GUIMARÃES; SÁ, 2002; KUMAR *et al.*, 2011; MENDOZA, 2012).

Outro fator importante para a diagnose é a diversidade genética do patógeno. Dentro de grupos taxonômicos, há grande variabilidade genética, o que está diretamente relacionado com a interação patógeno/hospedeiro/ambiente, refletindo na dinâmica da doença, o que pode dificultar o processo de detecção. A variabilidade em populações de *Xam*, por exemplo, pode ser notada tanto na dinâmica da doença e no comportamento do patógeno diante dos aspectos epidemiológicos (maior ou menor período de incubação, período de latência), como também na variabilidade genética e bioquímica/fisiológica dos isolados de uma mesma região ou de regiões distintas. Estes fatores podem interferir em uma diagnose precisa do patógeno e conseqüentemente, na elaboração de medidas de controle eficaz da doença (VERDIER *et al.*, 1993; RESTREPO *et al.*, 1997, 1999, 2004; PORTZ *et al.*, 2006).

Diante da grande importância do cultivo da mandioca e das perdas geradas pela incidência da bacteriose causada por *Xam*, iniciadores específicos foram desenvolvidos por Verdier *et al* (1998) a fim de obter uma diagnose rápida do patógeno, com base na região *PthB* específica para isolados de *Xam* fitopatogênicos. Embora específicos, estes iniciadores em diferentes testes realizados no laboratório de Virologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura, não foram capazes de promover a amplificação do fragmento correspondente à *Xam*.

Diante do acima referido, este trabalho teve como objetivo testar uma modificação do iniciador reverso para permitir a detecção de *Xam* por PCR convencional em tecido da planta infectado e a partir de colônias puras utilizando, avaliar sua sensibilidade e especificidade e possibilidade de utilização dos iniciadores como ferramenta de indexação e de estudo da movimentação sistêmica da bactéria, bem como, relacionar a movimentação sistêmica da bactéria com o nível de resistência de variedades de mandioca.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Desenho dos iniciadores

Para o desenho do par de iniciadores, foi utilizada a mesma sequência nucleotídica (*GenBank* n° AF012325) utilizada por Verdier *et al.* (1998).

Para tanto, seguiu-se as seguintes etapas: pesquisa e seleção das sequências de interesse – a sequência da região *PthB* utilizada por Verdier *et al.* (1998) e essa mesma região de diferentes isolados de *Xam* disponíveis no *GenBank*, além do genoma completo de alguns isolados de *Xam*. As sequências foram alinhadas e gerada uma sequência consenso (GeneFisher2); a partir dessa sequência, realizou-se a busca das melhores combinações para a obtenção dos iniciadores utilizando o programa *Primer 3* (BIOINFO, 2014).

2 Obtenção, cultivo e preservação dos isolados bacterianos

Os diferentes isolados bacterianos utilizados para os testes foram obtidos da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Instituto Biológico (IBSBF) e da Coleção de Bactérias do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura (CBEMF) (Tabela 1). Os isolados foram recuperados em meio de cultura YPG (5 g

de extrato de levedura, 5 g de proteose [peptona], 5g de glucose, 15 g de agar para um litro) e incubados a 28 °C por 48 horas para extração do DNA (VERDIER *et al.*, 1998; ROMEIRO, 2001).

Os isolados foram conservados em água destilada esterilizada (ADE), mantidos na geladeira e em glicerol a 20% em *freezer* a - 20 °C (ROMEIRO, 2001).

Tabela 1. Espécies utilizadas para os testes de especificidade

ESPÉCIES	ISOLADOS	ORIGEM	CULTURA
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CBEMF* 09	Guanambi – BA	Mandioca
<i>Enterobacter cloacae</i>	CBEMF 11	Guanambi – BA	Mandioca
<i>Enterobacter absuriae</i>	CBEMF 23	Guanambi – BA	Mandioca
<i>Klebsiella oxycota</i>	CBEMF 105	Dourados– MS	Mandioca
<i>Kosakonia cowanii</i>	CBEMF 112	Laje – BA	Mandioca
<i>Klebsiella variicola</i>	CBEMF 128	Marechal C. Rondon - PR	Mandioca
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	CBEMF 1	Não informado	Couve Chinesa
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	CBEMF 2	Não informado	Couve Flor
<i>Pseudomonas marginalis</i>	CBEMF 3	Não informado	Alface
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CBEMF 4	Não informado	Pepino
<i>Xanthomonas campestris</i>	CBEMF 5	Não informado	Pimentão
<i>Bacillus</i> sp.	CBEMF 6	Cruz das Almas – BA	Solo
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	CBEMF 7	Pernambuco (UFRPE)	Alho
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>passiflora</i> (Xam)	CBEMF 8	Pernambuco (UFRPE)	Maracujá
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	CBEMF 9	Brasília – DF	Mandioca
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> **	IBSBF 291	Não informado	Mandioca
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> **	IBSBF 1994	Não informado	Mandioca
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> **	IBSBF 436	Não informado	Mandioca
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> (Xam)	IBSBF 278	Não informado	Mandioca

***CBEMF**: Coleção de bactérias do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura; **IBSBF**: Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico.

**Apenas o DNA bacteriano doado pelo Instituto Biológico, SP.

Símbolos: BA: Bahia; MS: Mato Grosso do Sul; PR: Paraná; SP: São Paulo; UFRPE: Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3 Teste de especificidade de detecção

3.1 Extração do DNA bacteriano

O par de iniciadores XV e XK_MOD foi testado quanto à especificidade de detecção em ensaios de PCR utilizando DNA de 19 isolados bacterianos (Tabela 1).

Após 48 horas de crescimento a 28 °C em tubos de ensaio com meio YPG sólido inclinado, 1 mL de água destilada esterilizada foi adicionado a cada tubo, feita raspagem da colônia com alça de repicagem e a suspensão transferida para microtubos de 2 mL. A suspensão foi incubada por 10 minutos a 65 °C em banho maria, posteriormente centrifugada sob refrigeração a 13.000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi coletado e quantificado. A quantificação foi feita por eletroforese (90V/50min) em gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5X (Tris acetato 20 mM, 1 mM EDTA, pH 8,0). O marcador lambda (λ) foi utilizado nas concentrações de 50 e 100 ng para análise comparativa da concentração do DNA e, após estimativa da concentração, as amostras foram diluídas para 5 ng/ μ l. O DNA total concentrado e diluído das amostras foi mantido conservado a 4 °C.

