



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Desenvolvimento de *primers* específicos para identificação da raça 4 de  
*Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans***

**IGOR RIBEIRO FERNANDES**

**Brasília-DF**

## **IGOR RIBEIRO FERNANDES**

### **Desenvolvimento de primers específicos para identificação da raça 4 de Xanthomonas euvesicatoria pv. perforans**

Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – UnB, como parte das exigências do curso de Graduação em Agronomia, para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Rossato

#### **BANCA EXAMINADORA:**

---

Maurício Rossato  
Doutor, Universidade de Brasília – UnB  
Orientador / e-mail: [mauricio.rossato@unb.br](mailto:mauricio.rossato@unb.br)

---

Luciellen da Costa Ferreira  
Doutoranda, Universidade de Brasília – UnB  
Examinadora

---

Ian Carlos Bispo De Carvalho  
Doutorando, Universidade de Brasília – UnB  
Examinador

## FICHA CATALOGRÁFICA

FERNANDES, Igor Ribeiro

“Desenvolvimento de *primers* específicos para identificação da raça 4 de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*”. Orientação: Maurício Rossato, Brasília, 2021. 34 páginas.

Monografia de Graduação (G) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2021.

1. Bacteriose 2. Mancha bacteriana 3. PCR

I. Rossato. M.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Fernandes, I. R. Desenvolvimento de *primers* específicos para identificação da raça 4 de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 34 páginas. Monografia.

## CESSÃO DE DIREITOS

**Nome do Autor:** IGOR RIBEIRO FERNANDES

**Título da Monografia de Conclusão de Curso:** Desenvolvimento de *primers* específicos para identificação da raça 4 de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

**Grau:** 3º      **Ano:** 2021

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia de graduação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

IGOR RIBEIRO FERNANDES

E-mail: [igorribeirof45@gmail.com](mailto:igorribeirof45@gmail.com)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Claudionor Fernandes Neto e Geruza Maria Ribeiro Fernandes pela minha criação e educação, pelo apoio, paciência e amor incondicional, por sempre me darem forças em todas as etapas de minha vida, e acreditarem em mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Maurício Rossato por todo o suporte, ensinamentos e paciência durante a realização desse trabalho, por ter aceitado me orientar e não ter medido esforços e nem barreiras para me ajudar sempre que precisei, sem sobra de dúvidas ele será sempre uma grande inspiração em minha vida profissional e pessoal.

Agradeço a Dra. Alice Maria Quezado Duval pela disponibilização dos isolados para o estudo, os quais pertencem à coleção de trabalho de Bactérias Fitopatogênicas de Hortaliças da Embrapa Hortaliças, e ao professor Fernando Lucas de Melo pelo sequenciamento do isolado do estudo.

A toda minha família por ter sempre acreditado em mim e em especial minha querida irmã Hellen Ribeiro Fernandes, meu cunhado Mauro Torres Vecchi e minha tia Meiruza Maria Oliveira Ribeiro.

Aos meus amigos por me acompanharem, ajudarem e muitas vezes alegrarem a minha jornada, em especial meu irmão de UnB Lucas Antônio Mazzoco e meu amigo de infância Hilkerson Jacob.

A grande maioria dos professores que tive a honra de conviver durante minha graduação, sou grato por todo o conhecimento recebido.

A Universidade de Brasília (UnB) a Faculdade de Agronomia e Veterinária (FAV) e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade.

Por fim agradeço, a Deus pela vida, saúde, força, resiliência e coragem que me deu para poder ir atrás do que quero, sonho e acredito.

## DEDICATÓRIA

Dedico a minha querida avó Maria Marina Oliveira Ribeiro (*in memoriam*) por tudo que fez por mim ao longo de sua vida.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
2.1. Coleção de bactérias.....	11
2.2. Cultivo e extração de DNA .....	11
2.3. PCR para confirmação do gênero.....	12
2.4. Identificação de raça T3 e T4 com <i>primers</i> específicos .....	12
2.5. Análise da diversidade de isolados da coleção e identificação de haplótipos.....	12
2.6. Teste com <i>primers</i> desenhados para identificação da Raça 4.....	13
3. RESULTADOS .....	16
4. CONCLUSÕES.....	30
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31

## Lista de tabelas

Tabela 1. Lista de isolados advindos de tomateiro com sintomas de mancha bacteriana.....	11
Tabela 2. Lista de primers desenhados para identificação de isolados da raça 4 .....	15
Tabela 3. Combinação de pares de primers para a identificação de isolados raça 4 com nome de cada primer e tamanho do fragmento esperado.....	15
Tabela 4. Código das temperaturas usadas nas PCRs gradiente para testes dos pares de <i>primers</i> para identificação de isolados da raça 4. ....	15
Tabela 5. Lista dos 30 isolados utilizados no presente estudo com os resultados dos testes com os primers X-gum F7/R7 e BOX-A1R.....	16

## RESUMO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma cultura de grande importância, estando presente na mesa de grande parte dos brasileiros, além de fazer parte da culinária da maioria dos países ao redor do mundo. A produtividade do tomate é afetada por diversos fatores bióticos e abióticos. Entre os bióticos, as bacterioses são um problema para a produção, como a murcha bacteriana, cancro bacteriano e mancha bacteriana. Essa última é causada por um complexo de bactérias do gênero *Xanthomonas*, *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e *X. hortorum* pv. *gardneri*. Dentro de cada espécie podem existir diversas raças do patógeno. Em 2018, isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* de São Paulo, foram encontrados causando sintomas em cultivares de tomateiro previamente identificados como resistentes à doença e foram identificados como sendo da raça 4. Com o sequenciamento do tipo MinION (Oxford-Nanopore) foi confirmada a presença de um *transposon* interrompendo o gene *avrXv3*. Considerando essa nova variante, o presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de *primers* para a identificação de uma suposta nova raça 4 de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. A coleção de isolados cedidos pela Embrapa Hortaliças foram confirmados para o gênero *Xanthomonas* com os *primers* X-gum F7/R7 e analisados quanto sua diversidade por BOX-PCR com o *primer* BOX-A1R. Somente um isolado não foi considerado *Xanthomonas* e removido dos demais testes. Quatro haplótipos foram identificados entre os 30 isolados. Das nove combinações de *primers* específicos para a raça 4. Quatro não obtiveram amplificação alguma, e as cinco restantes obtiveram diversas amplificações inespecíficas tanto nos isolados alvo quanto nos isolados controle, entre elas a combinação quatro se mostrou a mais promissora, mas são necessários testes futuros para refinamento de um protocolo eficiente de detecção.

**Palavras-chave:** bacteriose, mancha-bacteriana, PCR.

## 1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma cultura de grande importância no cenário da produção agrícola do Brasil, sendo encontrado diariamente na mesa de milhares de brasileiros. É conhecida por ter uma alta concentração de licopeno, que é um antioxidante poderoso no combate do excesso de radicais livres, sendo assim um bom aliado no combate de patologias graves como o câncer (Marques 2015).

Os principais produtores mundiais de tomate são a China com aproximadamente 56 milhões de toneladas, seguido da Índia e Estados Unidos com 18 e 13 milhões de toneladas respectivamente, o Brasil por sua vez ocupa a nona colocação com cerca de 4 milhões de toneladas produzidas (FAOSTAT, 2018). Segundo o IBGE (2020), os principais estados brasileiros produtores do tomate são Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Bahia Paraná e Santa Catarina, sendo o estado de Goiás responsável pela maior produção com aproximadamente 1,15 milhão de toneladas produzidas no ano de 2020.

Diversos fatores podem reduzir a produtividade da cultura do tomateiro, entre elas as abióticas e bióticas. Entre as bióticas pode-se citar as doenças causadas por fungos, como Murcha de Fusarium causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Snyder e Hansen 1940), Pinta Preta causada por *Alternaria solani* (Sorauer 1896), entre outras. Oomycetos também causam doenças no tomateiro, como no caso da requeima ou mela causada por *Phytophthora infestans* (Bary 1861). Diversas doenças causadas por vírus acometem o tomateiro, sendo as espécies pertencentes aos gêneros *Begomovirus*, *Tospovirus* e *Crinivirus* frequentemente relatados como os principais causadores de viroses na cultura do tomateiro (Souza. 2016). As espécies de nematoide das galhas, *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White 1919) e *M. javanica* (Treub 1885), encontra-se amplamente distribuídas nas lavouras de tomate espalhadas pelo Brasil, além disso os gêneros *Belonolaimus*, *Trichodorus* e *Paratrichodorus* causam relevantes prejuízos a produção de tomate mundial (Pinheiro et al. 2014). Finalmente, as bacterioses também podem causar grandes perdas chegando em alguns casos de ataque severo ao



percentual de 100% de perda na propriedade, embora não tenha sido encontrado dados precisos sobre a porcentagem de perda devido as bacterioses em âmbito nacional sabe-se que essas doenças causam relevantes prejuízos como por exemplo murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum* (Yabuuchi et al. 1995). Essa bacteriose é problemática especialmente pela sua grande capacidade de sobrevivência no solo. O cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tem uma rápida dispersão dentro da lavoura e pode causar perdas maiores que 50% (Lopes 2017), a podridão mole *Pectobacterium* spp. (Winslow et al. 1920) ataca principalmente o tomate de mesa, em cultivos estaqueado especialmente nas regiões de clima quente e úmido (Lopes e Ávila 2005), a pinta bacteriana *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* é uma doença que tem preferência por climas de temperatura mais amenas e com alta umidade do ar (Lopes e Ávila 2005).