3.2 Reação de PCR

As reações de PCR foram realizadas utilizando 30 ng de DNA, 1X tampão da *Taq* (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM KCl) 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 mM do iniciador F (XV: 5' -TTC-GGC-AAC-GGC-AGT-GAC-CAC-C- 3'), 0,2 mM do iniciador R (XK_MOD: 3'-AAT-CGG-AGA-TTA-CCT-GAG-CG- 5'), 0,3 U da *Taq* DNA Polimerase, com volume final da reação de 12,5 μ l. A PCR foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C, por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação por 30 s, a 95 °C; anelamento do iniciador a 61 °C, por 30 s; e extensão a 72 °C, por 1,5 min. Finalizando com um ciclo de 7 min a 72 °C. O produto da reação de aproximadamente 900 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% (80V/90min) em tampão TAE 0,5X (VERDIER *et al.*, 1998, adaptado).

4 Sensibilidade dos iniciadores (avaliação do limite de detecção)

O DNA total do isolado IBSBF 278 (Tabela 1) foi utilizado nas concentrações de 100, 75, 50, 25, 1 e 0,25 ng para testar o limite de detecção do par de iniciadores selecionados na reação de PCR. As mesmas condições de amplificação citadas

acima foram utilizadas com os iniciadores desenvolvidos por Verdier *et al.* (1998) a fim de comparar a capacidade de detecção de ambos os pares de iniciadores.

5 Detecção de *Xam* em tecido vegetal infectado

5.1 Obtenção do material com sintomas

Para obtenção de material vegetal com sintomas de bacteriose, mudas de mandioca de quatro variedades com dois meses de plantio, foram inoculadas com palito de madeira esterilizado, com o isolado padrão IBSBF 278 e mantidas em condições controladas (28 °C com fotoperíodo de 12h) em câmara de crescimento para o desenvolvimento dos sintomas. Após 15 dias de inoculação, regiões da haste e folhas com sintomas foram coletadas e maceradas com nitrogênio líquido em almofariz previamente esterilizado e cerca de 300 mg do tecido vegetal macerado foi utilizado para cada amostra.

5.2 Extração do DNA total e detecção por PCR

Para extração do DNA, foi utilizada a metodologia de Doyle & Doyle (1987) com modificações, como segue.

A cada microtubo de 2 mL foi adicionado 1 mL da solução tampão de extração CTAB 2% e então incubado por 45 min a 65 °C, sendo homogeneizado a cada 15 min. Após resfriamento por 5 min, foi adicionado 600 µl de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), agitado em vortex rapidamente e centrifugado por 10 min a 10.000 rpm. Posteriormente, 800 µl do sobrenadante foram coletados para um novo microtubo ao qual foi adicionado 600 µl de isopropanol, a fim de precipitar o material genético.

Uma nova centrifugação foi realizada e o sobrenadante descartado. Duas lavagens com 600 µl de etanol 70% seguidas de centrifugação por 5 min a 10.000 rpm foram feitas para retirar resíduos de sal presente no DNA e então o *pellet* foi levado à estufa por 20 min. a 37 °C para secagem. O *pellet* foi ressuscitado com 100 µl de TE (Tris-HCL 10 mM + EDTA 1 mM) + RNase a 1% e incubado por 1 hora a 37 °C. Após a incubação, foi adicionado 10 µl de acetato de sódio (3 M) e, após homogeneização, para precipitação do DNA, foi adicionado 200 µl de etanol absoluto e incubado por 1 hora a - 20 °C.

Após a incubação para a precipitação do DNA, uma nova centrifugação por 10 min. a 10.000 rpm foi realizada e o sobrenadante descartado. Para reidratar a molécula, foi adicionado 1 mL de etanol 70%, deixando descansar por 10 min na bancada. Uma nova centrifugação por 5 min a 12.000 rpm foi realizada para a fixação do *pellet* ao microtubo, seguida pelo descarte do sobrenadante e secagem por 20 min a 37 °C. O DNA foi ressuspensionado com 70 µl de TE autoclavado e quantificado em gel de agarose 1%. Para a reação de PCR, utilizou-se o DNA em uma concentração de 30 ng e as condições citadas acima.

6 Uso dos iniciadores como ferramenta de estudos relacionados à movimentação sistêmica da bactéria e à resistência da planta

6.1 Detecção em diferentes porções da haste

Para avaliar a aplicação dos iniciadores como ferramenta de estudo da movimentação bacteriana na planta hospedeira e o nível de resistência das variedades, um experimento em câmara de crescimento foi montado utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC) (9 genótipos de mandioca X 1 isolado de *Xam* X 7 repetições). Mudanças das variedades Cigana, Kiriris, Verdinha, Salangor, Tapioqueira, Caipira, Poti Branca e dois híbridos: 98150-06 e 962409 (do BAG - mandioca da Embrapa) com dois meses de plantio foram mantidas em câmara úmida por 24 horas antes da inoculação. A inoculação foi realizada com palito de madeira esterilizado em um ponto próximo a base da haste, segundo metodologia de Romeiro (2001). Para as plantas controle, utilizou-se palito embebido em água destilada esterilizada, em substituição à bactéria.

Das sete plantas inoculadas, duas de cada variedade foram utilizadas após quinze dias da inoculação para o teste de detecção em diferentes porções da haste. Quatro pontos foram selecionados (Fig. 4):

- 1 cm na base da haste;
- 1 cm no ponto de inoculação;
- 8 cm acima do ponto de inoculação e,
- 16 cm acima do ponto de inoculação.