*Xanthomonas* é um gênero de bactéria capaz de causar doença em plantas, ela pode causar uma doença conhecida como mancha bacteriana, essa doença se favorece em temperaturas entre 20 e 30°C, seus sintomas podem ser facilmente confundidos com outra doença chamada de pinta bacteriana especialmente quando se observa apenas as folhas, porém a mancha bacteriana causa lesões maiores e mais claras nos frutos como também pode provocar queda de flores (Silva et al 2006). Nas folhas, os primeiros sintomas aparecem como pequenas áreas encharcadas com formato irregular, posteriormente, formam-se lesões necróticas maiores com aspecto seco, podendo apresentar halos amarelados em ataques severos, as lesões podem coalescer e provocar amarelecimento e morte das folhas. Normalmente, esses sintomas são primeiro em folhas baixas (Araújo. 2014). A doença é causada por até quatro grupos de *Xanthomonas*, esses grupos sofreram várias alterações taxonômicas através dos anos sendo atualmente classificadas como: *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* e *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri*.

O estudo taxonômico atual das espécies de *Xanthomonas* atual baseia-se em teste bioquímicos, teste de patogenicidade, análise de ácidos graxos, além de métodos moleculares como PCR (*polimerase chain reaction*), todos esses métodos e estudos tem resultado em um grande avanço no conhecimento

científico para com o gênero *Xanthomonas* (Tonin 2012). E suas interações como patógeno em diferentes culturas de interesse econômico ao redor do Brasil e do mundo, além de possibilitar o desenvolvimento de estratégias para o combate as perdas de produção causadas por esse gênero.

No que diz respeito a classificação levando em consideração as raças, o gênero *Xanthomonas* é classificado da seguinte forma: *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (raça T1), *Xanthomonas vesicatoria* (Raça T2), *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (raças T3, T4, T5) e *Xanthomonas hortorum* pv. *gardneri* (raças T2).

A divisão em raças auxilia na diferenciação dentro do nível de patovar, as raças são definidas com base em reações de um grupo definido de genótipos das hospedeiras (Leach e White 1996) vale destacar que as raças estão sempre ligadas a resistência de determinado patógeno aos métodos de controle, e em geral a existência de uma nova raça, demonstra que os métodos de controle até então conhecidos e utilizados não estão mais surtindo o efeito desejado para a redução da população do patógeno, como por exemplo as raças de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. Os isolados de cada espécie podem ser caracterizados quanto a raças, de acordo com a capacidade de causar ou não reação de hipersensibilidade em variedades diferenciais (Stall et al. 2009)

Para identificar as raças pode-se utilizar técnicas bioquímicas, sorológicas sendo que atualmente as técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) são as mais utilizadas na identificação de raças de *Xanthomonas*. Conforme o estudo de (Araújo. 2014), as técnicas moleculares, marcadores tipo rep-PCR (Lema et al. 2012) e iniciadores específicos (Kizheva et al. 2013) são comumente usados para caracterização de coleções de fitobactérias em nível específico e intraespecífico. (p.17)

O objetivo desse trabalho foi de executar testagem de diferentes combinações de *primers* por nós desenvolvidos a fim de saber se são eficientes na amplificação de isolados de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* de uma suposta nova raça 4.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleção de bactérias

A coleção composta por 30 isolados provenientes de plantas de tomateiro com sintomas similares aos da mancha bacteriana foram cedidos pela Embrapa Hortaliças e utilizados em todas as etapas do presente trabalho (Tabela 1). Todos os isolados estão preservados em tubos com água e mantidos em temperatura ambiente.

**Tabela 1.** Lista de isolados advindos de tomateiro com sintomas de mancha bacteriana.

Código original	Código utilizado	Código original	Código utilizado
EH2018-62	D1	EH2018-85	D16
EH2018-63	D2	EH2018-86	D17
EH2018-65	D3	EH2018-89A	D18
EH2018-67	D4	EH2018-90	D19
EH2018-70	D5	EH2018-91	D20
EH2018-72A	D6	EH2018-92	D21
EH2018-74	D7	EH2010-60	D22
EH2018-75A	D8	EH2011-103	D23
EH2018-76	D9	EH2011-105	D24
EH2018-78	D10	EH2011-105	D25
EH2018-79A	D11	EH2011-107	D26
EH2018-81	D12	EH 2011-107	D27
EH2018-82	D13	EH2011-130	D28
EH2018-83	D14	EH2011-132	D29
EH2018-84A	D15	EH2011-132	D30

Isolados pertencentes à coleção de trabalho de Bactérias Fitopatogênicas de Hortaliças da Embrapa Hortaliças, Brasília DF.

### 2.2. Cultivo e extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio NA por 48 horas a 28 °C em câmara de crescimento. Após esse período, colônias com aparência amarela e mucóide foram transferidas para novas placas de Petri com meio NA e cultivada sob as mesmas condições. Colônias de aparência típica foram raspadas com uma alça de repicagem para microtubos de 1,5 mL com água MilliQ para congelamento e

posterior uso. Os isolados tiveram seus DNAs extraídos pelo protocolo de Mahuku (2004).

### **2.3. PCR para confirmação do gênero**

Para confirmação de que os isolados de tomateiro são do gênero *Xanthomonas*, foi utilizado os *primers* X-gumD F7/R7 (Adriko et al., 2014). Para a PCR foi usado o kit GoTaq PCR Master Mix (Promega, EUA) para a reação total de 10 µL com 2,4 µL de água MilliQ, 5,0 µL de GoTaq buffer, 0,2 µL de cada *primer* (10 µM), 2 µL de DNA (50 ng/µL) e 0,15 µL de GoTaq enzyme. No termociclador foi usado o seguinte programa: desnaturação inicial de 4 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C e 1 min a 72 °C com um passo de extensão final de 6 min a 72 °C.

Para visualização dos resultados foi feita uma eletroforese em gel de agarose (1%) em TBE, corante GelRed (Biotium, EUA) e captura de imagens em transiluminador.

Somente os isolados que amplificaram com os primers X-gumD F7/R7 foram analisados nos demais testes.

### **2.4. Identificação de raça T3 e T4 com *primers* específicos**

Visando identificar as raças dos isolados, foram usados os *primers* RST88/RST89 de (Astua-Monge et al. 2000). A reação foi composta por 2,4 µL de água MilliQ, 5,0 µL de GoTaq Mix, 0,2 µL de cada *primer* (10 mM), 0,2 µL de GoTaq Enzyme e 2 µL de DNA (50 ng/µL). No termociclador foram usadas as seguintes configurações: Um ciclo de 95°C por 30 segundos, um ciclo de 48°C por 30 segundos, um ciclo de 72°C por 1 minuto; seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Por fim, um ciclo de 72°C por 5 minutos.

A visualização dos resultados seguiu o protocolo descrito no item 2.3.

### **2.5. Análise da diversidade de isolados da coleção e identificação de haplótipos**

Para análise da diversidade dos isolados e seleção de representantes para os testes de *primers* desenhados, foi utilizado o *primer* BOX-A1R (Versalovic et al., 1994) para análise de BOX-PCR. A reação de BOX-PCR foi montada para 10,2  $\mu$ L sendo dividido em 1  $\mu$ L do *primer* BOX-A1R (10mM), 5  $\mu$ L do GoTaq Buffer, 0,2  $\mu$ L da GoTaq Enzyme.

A visualização dos resultados foi feita de forma similar ao descrito anteriormente, porém com gel de agarose com 1,5% de concentração.