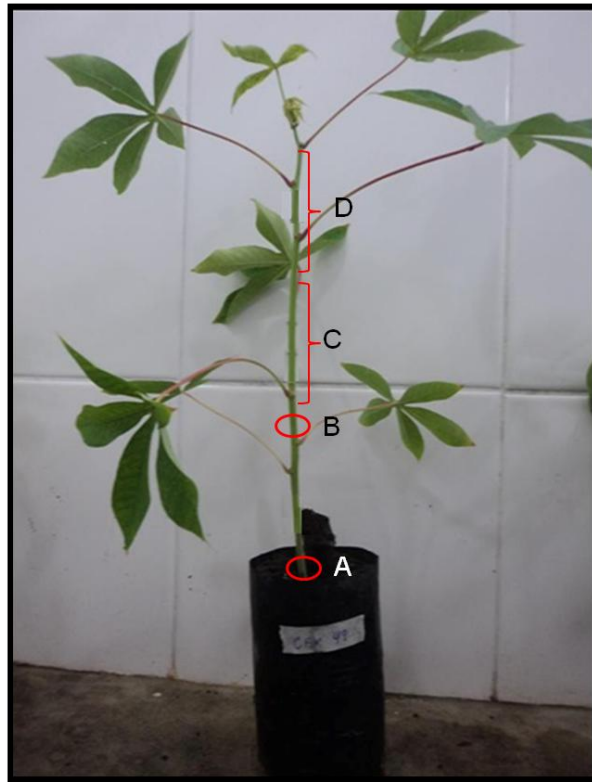


Figura 4. Diferentes pontos na haste de mandioca infectada com *Xam*. **A:** 1 cm na base da haste; **B:** 1 cm no ponto de inoculação; **C:** 8 cm acima do ponto de inoculação e, **D:** 16 cm acima do ponto de inoculação. Foto: Rita Melo.

Para a extração do DNA, utilizou-se cerca de 300 mg de tecido vegetal do material macerado de cada ponto para cada genótipo. A extração do DNA foi feita seguindo o protocolo modificado de Dolye & Dolye (1997) e a reação de PCR realizada como descrita acima utilizando o par de iniciadores XV e XK_MOD.

6.2 Relação entre a movimentação sistêmica da bactéria e a resistência da planta

As plantas foram avaliadas 72h após a inoculação, e a cada três dias durante 30 dias.

As avaliações foram realizadas seguindo a seguinte escala arbitrária de notas: 0 – Ausência de exsudação; 1 - Pouca exsudação no local da inoculação; 2 - Muita exsudação no local da lesão; 3 - Exsudação além do ponto de inoculação; 4 - Vários pontos de exsudação além do ponto de inoculação; 5 - Morte da planta. O grau severidade, medidas a partir das notas atribuídas, foi utilizado para calcular a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de cada genótipo, seguindo metodologia de Shaner & Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] \cdot [X_{i+1} - X_i]$$

Onde:

Y_i : severidade da doença (com base na escala de notas) na i - ésima observação;

Y_{i+1} : severidade da doença na época da avaliação $i+1$;

X_i : tempo (dias) na i - ésima observação;

X_{i+1} : época da avaliação $i+1$;

n : número total de observações.

As médias dos valores das AACPDs foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico R (R Development Core Team, 2013).

Para análise estatística do resultado da amplificação, foi atribuído valores entre 0 (ausência de banda) e 1 (presença), além de um valor de intensidade relativo, onde, para a banda de maior intensidade atribuiu-se uma nota '1', e a partir daí as demais foram quantificadas, tendo como parâmetro a intensidade das bandas, a fim de comparar com os resultados da AACPD. A média dos valores para cada variedade foi analisada pelo teste Scott-Knott como citado acima.

O resultado da análise da AACPD foi comparado com o resultado das amplificações utilizando diferentes porções da haste, a fim de observar a relação entre movimentação bacteriana e resistência à bacteriose das variedades.

RESULTADOS

Iniciadores obtidos

O par de iniciadores para detecção molecular de *Xam* por PCR convencional escolhido para a validação neste trabalho, após testes *in silico*, foi 5' – TTCGGCAACGGCAGTGACCACC – 3' (XV) (VERDIER *et al.*, 1998) e 3' – AATCGGAGATTACCTGAGCG – 5' (XK_MOD), com o XK_MOD diferindo do XK (VERDIER *et al.*, 1998) no tamanho, com 20 nucleotídeos (exclusão das duas primeiras base nitrogenadas [TC]) e na T_m , 52 °C para o XK_MOD e 55 °C para o XK, amplificando um fragmento com cerca de 900 pares de base.

Das condições de reação nada foi alterado, apesar da *T_m* do XK_MOD ter diminuído mateve-se as mesmas condições, por observar o melhor desempenho na reação com a temperatura de anelamento a 61 °C (Dados não publicados).

Especificidade dos iniciadores

A especificidade do par de iniciadores foi testada por PCR convencional, utilizando as diferentes espécies bacterianas e patovares listados na tabela 1. Como esperado, houve apenas a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 900 pb dos isolados de *Xam* utilizados nas reações, não amplificando para as demais amostras bacterianas (Fig. 5 A e B).



Figura 5. Gel de agarose a 1%. Produto de PCR do teste de sensibilidade com isolados bacterianos de diferentes espécies e gêneros. **(A):** 1: *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*; 2: *X. axonopodis* pv. *passiflora*; 3: *Xanthomonas campestris*; 4: *Ralstonia solanacearum*; 5: *Pseudomonas marginalis*; 6: *Pseudomonas maculicola*; 7: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; 8: *Pseudomonas viridiflava*; 9: *Enterobacter aerogenes*; 10: *Enterobacter cloacae*; 11: *Enterobacter mori*; 12: *Klebsiella oxycota*; 13: *Pantoea agglomerans*; 14: *Klebsiella variicola*; 15: *Bacillus* sp.; 16: amostra controle sem DNA. **(B):** Isolados de *Xam*. 1: IBSBF 278; 2: IBSBF 1998; 3: IBSBF 291; 4: IBSBF 436; 5: CBEMF 9; e 6: controle negativo *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflora* (CBEMF 8). M: marcador DNA Ladder 200pb.

Sensibilidade dos iniciadores

A sensibilidade dos iniciadores foi avaliada utilizando seis concentrações do DNA de *Xam* (IBSBF 278), para detectar o limite inferior de detecção e comparar com o par de iniciadores desenvolvido por Verdier *et al.* (1998). Para o par de iniciadores desenvolvidos neste trabalho, das seis concentrações utilizadas (100, 75, 50, 25, 1 e 0,25 ng), houve amplificação em quatro concentrações: 100, 75, 50 e 25 ng (Fig. 5A). Já nas reações utilizando o par de iniciadores desenvolvidos por Verdier *et al.* (1988), não houve amplificação em nenhuma das concentrações utilizadas (Fig. 6B).

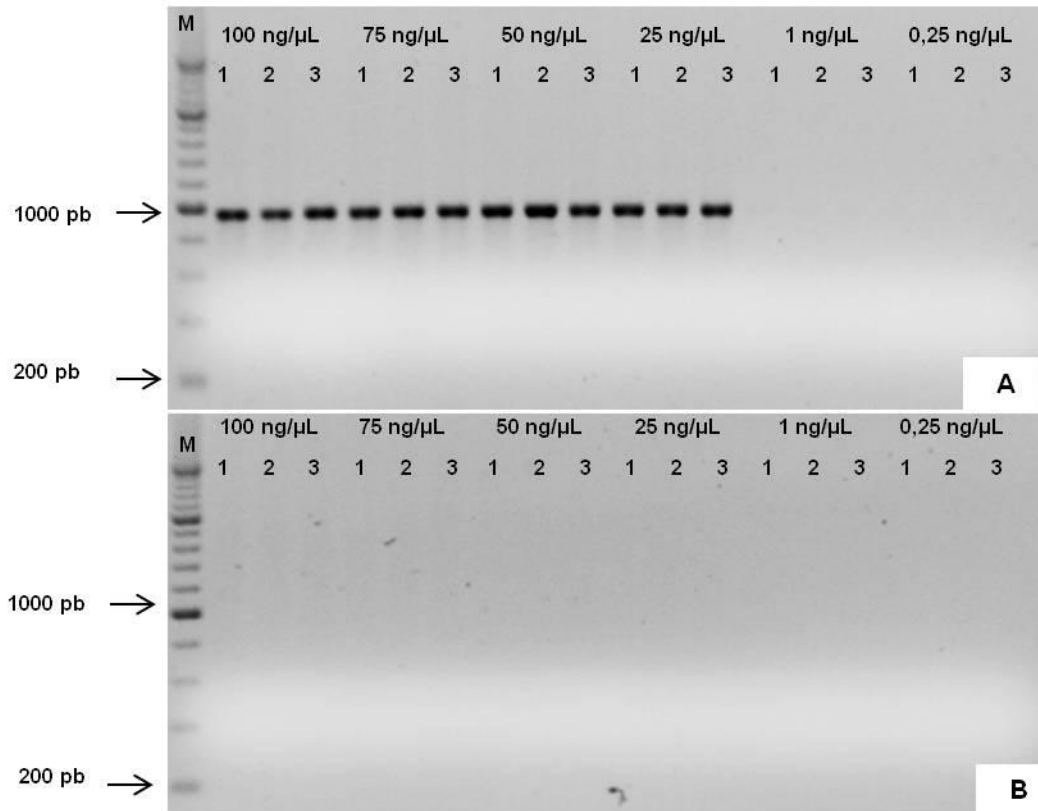


Figura 6. Gel de agarose 1% com reação de PCR utilizando o DNA do isolado IBSBF 278 *Xam* em diferentes concentrações, seguindo a ordem: 100, 75, 50, 25, 1, 0,25 ng com três repetições cada (1, 2 e 3). **A:** Reação com os iniciadores XV e XK_MOD; **B:** Reação com os iniciadores XV e XK (VERDIER *et al*, 1998). M: marcador DNA Ladder 200pb.

Eficiência da detecção de *Xam* por PCR em tecido vegetal infectado

No teste de detecção utilizando DNA extraído de folha e haste de mandioca com sintomas de bacteriose, houve amplificação do DNA bacteriano de todas as amostras utilizando o par de iniciadores desenvolvidos neste trabalho (Fig. 7).

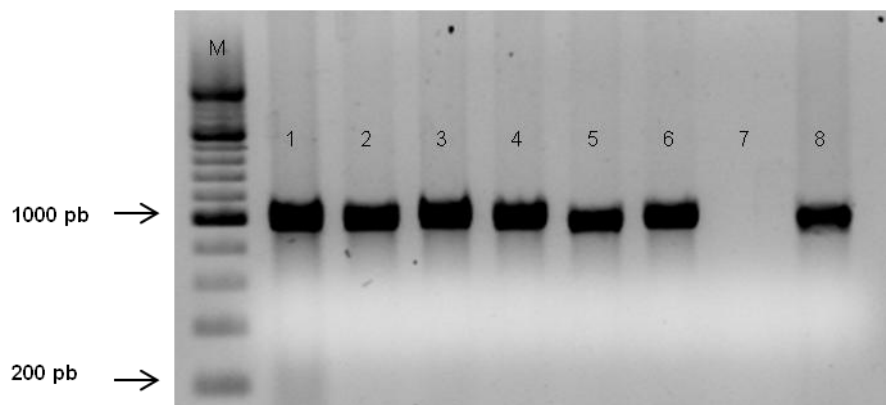


Figura 7. Gel de agarose a 1%. Produto de PCR do teste de detecção em plantas infectadas com *Xam*. 1: Tapioqueira (haste); 2: Cigana (folha); 3: Cigana (haste); 4: Salangor (folha); 5: Poti Branca

(folha); 6: Poti branca branca (haste); 7: controle negativo (material vegetal não infectado com *Xam*); 8: controle positivo (isolado *Xam* IBSBF 278). M: marcador DNA Ladder 200pb.

Relação entre a movimentação sistêmica da bactéria e a resistência da planta

Foi possível detectar a presença da bactéria nos diferentes pontos da haste inoculada (Fig. 8), representando regiões sintomáticas e assintomáticas, utilizando o par de iniciadores XV e XK_MOD, podendo detectar a movimentação bacteriana ao longo da haste.