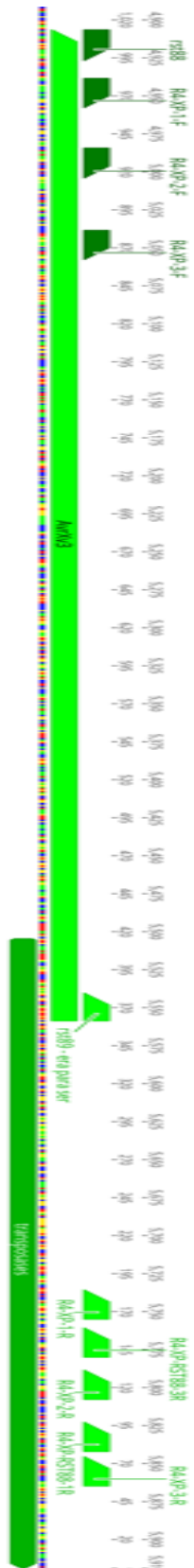
A identificação dos haplótipos foi realizada visualmente pela identificação do padrão de bandas geradas no gel de eletroforese.

## **2.6. Teste com *primers* desenhados para identificação da Raça 4**

Combinações de nove pares de *primers* foram desenhadas (Tabela 2; Tabela 3) de acordo com o sequenciamento realizado previamente de um dos isolados de São Paulo e caracterizado como raça 4. Os *primers* foram desenhados na região próxima ao sítio de anelamento do *primer* RST88 como também dentro do *transposon* identificado na terminação próxima ao anelamento do *primer* RST89 (Figura 1).

Para os testes foram realizadas PCRs gradiente com intervalos entre 56 e 68°C (Tabela 4)

Os isolados selecionados foram D1 e posteriormente o D2 e D19 representando os isolados de raça 4 de São Paulo enquanto o isolado D22 foi usado como referência da raça 3 e o D23 posteriormente o D24 foi a referência para a raça 4 do Centro-Oeste.



**Figura 1.** Visualização do sequenciamento de nucleotídeos da região sequenciada com a inserção de um *transposon* no gene *AvrXv3*.

**Tabela 2.** Lista de primers desenhados para identificação de isolados da raça 4.

<b>Primers Forward</b>	<b>Primers Reverse</b>
RST88	R4-XP-1-R
R4-XP-1-F	R4-XP-2-R
	R4-XP-3-R
	R4-XP-RST88-1R
	R4-XP-RST88-3R

**Tabela 3.** Combinação de pares de primers para a identificação de isolada raça 4 com nome de cada primer e tamanho do fragmento esperado.

<b>Combinação</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Tamanho esperado</b>
PR1	RST88	R4-XP-1-R	850 PB
PR2	RST88	R4-XP-2-R	900 PB
PR3	RST88	R4-XP-3-R	959 PB
PR4	RST88	R4-XP-RST88-1R	937 PB
PR5	RST88	R4-XP-RST88-3R	875 PB
PR6	R4-XP-1-F	R4-XP-1-R	818 PB
PR7	R4-XP-1-F	R4-XP-2-R	870 PB
PR8	R4-XP-1-F	R4-XP-3-R	928 PB
PR9	R4-XP-1-F	R4-XP-RST88-1R	905 PB
PR10	R4-XP-1-F	R4-XP-RST88-3R	884 PB

**Tabela 4.** Código das temperaturas usadas nas PCRs gradiente para testes dos pares de *primers* para identificação de isolados da raça 4.

<b>Temperaturas</b>
68°C
65,6°C
63,3°C
58,3°C
56° C

As PCRs com as combinações de *primers* desenhados para a identificação de isolados de raça 4 foram visualizadas em gel de agarose 1% corados com GelRed e marcador 1kb plus (Invitrogen, EUA).

### 3. RESULTADOS

A partir do uso dos *primers* X-GUM F7/R7 (Adriko et al. 2014). Foi confirmado que todos os isolados com exceção do D11(EH2018-79A) foram positivos para amplificação, gerando um fragmento de 350 pb. O isolado D11 foi removido dos demais testes. A compilação dos dados de todos os isolados está na tabela 4. Os primers X-GUM F7/R7 tem como objetivo amplificar o gene gumD presente em um operon que sintetiza uma substância denominada de goma xantana, que é um composto que só é encontrado em bactérias desse gênero. Devido a esse fato, os primers X-GUM F7/R7 são comumente utilizados na identificação de *Xanthomonas*, mostrando boa eficiência (Katzen et al. 1998; Ferreira 2021).

**Tabela 5.** Lista dos 30 isolados utilizados no presente estudo com os resultados dos testes com os primers X-gum F7/R7 e BOX-A1R.

Código original	Código utilizado	Primers X-gum F7/R7	<i>avrXv3</i> RST88/89	Haplótipos BOX-PCR BOX-A1R
EH2018-62	D1	Positivo	-	1
EH2018-63	D2	Positivo	-	1
EH2018-65	D3	Positivo	-	1
EH2018-67	D4	Positivo	-	2
EH2018-70	D5	Positivo	-	3
EH2018-72A	D6	Positivo	-	1
EH2018-74	D7	Positivo	-	1
EH2018-75A	D8	Positivo	-	1
EH2018-76	D9	Positivo	-	1
EH2018-78	D10	Positivo	-	1
EH2018-79A	D11	Negativo	-	-
EH2018-81	D12	Positivo	-	1
EH2018-82	D13	Positivo	-	1
EH2018-83	D14	Positivo	-	1
EH2018-84A	D15	Positivo	-	1
EH2018-85	D16	Positivo	-	3
EH2018-86	D17	Positivo	-	1
EH2018-89A	D18	Positivo	-	1
EH2018-90	D19	Positivo	-	1
EH2018-91	D20	Positivo	-	4
EH2018-92	D21	Positivo	-	4
EH2010-60	D22	Positivo	600	3
EH2011-103	D23	Positivo	1400	-
EH2011-105	D24	Positivo	1400	-



EH2011-105	D25	Positivo	1400	-
EH2011-107	D26	Positivo	1400	-
EH 2011-107	D27	Positivo	1400	-
EH2011-130	D28	Positivo	1400	-
EH2011-132	D29	Positivo	1400	-
EH2011-132	D30	Positivo	1400	-

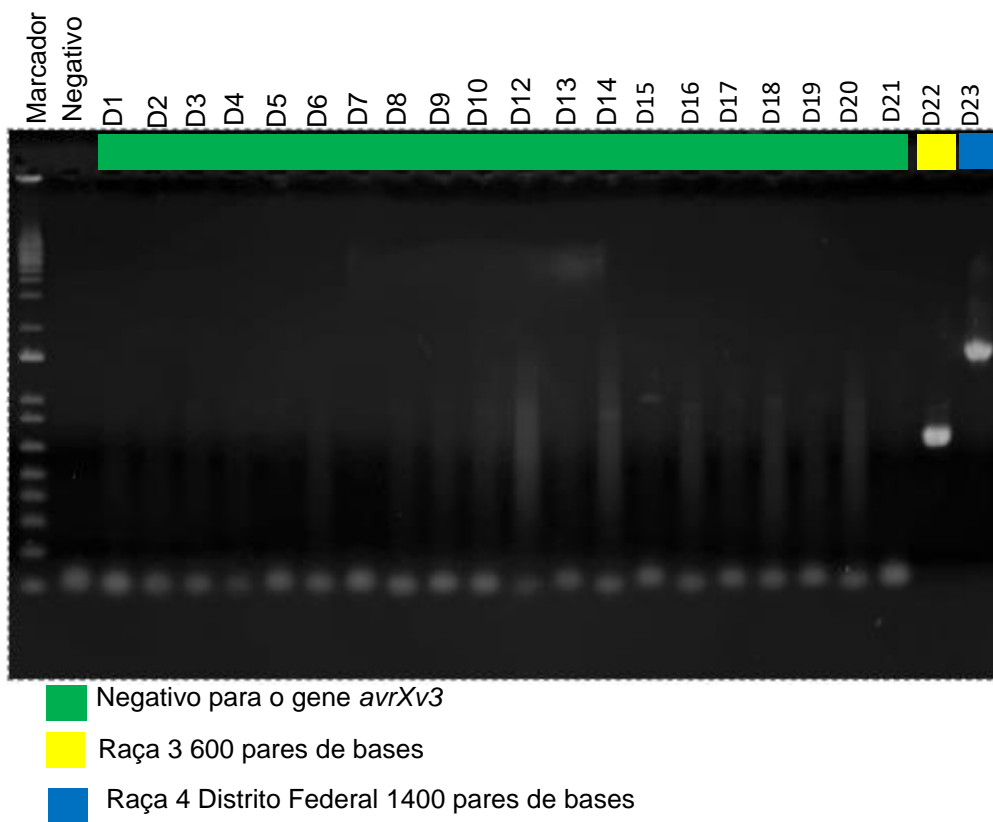
Após aferir que todos os isolados pertenciam ao gênero *Xanthomonas*, foi avaliada a presença do gene *avrXv3*, para tal foram utilizados os *primers* RST88 e RST89: Os isolados D23 (EH2011- 103), D24 (EH2011105), D26 (EH2011-107), D28 (EH2011-130) e D29 (EH2011- 132) coletados no ano de 2011 na região do Distrito Federal são da raça 4, uma vez que amplificaram 1400 pb com os *primers* RST88 e RST89, como descrito por Araújo (2014). O isolado D22 (EH2010- 60) utilizado como controle se comportou da forma esperada e amplificou 600 pb, sendo classificado como raça 3, segundo recomendação de Jones et al. (1995).