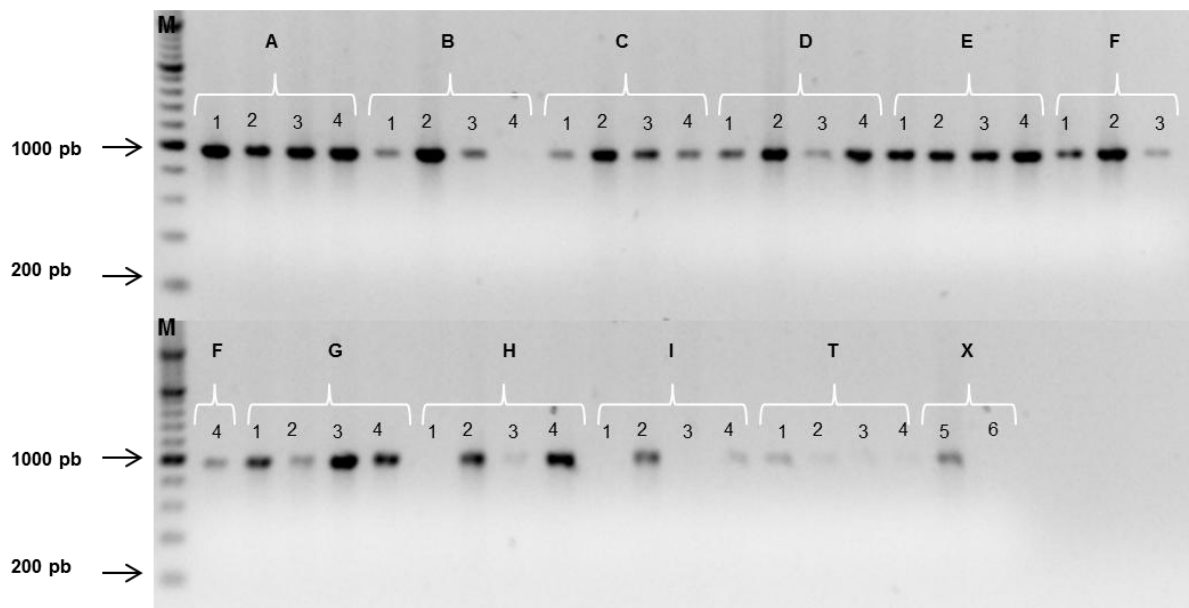


Figura 8. Gel de agarose a 1%. Produto de PCR do teste de detecção em diferentes fragmentos da haste. A – Acesso 962409; B – Caipira; C – Cigana; D – Tapioqueira; E – Kirirís; F – Poti Branca; G – acesso 98150-09; H – Solangor; I – Verdinha; T – Testemunha; X – Controles.

: 1 – 1 cm na base da haste; 2 – 1 cm no ponto de inoculação; 3 – 8 cm acima do ponto de inoculação; 4 – 16 cm acima do ponto de inoculação; 5 – Controle positivo (*Xam*, isolado IBSBF 278); 6 – Controle negativo (mix sem DNA). M: marcador DNA Ladder 200pb.

Das 9 variedades utilizadas, considerando os quatro pontos utilizados para a extração de DNA e posterior amplificação, não houve amplificação apenas no ponto 16 cm acima do ponto de inoculação para a variedade Cigana (B4, Fig. 8), Solangor na base da haste (H1, Fig. 8), Verdinha na base da haste (I1, Fig. 8) e Verdinha 8 cm acima do ponto de inoculação (I3, Fig. 8). Pode-se observar também na figura 8 que, no ponto em que foi realizada a inoculação (todos os pontos 2 na legenda da figura 8), a maior intensidade da banda para grande parte das variedades, comparando-a aos demais pontos de amplificação.

Além disso, para algumas variedades é possível observar o padrão esperado de amplificação (B, C e F, Fig. 8). Maior intensidade da banda no ponto de inoculação e diminuição da intensidade nos pontos seguintes, 3 e 4, uma vez que estão mais distantes do ponto de inoculação, sendo o ponto 4 com a menor intensidade. No entanto, a maioria das variedades apresentou um padrão diferente do esperado, algumas com, aparentemente, mesma intensidade em todos os pontos (A e E, Fig. 8 e outras com intensidade de banda maior nos pontos não inoculados (D, G e H, Fig. 8).

Observa-se também na Figura 8, amplificação para a testemunha, o que não era esperado, uma vez que foi verificado a não amplificação em tecido de mandioca livre da doença, como mostrado acima (Fig. 7). Assim, para melhor garantia dos resultados, novos estudos são necessários para melhor investigação de tal padrão de movimentação sistêmica da bactéria.

Na análise da AACPD para a severidade da doença ao longo do tempo, observou-se diferença significativa a 5% de probabilidade entre as variedades Cigana, Verdinha e Salangor em comparação às demais (Tabela 2), sugerindo que estas sejam mais suscetíveis, em comparação com as variedades 98150_06, Kiriris, Tapioqueira, Poti Branca, 962409 e caipira, as quais estão em um grupo com algum nível de resistência.

Tabela 2. Valores médios da análise da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para severidade de cada variedade.

VARIETADES	VALORES MÉDIOS
1 CIGANA	107,8A
2 VERDINHA	105,3A
3 SALANGOR	95,4A
4 98150_06	84,9B
5 KIRIRIS	77,6B
6 TAPIOQUEIRA	72,2B
7 POTIBRANCA	69,9B
8 962409	68,6B
9 CAIPIRA	54,9B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ao comparar o resultado da severidade da doença de cada variedade com base na análise da AACPD (Tabela 2), com o resultado das amplificações por PCR

em diferentes pontos da haste, não correlação entre a área abaixo da curva de progresso da doença das variedades avaliadas e a presença ou ausência de bandas. A correlação entre a intensidade média das bandas e a AACPD foi positiva ($r=0,27$), porém não significativa ($p=0,4896$).

DISCUSSÃO

Várias regiões do genoma bacteriano vêm sendo utilizadas para o desenvolvimento de iniciadores e, para as bactérias do gênero *Xantomonas*, regiões do gene *hrp*, a qual é bastante conservada dentro deste grupo, é muito utilizada tanto visando à diagnose de diferentes espécies como também patovares (TRINDADE *et al.*, 2007). O conhecimento deste ajuda na escolha da região ideal para o desenho de iniciadores, uma vez que exclui a possível amplificação de regiões de espécies distintas, podendo selecionar com precisão a região específica para o patovar, como foi mostrado neste trabalho.

Das opções de iniciadores gerados pelo *primer 3*, o XK_MOD foi selecionado para a validação neste trabalho, por conter as melhores características. Este iniciador, é uma modificação do XK desenhado por Verdier *et al.* (1998), diferindo na ausência de duas bases iniciais na posição 5', as bases nitrogenadas TC (Timina e Citosina). Embora tenha reduzido o número de bases, o iniciador continuou com tamanho ideal, pois o XK continha 22, assim, ficando o XK_MOD com 20 bases nitrogenadas (WENSING *et al.*, 2011; PREMIERBIOSOFT, 2014).