A não amplificação de um fragmento com os *primers* RST88/89 pode indicar a não existência desse gene, ou uma possível alteração na região de anelamento desses *primers*, essa alteração se deve ao fato da região de anelamento do *primer* reverso (RST89) não existir. A falta de uma região para anelamento dos *primers* onde estaria localizado o gene *avrXv3* pode indicar a ausência do mesmo ou uma nova raça do patógeno.

A perda de genes de avirulência estão associadas com a produção de novas raças do patógeno, como por exemplo, os isolados identificados por Araújo (2014) se trata da raça 4 do patógeno, resultante da inserção de um transposon no centro do gene *avrXv3*, não interferindo com o sítio de anelamentos dos *primers* RST88/89, porém interferindo com a ação da proteína que seria gerada. Outro exemplo é o trabalho de Filho et al. (2015) onde ele descreve a supressão da resistência de plantas de tomateiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* devido ao surgimento de diversas raças que adquirem patogenicidade através de regiões específicas ricas em *transposons* e genes com perfil evolutivo distinto.

O melhoramento das culturas gera produtos de melhor qualidade e com resistência. De modo a serem plantadas consecutivamente em grande

quantidade e em áreas extensas pelos agricultores, levando ao aparecimento de epidemias que podem comprometer a capacidade produtiva das lavouras. Essas epidemias decorrem de uma seleção direcional de raças que superam essa resistência criando assim um ciclo chamado de *boom and bust*, além disso o uso de parentais comuns e suscetíveis gera estreitamento de base genética e facilita o surgimento de novas raças (Pink 2002; Silva 2009). Como consequência cultivares anteriormente resistentes podem se tornar susceptíveis a essa nova variante do patógeno, dificultando o manejo da doença.



**Figura 2:** Gel de agarose (1,5%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR com os primers RST88 e RST 89. A cor verde indica os negativos para o gene *avrXv3*, o isolado de raça 3 é representado pela cor amarela e o isolado de raça 4 pela cor azul. Negativo: controle sem uso de DNA. Marcador: marcador 1kb plus (Invitrogen).

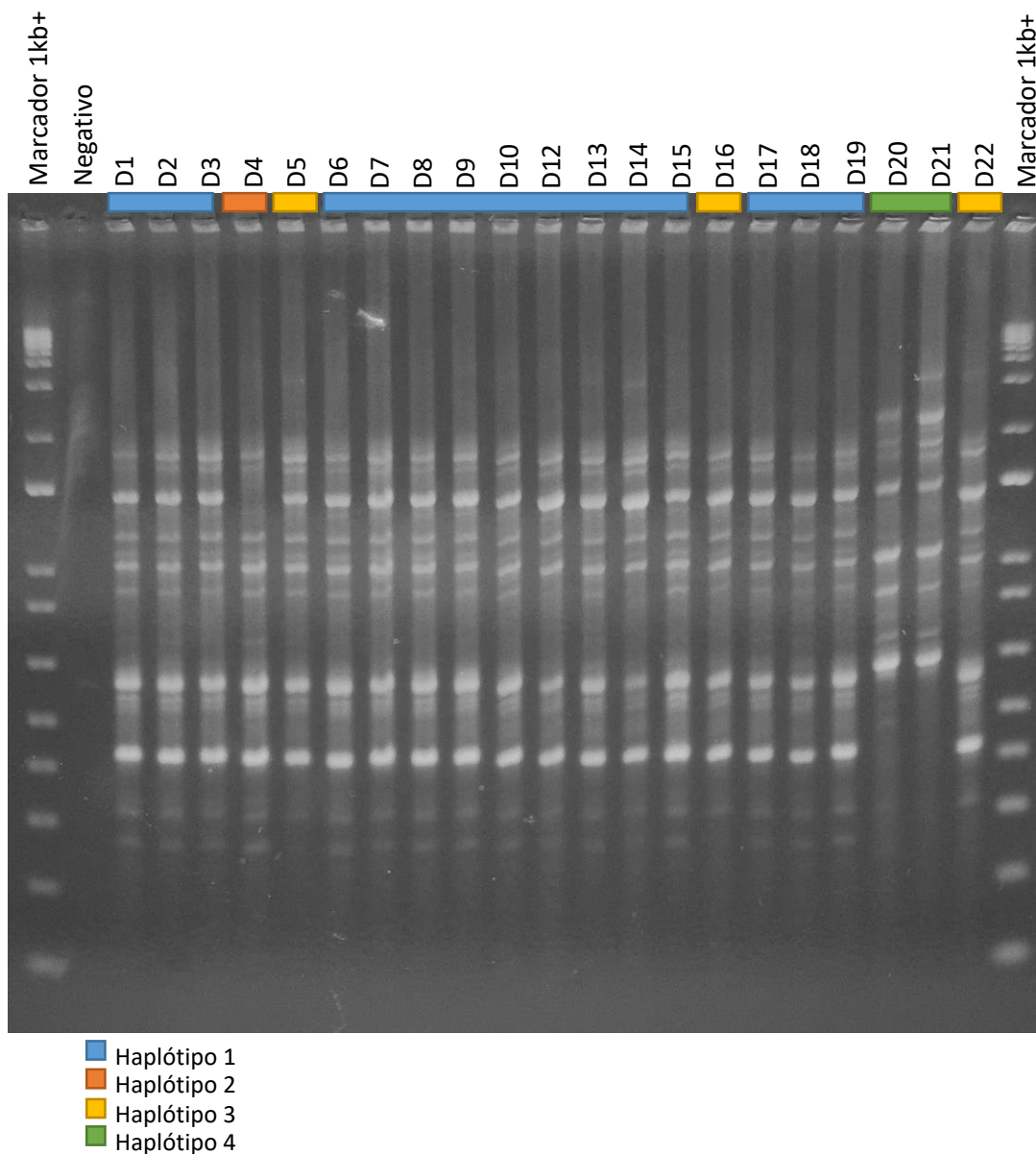


Raça 4 Distrito Federal 1400 pares de base

**Figura 3:** Gel de agarose (1,5%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR com os *primers* RST88 e RST89. Cor azul indica os isolados de raça 4. Negativo: controle sem uso de DNA. Marcador: marcador 1kb plus (Invitrogen).

Na análise de BOX-PCR com os isolados de *Xanthomonas* de tomateiro da raça desconhecida juntamente com os de raça 3 e de raça 4 do Centro-Oeste, foram identificados quatro perfis de amplificação, porém com elevados níveis de identidade entre eles (Figura 3). Pelo padrão de amplificação, mesmo os isolados com mesma procedência, apresentaram variabilidade genética e isolados de raças diferentes agruparam com isolados com resposta de raças distintas. O isolado D1, D2, D3, D7, D8, D9, D10, D12, D13, D14, D15, D17, D18 e D19 foram considerados do haplótipo 1; o isolado D4 apresentou perfil único e foi considerado o haplótipo 2; os isolados D5, D16 e D22 foram idênticos e considerados parte do haplótipo 3; e os isolados D20 (raça 3) e D21 agruparam como haplótipo 4. Assim como o marcador BOX-PCR outras técnicas como RAPD e FLP são eficientes e muito usadas em análises de perfil de amplificação (Hoffmann e Barroso 2006), porém, nesse estudo foi utilizada a técnica de BOX-PCR. Essa técnica tem um bom funcionamento para espécies de *Xanthomonas* como descrito por Zhai et al. (2010), Raghavendra et al. (2013), Rouhrazi e Khodakaramian (2014), Ivanović et al. (2015), Araújo et al. (2017). O BOX-PCR

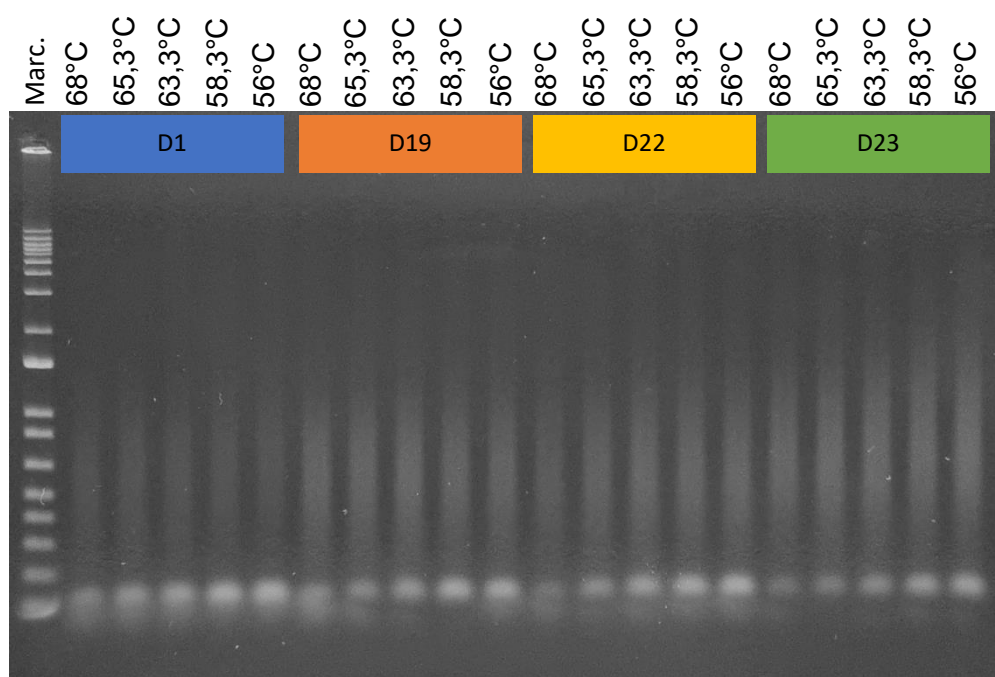
demonstrou pouca variação entre os isolados de *Xanthomonas* sendo assim foi considerado 4 haplótipos como descritos anteriormente, após a análise do perfil de bandas, o BOX-PCR, é considerado eficiente não apenas para analisar diversidade de isolados de bactéria, mas também para indicar homogeneidade de isolados de gêneros de bactérias incluindo *Xanthomonas*.



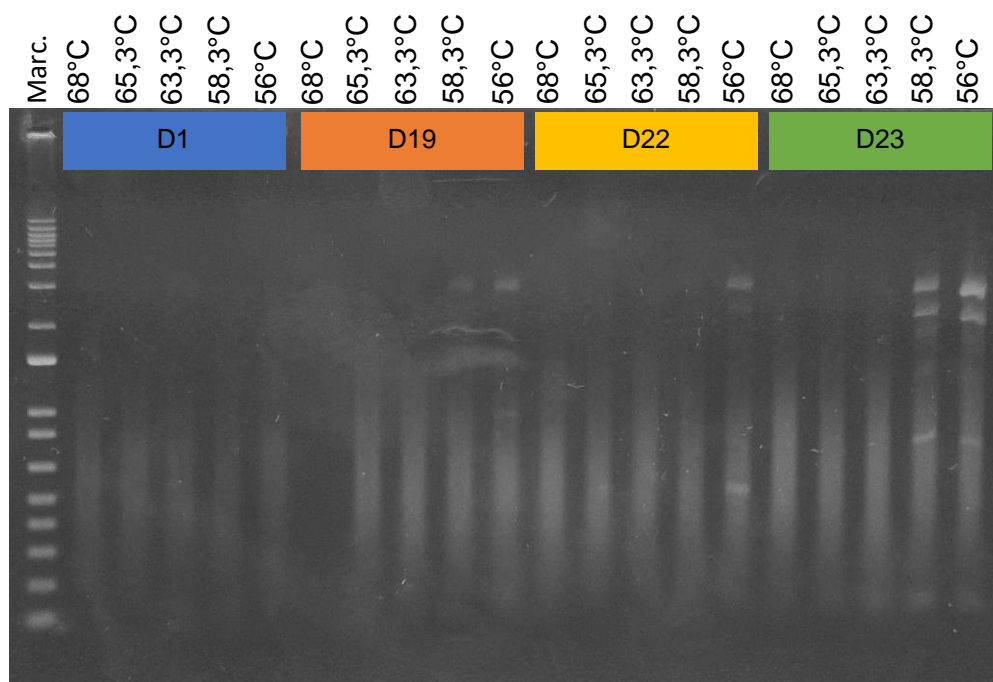
**Figura 4.** Gel de agarose (1,5%) resultante da eletroforese de BOX-PCR com o *primer* BOX-A1R. Cores indicam os agrupamentos (haplótipos) dos isolados

segundo similaridade do perfil de fragmentos gerados. Negativo: controle sem uso de DNA. Marcador: marcador 1kb plus (Invitrogen).

A combinação 1 de *primers* (RST88 / R4-XP-1-R) não resultou em amplificação para os isolados avaliados independente da temperatura usada no teste com gradiente 68-58 °C, é imaginado que essa não amplificação está relacionada com as temperaturas utilizadas e que novos testes com temperaturas menores variando em torno de 45° a 50°C resultarão em alguma amplificação (Figura 4). Para a combinação 2 de *primers* (RST88 / R4-XP-2-R), não foram identificadas amplificações para o isolado D1, enquanto para os isolados D19, D22 e D23, somente ocorreu à amplificação de fragmentos em temperaturas mais baixas, como 58 °C e 56 °C (Figura 5). Também ocorreu à amplificação de mais um fragmento em cada reação.



**Figura 5.** Gel de agarose (1,0%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR com a combinação de *primers* 1 (RST88 / R4-XP-1-R). Quadros coloridos indicam os intervalos de cada isolado, D1, D19, D22 e D23. Na parte superior estão listadas as temperaturas do gradiente, 68 °C, 65,6 °C, 63,3 °C, 58,3 °C e 56 °C. Marc.: marcador 1kb plus (Invitrogen).

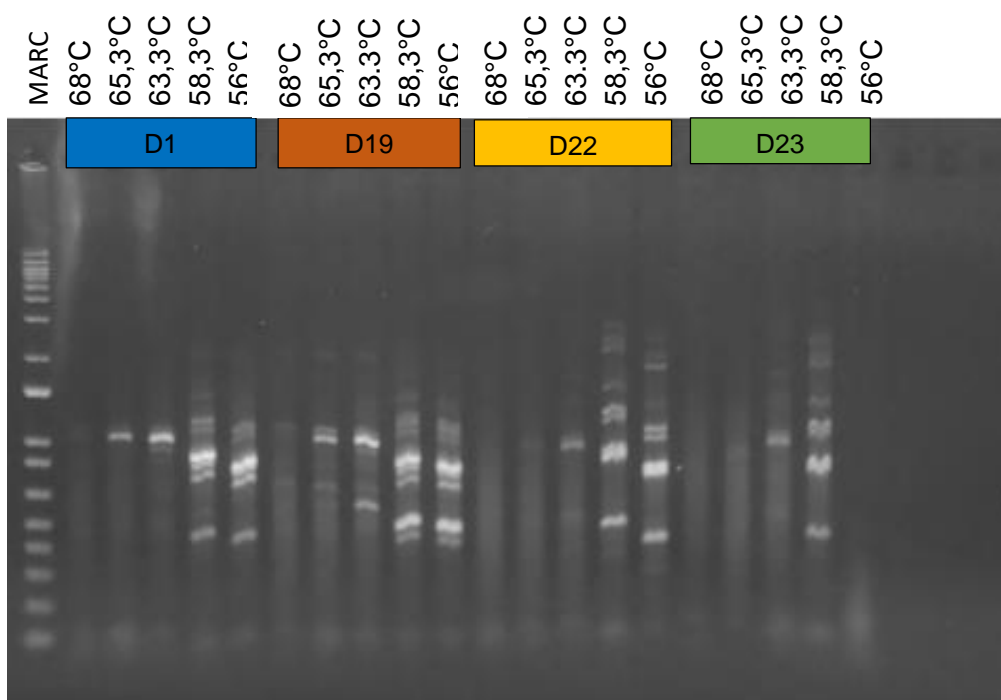


**Figura 6.** Gel de agarose (1,0%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR com a combinação de *primers* 2 (RST88 / R4-XP-2-R). Quadros coloridos indicam os intervalos de cada isolado, D1, D19, D22 e D23. Na parte superior estão listadas as temperaturas do gradiente, 68°C, 65,6 °C, 63,3 °C, 58,3 °C e 56 °C. Marc.: marcador 1kb plus (Invitrogen).