Não houve diferença na possibilidade de formação de estruturas secundárias (*hairpin*) e de formação de dímeros de iniciadores em análise *in silico* entre os dois iniciadores. No entanto, a presença de polimorfismo nas duas bases da região 5' no iniciador XK, observado nas sequências analisadas, juntamente com formações de estruturas secundárias, provavelmente são os fatores que impedem a amplificação das sequências diferentes da utilizada por Verdier *et al.* (1998). Este fator (polimorfismo na região das duas primeiras bases do iniciador XK) pode acarretar em uma “repulsão” entre o iniciador e a fita molde, uma vez que as bases não são complementares, impedindo o anelamento perfeito dos iniciadores, acarretando em um anelamento impreciso, gerando, conseqüentemente, problemas na amplificação.

A sensibilidade na detecção pode ser considerada como a eficiência de identificar, de diagnosticar o patógeno de interesse, sem a formação de falsos

positivos e negativos, estes que podem ser ocasionados por reações cruzadas, isolamentos mal realizados, má desenvolvimento de protocolos de diagnose (FIGUEIRÓ, 2008). A amplificação do fragmento apenas para isolados de *Xam* com o par de iniciadores XV – XK_MOD mostrou o alto grau de especificidade destes iniciadores e sua capacidade de detectar o patógeno com alta confiabilidade.

Como o par de iniciadores desenhado e validado neste trabalho surgiu a partir de uma modificação dos iniciadores desenhados por Verdier *et al.* (1998), a garantia da especificidade deles, de certa forma, já tinha sido comprovada, uma vez que eles utilizaram 112 isolados de *Xam* (107 patogênicos e 5 não patogênicos) de 25 países da América do Sul, Ásia e África e, além disso, 46 outras amostras de bactérias, incluindo outras espécies de *Xanthomonas*, outros patovares de *Xanthomonas axonopodis* e espécies de outros gêneros, incluindo epífitas isoladas de folhas de mandioca com sintomas.

A necessidade de testes de validação de iniciadores utilizando diferentes espécies de bactérias, distantes ou próximas geneticamente, é indispensável para confirmar a especificidade deste para com seu 'alvo' e, conseqüentemente, ter eficiência na atividade a ser realizada.

A quantidade e a diversidade de espécies utilizadas para testes de especificidade variam entre os trabalhos e, muitas vezes, o interessante é a variedade destes e não especificamente a quantidade. Como pode ser observado nos trabalhos de Wanderley (2011), a fim de testar a especificidade de dois iniciadores para o diagnóstico molecular de Leishmaniose visceral, utilizou 14 diferentes isolados, já Adikini *et al.* (2011) utilizaram 88 isolados bacterianos. Em outros trabalhos como o de Silva (2011), 59 isolados foram utilizados para detecção de *Erwinia psidi*, 111 isolados de diferentes países foram utilizados no trabalho de Coletta-Filho *et al.* (2005) na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

O limite mínimo de detecção de DNA corresponde ao menor valor de DNA alvo (do patógeno) em uma amostra/reação possível de detecção (TELÓ *et al.*, 2007; FIGUEIRÓ, 2008) e é importante para a padronização dos protocolos utilizados nos diferentes laboratórios. O limite inferior de detecção observado neste trabalho difere dos observados nos trabalhos de Simenc & Potocnik (2011), Leite Júnior *et al.* (1994) e Trindade *et al.* (2007) em que foi possível amplificação com as concentrações de 0,0002, 0,00025, 0,01 e 0,001 ng de DNA purificado por reação. Isso pode estar relacionado à pureza do DNA na reação, uma vez que o DNA

purificado está livre de inibidores o que não interfere no rendimento da amplificação, diferente das amostras testadas, as quais não foram purificadas o que pode ter influenciado no limite de detecção.

O resultado do teste de detecção em material vegetal infectado sintomático mostra que com a utilização dos iniciadores também é possível e eficiente a detecção do patógeno por PCR. A diagnose do patógeno diretamente do tecido vegetal infectado é uma estratégia mais rápida e evita, comparando à técnica de isolamento do patógeno, a seleção de outros isolados bacterianos e, possivelmente, a geração de falsos positivos e negativos, comprometendo a veracidade dos resultados, devido à presença de bactérias endófitas e saprófitas, por exemplo (SRINIVASA *et al.*, 2012).

Como citado por Akinidi *et al.* (2011), a diagnose a partir do isolamento da bactéria em meio artificial, semi seletivo ou mesmo seletivo necessita de mais avaliações, da aplicação dos postulados de Koch, ferramentas mais trabalhosas e demoradas, tornando este método ultrapassado em relação a utilização do tempo de resposta e de trabalho e, além disso, o risco de isolar bactérias que não são as causadoras da doença. Assim, uma diagnose rápida e específica, além de evitar a dispersão do patógeno, permite a tomada de medidas de controle antes do avanço da doença no plantio.

Ao utilizar o par de iniciadores XV – XK_MOD em tecidos sintomáticos e assintomáticos, em diferentes porções da haste, foi possível notar a amplificação de quase todas as amostras (Fig. 8) após 15 dias de inoculação. Isso corrobora com os resultados de Trindade *et al.* (2007), Freitas (2012) e Adikini *et al.* (2011), em que foi possível a detecção em tecido vegetal infectado utilizando a técnica de PCR, amplificando o fragmento específico do DNA do patógeno. Esta capacidade de detecção em tecidos assintomáticos permite a aplicação dos iniciadores na diagnose tanto em materiais vegetais sintomáticos quanto infectados, porém assintomáticos, uma vez que a bactéria pode estar presente no tecido e este ainda não ter desenvolvido os sintomas, ou seja, de forma latente. Como mostrado no trabalho de Adikini *et al.* (2011), o aparecimento dos sintomas ocorre tempos depois da colonização do tecido vegetal pelo patógeno, variando entre variedades e isolado bacteriano, com isso, este é transportado de forma latente, para regiões ainda livres da doença.