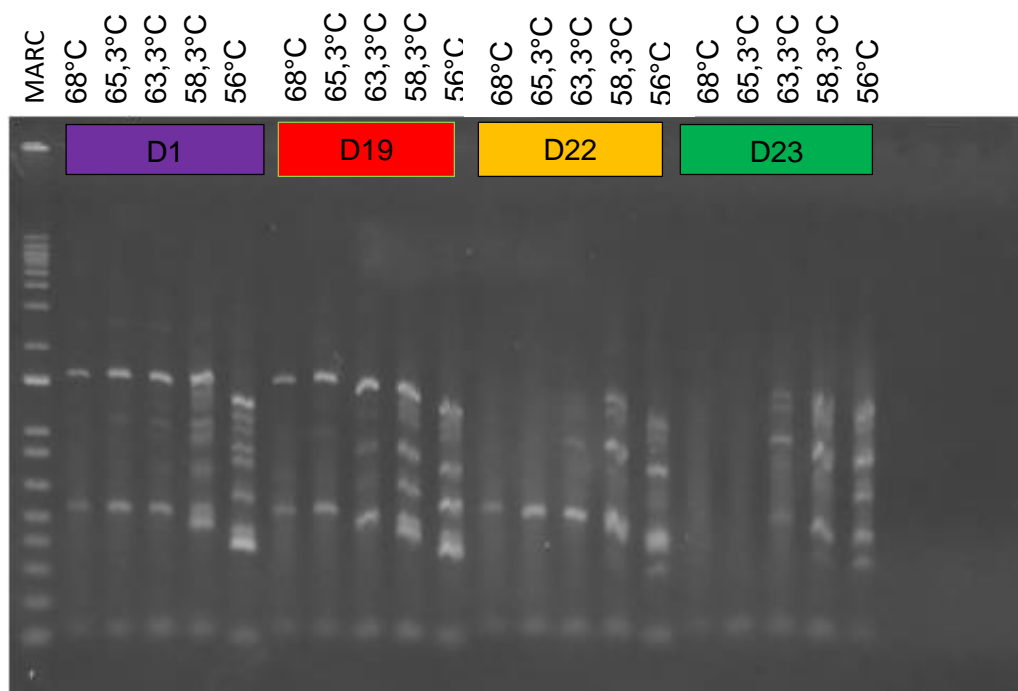
A combinação de *primers* 3 (RST88 / R4-XP-3-R) obteve amplificação de aproximadamente 1000 pares de base para todos os isolados e não somente para os isolados alvos (D1 e D19) e em todas as temperaturas com exceção da temperatura mais alta 68°C (Figura 6), nas temperaturas mais baixas (58,3 e 56 °C) ocorreu à amplificação de diversos fragmentos.

Para a combinação de *primers* 4 (Figura 7) observa-se que foi gerado dois fragmentos, um de aproximadamente 500 pares de base, sendo esse amplificado pelos isolados D1, D19, D22. O outro, de aproximadamente 1600 pares de base, amplificado apenas pelos isolados alvos D1 e D19. Entretanto esse tamanho é bem maior do que o que foi esperado para essa combinação, que é de aproximadamente 937 pares de base (tabela 1). Isso se deve ao fato dos *primers* utilizados nessa combinação terem apresentado amplificação inespecíficas, ou seja, o primer ter se anelado em uma região diferente da planejada uma hipótese para esse anelamento em região diferente se deve ao

fato de não termos em mãos todo o sequenciamento do genoma mas sim apenas uma região do mesmo, também é observado o anelamento em isolados que não deveriam ser amplificados, isso é uma das dificuldades do desenho de *primers* específicos (Hoffmann e Barroso 2006; Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os *primers* utilizados nas combinações testadas nesse trabalho foram planejados para resultar em uma sequência do método de terminação da cadeia, ou método de Sanger (Sanger et al. 1977) eles tinham o objetivo de gerar fragmentos de tamanho variando entre 720 a 959 pares de base conforme descrito na tabela 3. De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, percebe-se que não ocorreram ampliações do tamanho esperado, e sim a formação de bandas de tamanhos variados.



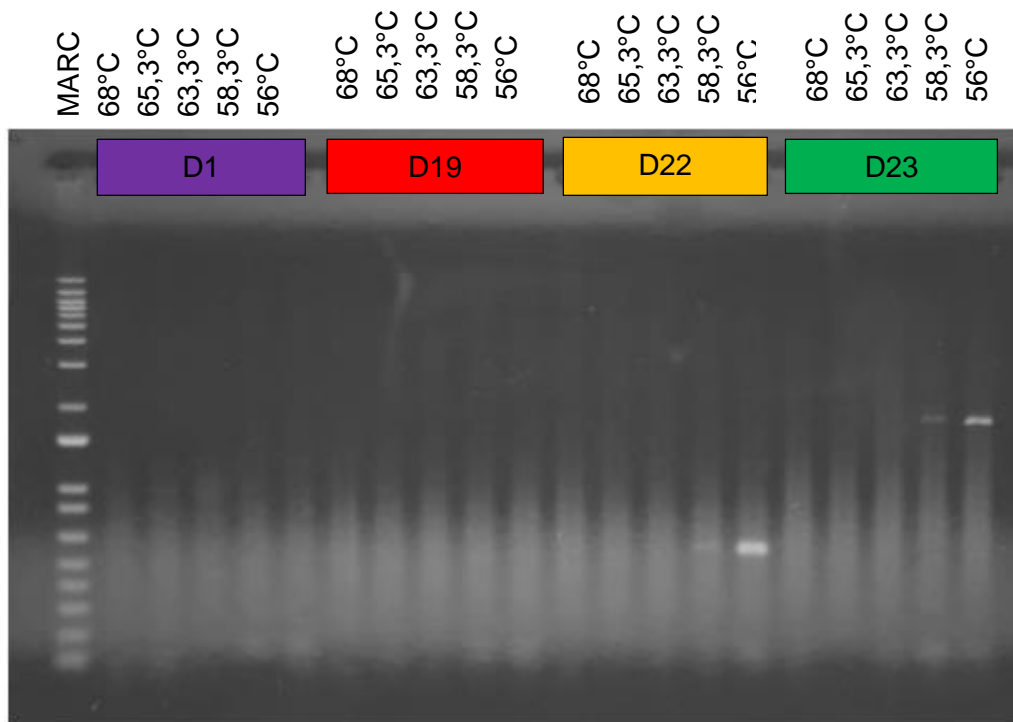
**Figura 7.** Gel de agarose (1,0%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR com a combinação de *primers* 3 (RST88 / R4-XP-3R). Quadros coloridos indicam os intervalos de cada isolado, D1, D19, D22 e D23. Na parte superior estão listadas as temperaturas do gradiente, 68°C, 65,6 °C, 63,3 °C, 58,3 °C e 56 °C. Marc.: marcador 1kb plus (Invitrogen).



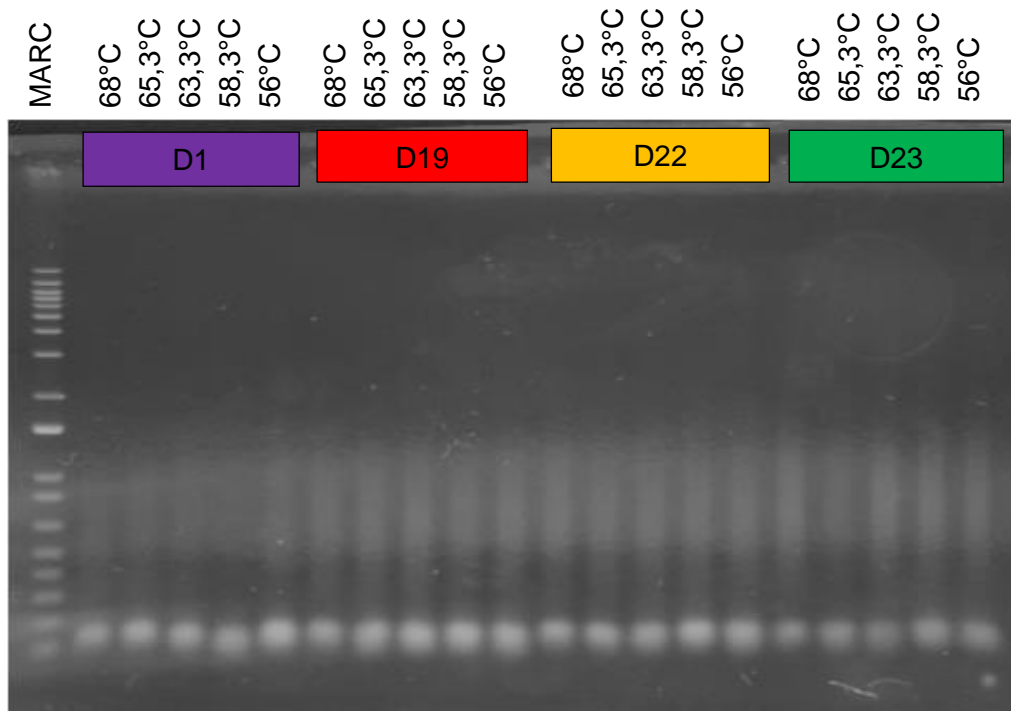
**Figura 8.** Gel de agarose (1,0%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR com a combinação de primers 4 (RST88 / R4-XP-RST88-1R). Quadros coloridos indicam os intervalos de cada isolado, D1, D19, D22 e D23. Na parte superior estão listadas as temperaturas do gradiente, 68°C, 65,6 °C, 63,3 °C, 58,3 °C e 56 °C. Marc.: marcador 1kb plus (Invitrogen).

A combinação de *primers* 5 (RST88 / R4-XP-RST88-3R) não obteve amplificação para nenhum dos isolados alvos (D1, D19) em nenhuma das temperaturas utilizadas no teste gradiente 68-56°C. Apenas ocorreram ampliações de aproximadamente 600 pb para o isolado D23 na temperatura mais baixa 56°C (Figura 8) e uma maior, de cerca de 2000 pb para o isolado D24, também nas temperaturas mais baixas 58,3°C e 56°C. A combinação de *primers* 7 (R4-XP-1-F/ R4-XP-2-R) e a combinação de *primers* 8 (R4-XP-1-F/R4-XP-3-R) não resultaram em amplificação para nenhum isolado e nenhuma temperatura (Figura 9 e Figura 10).

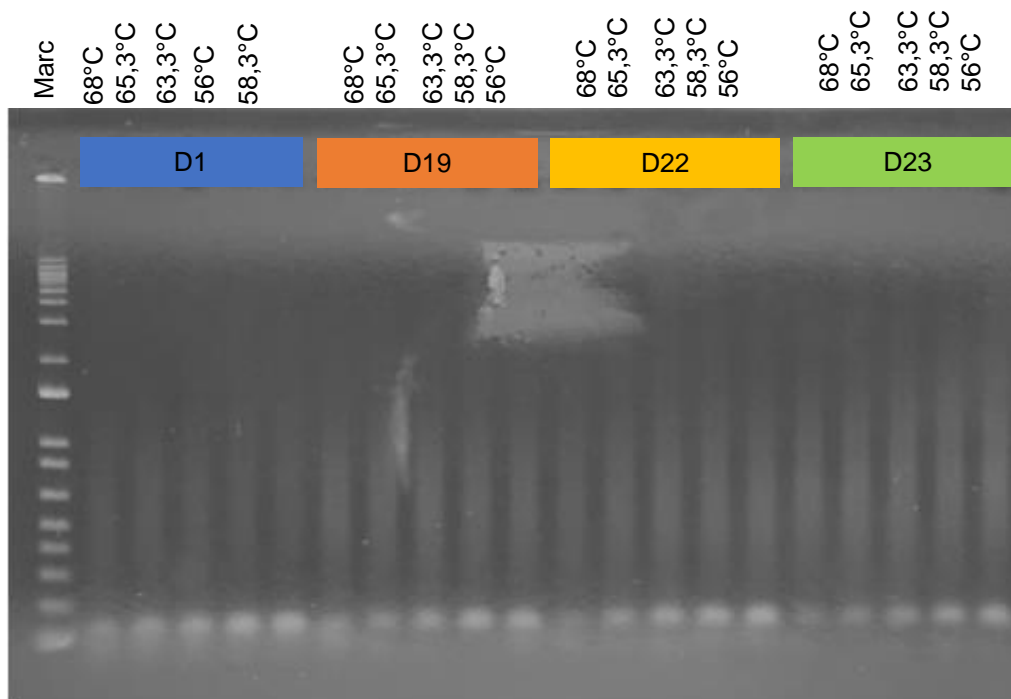




**Figura 9.** Gel de agarose (1,0%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR com a combinação de *primers* 5 (RST88 / R4-XP-RST88-3R). Quadros coloridos indicam os intervalos de cada isolado, D1, D19, D22 e D23. Na parte superior estão listadas as temperaturas do gradiente, 68°C, 65,6 °C, 63,3 °C, 58,3 °C e 56 °C. Marc.: marcador 1kb plus (Invitrogen).

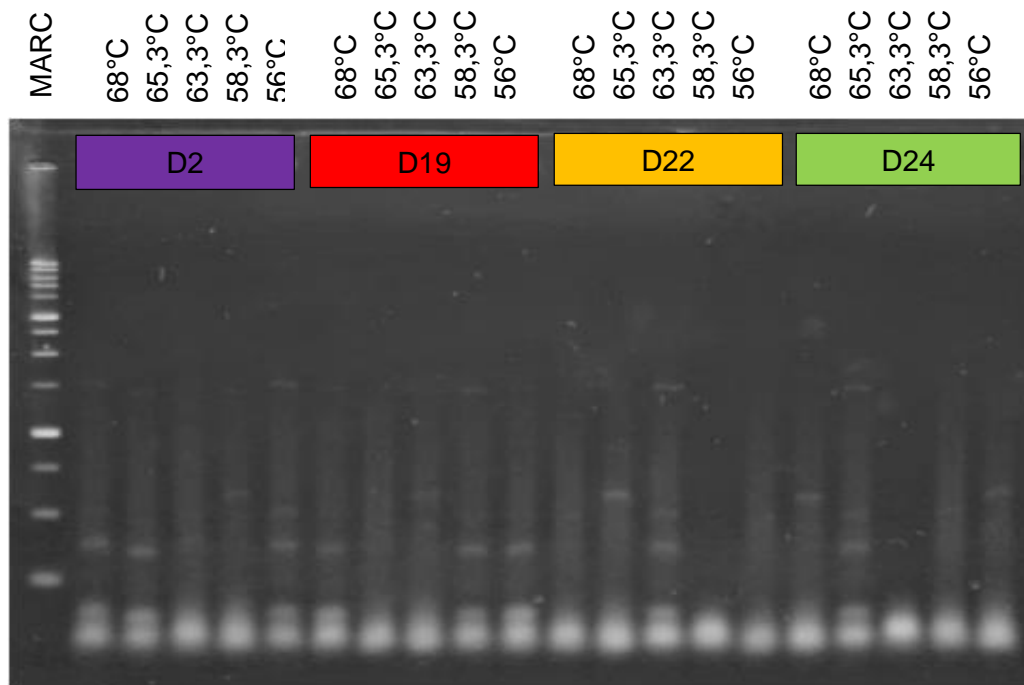


**Figura 10.** Gel de agarose (1,0%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR com a combinação *primers 7* (R4-XP-1-F / R4-XP-2-R). Quadros coloridos indicam os intervalos de cada isolado, D1, D19, D22 e D23. Na parte superior estão listadas as temperaturas do gradiente, 68°C, 65,6 °C, 63,3 °C, 58,3 °C e 56 °C. Marc.: marcador 1kb plus (Invitrogen).