Além da detecção em tecidos assintomáticos, foi possível observar a translocação bacteriana ao longo da haste utilizando estes iniciadores (Fig. 8) e estimar uma quantificação relativa da colonização do patógeno por parte do tecido, observando a intensidade das bandas amplificadas. Refere-se aqui à quantificação relativa, pois, para a reação, foi utilizada a técnica de PCR convencional, não sendo possível quantificar exatamente a quantidade do patógeno por área do tecido, o que para isso seria necessário realizar uma reação de PCR quantitativa em tempo real, a qual nos permite detectar o patógeno e fazer sua quantificação (KUMAR *et al.*, 2011).

O padrão de amplificação para as variedades Caipira, Cigana, Poti Branca e Verdinha (maior intensidade na banda no ponto em que foi feita a inoculação, ponto 2, Fig. 8), possivelmente está relacionado com a alta concentração de células bacterianas no ponto onde ocorreu a inoculação.

Em um processo de inoculação, quando se toma todas as precauções para que ocorra a infecção, há uma grande multiplicação bacteriana no ponto de inoculação, uma vez que as células são viáveis, em uma concentração considerável e as plantas estão jovens, sadias e em bom estado nutricional, proporcionando um rápido desenvolvimento do patógeno, acarretando no rápido aumento do número de células bacterianas no local da inoculação (ROMEIRO, 2001).

Acredita-se que esta diferença na intensidade das bandas nos diferentes pontos de detecção esteja associada a uma das principais características de *Xam*, que é a translocação através do sistema vascular da planta em um curto período de tempo (LOZANO, 1986) e uma diminuição da multiplicação bacteriana no ponto de inoculação, já que o tecido vegetal já se encontrava necrosado. No entanto, faz-se necessário uma melhor investigação destes padrões para melhor entendimento do comportamento bacteriano no tecido hospedeiro.

Esses resultados, detecção em diferentes pontos da haste e em tecido sintomático e assintomático, servem como subsídio para a detecção eficiente de *Xam*. Uma vez que a principal forma de plantio da mandioca é por manivas e *Xam* tem como uma de suas principais características a movimentação no tecido vegetal através do sistema vascular da planta. A utilização de diferentes pontos da haste para o processo de indexação mostra-se fundamentalmente aplicável para a garantia da sanidade vegetal antes do transporte para áreas livres da doença no processo de implantação do mandiocal.

Das variedades e acessos estudados, não houve sinais de resistência completa (vertical), uma vez que todas as plantas foram infectadas, entretanto, estas diferiram quanto à severidade da doença. Houve correlação, porém não significativa entre a resistência das variedades e acessos e a translocação bacteriana na haste, uma vez que houve amplificação nos diferentes pontos utilizados para as diferentes variedades, como pode ser observado na Figura 8. A diferença no padrão de resistência pode estar relacionada com as características ou a diversidade genética das variedades.

A resistência genética a patógenos nas plantas pode ser do tipo mono ou oligogênica, ou seja, pode ser controlada por genes isolados ou por vários genes em associação, e, coevolutivamente, plantas e fitopatógenos apresentam interação entre proteínas efetoras que podem conferir resistência total a planta (MATIELLO *et al.*, 1997; GIL *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2012) ou, podendo gerar diferentes respostas à manifestação da doença, maior ou menor período de latência, de incubação e, conseqüentemente, no desenvolvimento dos sintomas.

Na mandioca, a resistência à *Xam* é de caráter oligogênico (JORGE *et al.*, 2000; BANITO *et al.*, 2010) e isso reflete na resposta das variedades quando infectadas por *Xam*, podendo apresentar padrão sintomático diferenciado. Essa diferença no padrão de resistência do hospedeiro foi observada também em trabalho com mandioca quando inoculadas com *Fusarium* (OLIVEIRA *et al.*, 2013), onde foi observado diferentes níveis de resistência entre os diferentes acessos.

Em relação à translocação sistêmica da bactéria em comparação à resistência das variedades utilizadas, a correlação não significativa com a presença e ausência de bandas do teste de detecção em diferentes porções da haste, condiz com o relatado acima, uma vez que o nível de resistência pode variar entre as variedades, a resposta à invasão do patógeno também comporta-se de modo diferente.

Medidas eficientes de diagnose podem ser cruciais para prevenir a disseminação de doenças. Diante da grande importância econômica e social que a mandioca possui mundialmente e das perdas causadas pela ocorrência da bacteriose causada por *Xam*, a detecção rápida deste patógeno pode reduzir significativamente os danos causados. Assim, a utilização destes iniciadores específicos pode auxiliar na aplicação de medidas fitossanitárias, permitindo uma rápida e confiável diagnose do agente patogênico, refletindo em uma aceleração na

implantação de controles, dessa forma evitando o estabelecimento da doença em locais ainda livres da doença.

CONCLUSÕES

- O par de iniciadores XV e XK_MOD foi eficaz na amplificação do fragmento exclusivo de *Xam*, utilizando tanto DNA de colônias isoladas de *Xam* quanto o DNA total de material vegetal infectado, sintomático e assintomático;
- Foi possível estimar a movimentação sistêmica da bactéria utilizando o par de iniciadores XV e XK_MOD, uma vez que houve amplificação em diferentes pontos da haste;
- A diagnose de *Xam* utilizando PCR mostrou-se eficiente, podendo ser utilizada por clínicas fitopatológicas, pelas agências de defesa sanitária para evitar o transporte do patógeno, certificando a sanidade do material de plantio.

AGRADECIMENTOS

O nosso agradecimento à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, mais especificamente ao Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura pelo financiamento do projeto e ao Centro de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudo concedida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIKINI, S. *et al.* Development of a specific molecular tool for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. **Plant Pathology**. v. 60, p. 443–452, 2011.

AKINBO, O.; LABUSCHAGNE, M.; FREGENE, M. Introgression of whitefly (*Aleurotrachelus socialis*) resistance gene from F₁ inter-specific hybrids into commercial cassava. **Euphytica**; vol. 183; p.: 19-26. 2012.

BANITO, A. *et al.* SCREENING OF CASSAVA GENOTYPES FOR RESISTANCE TO BACTERIAL BLIGHT USING STRAIN x GENOTYPE INTERACTIONS. **Journal of Plant Pathology** v. 92, n. 1, p. 181-186, 2010.