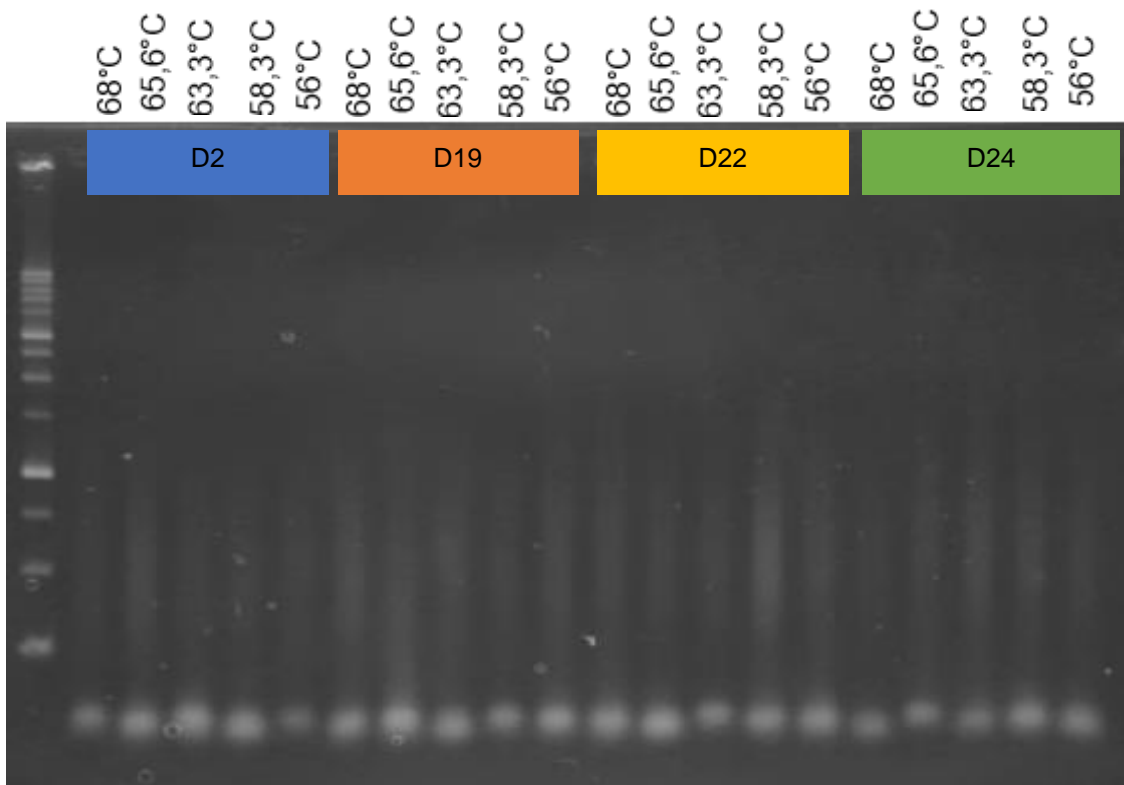


**Figura 11.** Gel de agarose (1,0%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR com a combinação de *primers* 8 (R4-XP-1-F/ R4-XP-3-R ). Quadros coloridos indicam os intervalos de cada isolado, D1, D19, D22 e D23. Na parte superior estão listadas as temperaturas do gradiente, 68°C, 65,6 °C, 63,3 °C, 58,3 °C e 56 °C. Marc.: marcador 1kb plus (Invitrogen).

Na combinação de *primers* 9 (R4-XP-1-F / R4-XP-RST88-1R) todos os isolados obtiveram uma discreta amplificação de aproximadamente 150 pb em diferentes temperaturas (Figura 11). Também ocorreu à amplificação de cerca de 2000 pb para o isolado D2 na temperatura mais baixa, para o isolado D19 na temperatura de 58,3°C, para o isolado D22 na temperatura de 63,3°e para o isolado D24 na temperatura de 65,3°C. Para a combinação de *primers* 10 (Figura 12) não fora obtido amplificação para nenhum isolado em nenhuma temperatura.



**Figura 12.** Gel de agarose (1,0%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR com a combinação de *primers* 9 (R4-XP-1-F / R4-XP-RST88-1R). Quadros coloridos indicam os intervalos de cada isolado, D2, D19, D22 e D24. Na parte superior estão listadas as temperaturas do gradiente, 68°C, 65,6 °C, 63,3 °C, 58,3 °C e 56 °C. Marc.: marcador 1kb plus (Invitrogen).



**Figura 13.** Gel de agarose (1,0%) resultante da eletroforese dos produtos da PCR com a combinação de *primers* 10 (R4-XP-1-F / R4-XP-RST88-3R). Quadros coloridos indicam os intervalos de cada isolado, D2, D19, D22 e D24. Na parte superior estão listadas as temperaturas do gradiente, 68°C, 65,6 °C, 63,3 °C, 58,3 °C e 56 °C. Marc.: marcador 1kb plus (Invitrogen).

#### 4. CONCLUSÕES

- Com exceção do isolado D11 todos os demais isolados são do gênero *Xanthomonas*;
- Existe uma ampla diversidade genética entre os isolados analisados da espécie *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*;
- Nenhum dos *primers* desenhados tiveram sucesso na identificação dessa nova raça 4 de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adriko, J., Aritua, V., Mortensen, C. N., Tushemereirwe, W. K., Kubiriba, J., & Lund, O. S. Multiplex PCR for specific and robust detection of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* in pure culture and infected plant material. (2011) *Plant Pathology*, v. 61 n. 3, p. 489-497.

Araújo, E. R.; Diagnose molecular e estudos epidemiológicos de mancha-bacteriana do tomateiro. (2014). Tese (Doutorado em fitopatologia) – Departamento de fitopatologia, Universidade de Brasília, 2014.

Araújo, E. R., Costa, J. R., Ferreira, M. A. S. V., & Quezado-Duval, A. M. Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil (2017). *Plant Pathology*, v. 66 n. 1, p. 159-168.

Astua-Monge, G., Minsavage, G.V., Stall, R.E., Davis, M.J., Bonas, U., Jones, J.B. 2000. Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* v.13 p.911–921.

Duval, A. M. Q., Camargo L. E. A. Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil (2004). *Horticultura Brasileira*, Brasília v.22, n.1, p. 80-86.

FAOSTAT (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION STATISTICS) (2018) Food and agriculture organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

Ferreira M. E., Grattapaglia D., Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética; 3ª Edição, Embrapa. 1998.

Ferreira, L. C. Variabilidade Genética e Resistência ao cobre de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* agente causal da queima bacteriana em cebola no Centro-

Oeste. 2021, tese (Mestrado em Fitopatologia) Departamento de fitopatologia, Universidade de Brasília, 2021.

Filho. R. C., DIANESE, E. Aspectos moleculares da interação *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e o tomateiro (2015). Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 23, n. 1, p. 110-127.

Hoffmann L. V.; Barroso P. A. Documentos N° 147 Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas. Campina Grande EMBRAPA. 2006

Ivanović, Ž., Popović, T., Janse, J., Kojić, M., Stanković, S., Gavrilović, V., & Fira, D. Molecular assessment of genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains from Serbia by various DNA fingerprinting techniques. (2015) European journal of plant pathology, v. 141 n. 1, p. 133-145.

Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., & Schaad, N. W. (2004). Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. Systematic and applied microbiology, v. 27 n. 6 p. 755-762.

Leach, J. E., White, F. F. Bacterial avirulence genes. (1996) Annual review of phytopathology, v. 34 n. 1, p. 153-179.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. Doenças do tomateiro. Brasília; EMBRAPA. 2005.

Lopes, C. A. Documentos N°154 Cancro bacteriano do tomateiro. Brasília; EMBRAPA 2017

Ma, L., Cornelissen, B. J., Takken, F. L., A nuclear localization for Avr2 from *Fusarium oxysporum* is required to activate the tomato resistance protein I-2. (2013) Frontiers in Plant Science v. 4 p. 94.

Mahuku, G.S. 2004. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. Plant Molecular Biology Reporter v.22 n. 71–81



Marques, C. S. S. O Licopeno como composto bioativo do tomate. 2015. Tese (Mestrado em qualidade e Tecnologia Alimentar) – Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu. 2015.

Monteiro, V. L. B., Identificação e caracterização de isolados causadores da mancha bacteriana em Teca (*Tectona grandis*). 2020, tese (Mestrado em fitopatologia) Departamento de fitopatologia, Universidade de Brasília, 2020.

Pink, D. A. C., Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica, Wageningen*, v. 124, n.2, p.227-236, mar. 2002

Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N. F., Patil, P. B., Ryan, R. P., ... & Jones, J. B., Comparative genomics reveals diversity among *Xanthomonas* infecting tomato and pepper. (2011) *BMC genomics*, v.12 n. 1 p. 1-23.

Rouhrazi, K., Khodakaramian, G. Genetic fingerprinting of Iranian *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains inducing black rot disease of crucifers (2014). *European journal of plant pathology*, v. 139 n. 1, p. 175-184.

Raghavendra, B. T., Singh, D., Yadava, D. K., Mondal, K. K., & Sharma, P. Virulence analysis and genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot of crucifers. (2013) *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, n. 46 v. 2, p. 227-242.

Stall, R.E., Jones, J.B., Minsavage, G.V., Durability of resistance in tomato and pepper to *Xanthomonas* causing bacterial spot (2009). *Annual Review of Phytopathology* v. 47 p. 265-284.

Silva D.D., Resistência de Híbridos de sorgo e diversidade de *Colletotrichum sublineolum*. 2009, tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras 2009.

Souza T. A. Tomato chlorosis virus, hospedeiras alternativas e interação com tospovírus em tomateiro. 2016. Tese (Mestrado em fitopatologia) – Departamento de fitopatologia, Universidade de Brasília, 2016

Tonin, M. F. Caracterização taxonômica de espécies do gênero *Xanthomonas*. 2012. Tese (Mestrado em fitopatologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 2012.

Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria

and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* v.19 n. 24 p. 6823-6831

Zhai, J., Luo, Y., Zheng, D., & Huang, X. (2010). Evaluation of Genetic Diversity of Highly Virulent Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* by rep-PCR Fingerprinting. (2010) *Journal of Phytopathology*, v. 158 n. 11-12 p. 764-768.