BERIAM, L. O. S. Doenças bacterianas em hortaliças. **Palestra**. Instituto Biológico, São Paulo. v.69, nº 2, p. 81-84, 2007.

BIOINFO. Disponível em: <<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>> Acesso: 03 set. 2014.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.** v. 191, p. 11-15. 1987.

FAO, 2013. Save and Grow: Cassava a guide to sustainable production intensification. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO)**, 2013.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos, Anais. São Carlos, Universidade Federal de São Carlo – SP. p. 255-258, 2000.

FIGUEIRÓ, A. A. Detecção de *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata através de PCR qualitativa e quantitativa. Dissertação (Mestrado). 83f. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, 2008.

FOKUNANG, C. N., AKEM, C. N., DIXON, A. G. O.; IKOTUN, T. Evaluation of a cassava germplasm collection for reaction to three major diseases and the effect on yield. **Genetic Resources and Crop Evolution**. 2000. v. 47, p. 63–71.

FREITAS, A. C. Detecção molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *viticila* em videiras. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade de Brasília. Brasília, 2012.

GIL, J. *et al.* LA PROTEÍNA PTHB DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* ES AUTOACTIVA EN ENSAYOS DE DOBLE HÍBRIDO. **Acta biológica**. Colombiana. v. 16, n.º 1, p. 109 – 120, 2011.

GUIMARÃES, P. M.; SÁ, M. F. G. O uso de PCR na diagnose e caracterização de microrganismos. In.: MELO, I. S et al. (Eds). **Recursos genéticos & Melhoramento - Microrganismos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. p. 130-147.

IBGE, 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201404_5.shtm> Acesso em: 21 maio. 2014.

JORGE, V.; VERDIER, V. Qualitative and quantitative evaluation of cassava bacterial blight resistance in F 1 progeny of a cross between elite cassava clones. **Euphytica**. v. 123, p. 41–48. 2002.

KUMAR, V. *et al.* Traditional and novel references towards systematic normalization of qRT-PCR data in plants. **Australian Journal of Crop Science**. v. 5, nº 11, p. 1455-1468, 2011.

LEITE JUNIOR, R. P. *et al.* Detection and identification os phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the hrp genes os *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, nº 4, p. 1066-1077, 1994.

LIMA, W.F. *et al.* Metodologias para obtenção de resistência e/ou tolerância da soja à ferrugem-asiática. **Summa Phytopathologica**. v.38, n.1, p.67-72, 2012.

LÓPEZ, C. E. BERNAL, A. J. Cassava Bacterial Blight: Using Genomics for the Elucidation and Management of an Old Problem. **Tropical Plant Biol.** 2012. v. 5, p. 117–126.

LOZANO, J. C. Cassava bacterial blight: a manageable disease. **Plant Disease**. v. 70, p. 1089–1093. 1986.

MARAITE, H. *Xanthomona campestris* pathovars on cassava, cause of bacterial blight and bacterial necrosis. *Xanthomonas*. **Chapman & Hall**. v. 1, p. 8–24. 1993.

MATIELLO, R. R. *et al.* RESISTÊNCIA DAS PLANTAS A MOLÉSTIAS FÚNGICAS. **Ciência Rural**. v.27, n.1, p.161-168, 1997.

MENDONZA, S. R. *et al.* Developing plant-based vaccines against neglected tropical diseases: Where are we? **Vaccine**. 2012. v. 31, p. 40– 48.

OLIVEIRA, S. A. S. *et al.* Resistance to *Fusarium* dry root rot disease in cassava accessions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.48, n.10, p.1414-1417, 2013.

PORTZ, R. L. *et al.* Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá. v. 28, n. 3, p. 413-419, 2006.

PREMIER BIOSOFT, 2014. Disponível em: <http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html> Acesso: 18 jun. 2014.

RESTREPO, S. *et al.* AFLP fingerprinting : an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Microbiology**. v. 145, p. 107-114, 1999.

RESTREPO, S. *et al.* Genetic Structure and Population Dynamics of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia from 1995 to 1999. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 70, n. 1, p. 255–261, 2004.

RESTREPO, S.; VERDIER, V. Geographical Differentiation of the Population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 63, n. 11, p. 4427–4434, 1997.

ROMEIRO, R. S. Métodos em Bacteriologia de Plantas. **Editora UFV**. p. 65-80. Viçosa, 2001.

ROMEIRO, R. S. Métodos em Bacteriologia de Plantas. **Editora UFV**. p. 88-96. Viçosa, 2001.

SCHAAD, N. W. *et al.* Gram-negative bacteria: *Xanthomonas*. In.: SCHAAD, N. W. *et al.* (Eds). **Plant Pathogenic Bacteria**. Third Edition. The American Phytopathological Society. p. 175-200. Minnesota, 2001.

Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento – SEAB. Mandiocultura - Análise da Conjuntura Agropecuária. DERAL - Departamento de Economia Rural. Nov. 2013.

SENA, M. G. C. Aspectos sociais. In: **Aspectos socioeconômicos e agrônômicos da mandioca**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, 2006; p.: 91-110. 2006.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopatology**. v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SIMENC, J.; POTOČNIK, U. Rapid Differentiation of Bacterial Species by High Resolution Melting Curve Analysis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, nº. 3, p. 256–263, 2011.

SRINIVASA, C. *et al.* Molecular detection of plant pathogenic bacteria using polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. **Acta Biochim Biophys**.v. 44, p. 217–223, 2012.

TELÓ, E. P. *et al.* Determinação do limite mínimo de detecção da técnica de pcr “semi-nested” para *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. **RBAC**. v. 39, nº 3, p; 197-200, 2007.

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

VERDIER, V. *et al.* Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas* sp. *manihotis*. **Journal of General Microbiology**. v. 139, p. 2591-2601, 1993.

VERDIER, V. *et al.* Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction. **Plant Dis.** v. 82, p. 79-83, 1998.

VERDIER, V. *et al.* Methods for detecting the cassava bacterial blight pathogen: a practical approach for managing the disease. **Euphytica**. v. 120, p. 103–107, 2001.

WENSING, A. *et al.* Detection of *Erwinia* species from the apple and pear flora by mass spectroscopy of whole cells and with novel PCR *primers*. **Journal of Applied Microbiology** v. 112, p. 147–158, 2011.