



ESPECIFICIDADE DOS *primers* Pas-R/Pas3-D e Pas-R/Pas-D NA DETECÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* DO ESTADO DO PARÁ

Resumo: A mancha bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) destaca-se entre as doenças da cultura do maracujazeiro. Ocorre sob condições de umidade e temperaturas altas e se encontra disseminada no Estado do Pará. O objetivo deste trabalho foi avaliar a especificidade dos pares de *primers* Pas-R/Pas3-D e Pas-R/Pas-D na detecção de 29 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* provenientes de diferentes regiões produtoras de maracujá do Estado. Verificou-se que os *primers* Pas-R e Pas3-D amplificaram 2 fragmentos de aproximadamente 750pb e 250pb nos isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Enquanto que os *primers* Pas-R e Pas-D amplificaram 1 fragmento de aproximadamente 1000pb.

Palavras-chave: Mancha bacteriana do maracujazeiro, variabilidade genética, *primers*

Introdução

A mancha bacteriana, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira Gonçalves & Rosato, é uma das mais severas doenças do maracujazeiro, causando perdas expressivas na cultura. A doença pode ser facilmente reconhecida, pelo encharcamento do tecido, com coloração verde-escura, ao redor das manchas que se formam nas folhas (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2007). No entanto, a detecção de patógenos tem sido facilitada pela utilização de sondas específicas de DNA e principalmente pelo uso de *primers* específicos em reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) (GONÇALVES & ROSATO, 2002) Dispondo-se de *primers* desenhados especificamente para uma espécie, patovar ou linhagem patogênica, é possível detectar o patógeno em uma planta hospedeira, mesmo antes que provoque a doença e os sintomas sejam visíveis (MUNHOZ, 2009). O objetivo deste trabalho foi avaliar a especificidade dos *primers* Pas-R/Pas3-D e Pas-R/Pas-D na detecção de 29 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* provenientes de diferentes regiões produtoras de maracujá do Estado do Pará.

Material e Métodos

Para avaliar a especificidade dos pares de *primers* Pas-R (5' - CACAGCTGCCATGATGAG-3')/Pas3-D (5'- GAGGCGTTTTTGGGACCC -3'), e Pas-R (5' - CACAGCTGCCATGATGAG-3')/Pas-D (5'- CACAGCTGCCGAAAGAAG- 3'), inicialmente foi realizada a extração de DNA dos



isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e de um isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Aliquotas de 1,5 mL de cultura bacteriana crescidas por 24 horas em meio 523 (KADO & HESKETT, 1970) foram centrifugadas e os precipitados ressuspensos com 567 µL de TE pH 8,0, 30 µL de SDS 20% e 3 µL de proteinase K 20 mg/mL. A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de CTAB 10%, a mistura foi então incubada a 65°C. Após a extração com clorofórmio e isopropanol, o DNA foi ressuspensado em 50 µL de TE+RNase. A concentração de DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando o marcador de peso molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen).

As reações de PCR foram elaboradas em um volume total de 25 µL contendo 1,5 mM de MgCl₂, 100 mM de dNTP, 1,5 mM de cada primer e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Gibco, BRL) e 20-50 ng de DNA. As condições de amplificação foram: 3' a 94°C, 35 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 58°C e 1' a 72°C (GONÇALVES & ROSATO, 2002). Os produtos da amplificação foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando o marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) para estimar o tamanho dos fragmentos.

Resultados e Discussão

No estudo da especificidade dos pares de *primers* Pas-R/Pas3-D e Pas-R/Pas-D na detecção de 29 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* verificou-se que os *primers* Pas-R e Pas3-D amplificaram 2 fragmentos de aproximadamente 750pb e 250pb (Figura 1). Para o isolado de *X. campestris* pv. *campestris* os *primers* Pas-R e Pas3-D amplificaram 2 fragmentos de aproximadamente 250pb e outro aparentemente um pouco maior que o de 750pb encontrado para *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, deixando dúvidas sobre a utilização deste par de *primer* para a identificação desta espécie.

Os *primers* Pas-R e Pas-D amplificaram 1 fragmento de aproximadamente 1000pb para os isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (Figura 2) enquanto que, para o isolado de *X. campestris* pv. *campestris* amplificaram 1 fragmento de aproximadamente 350pb, demonstrando alta especificidade para a detecção da espécie *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Resultados diferentes são apresentados por Gonçalves & Rosato (2002), onde para o par de *primers* Pas-R/Pas3-D os isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* amplificaram 1 fragmento de 300pb, e com o par de *primers* Pas-R/Pas-D nenhum isolado apresentou amplificação. Essa diferença provavelmente se deve a variabilidade do patógeno.

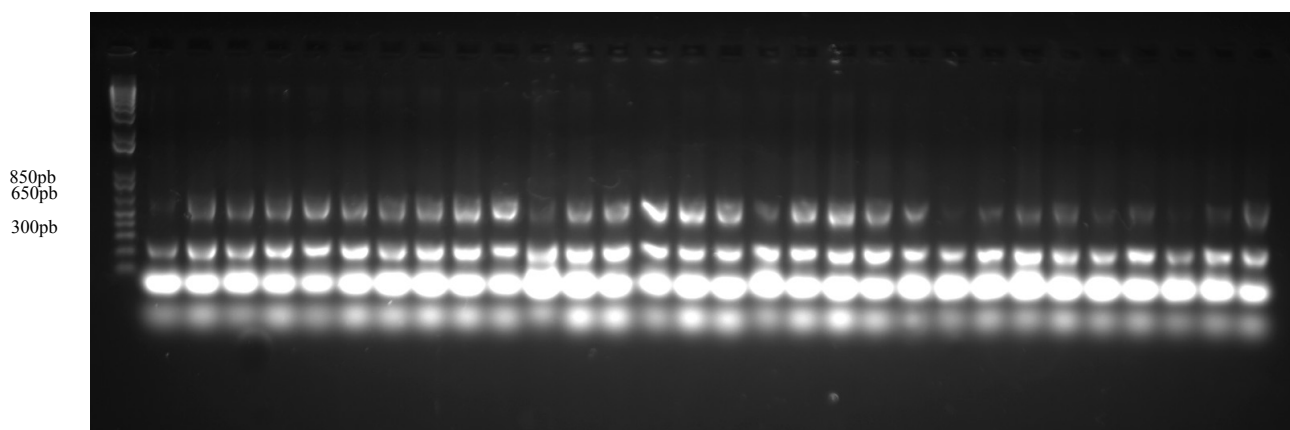


Figura 1. Amplificação de DNA de isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* utilizando-se os *primers* Pas-R e Pas3-D. 1. *X. campestris* pv. *campestris*, 2. PA1, 3. PA2-1, 4. PA3-1, 5. PA3-2, 6. PA3-3, 7. PA3-4, 8. PA4-1, 9. PA4-2, 10. PA4-3, 11. PA4-4, 12. PA4-5, 13. PA4-6, 14. PA4-7, 15. PA5-1, 16. PA5-2, 17. PA5-3, 18. PA5-4, 19. PA5-5, 20. PA7-2, 21. PA8-4, 22. PA8-5, 23. PA-10, 24. PA-12, 25. PA-14, 26. PA-15, 27. PA-16, 28. PA-17, 29. PA-18, 30. PA-20. Marcador de peso molecular 1.0 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

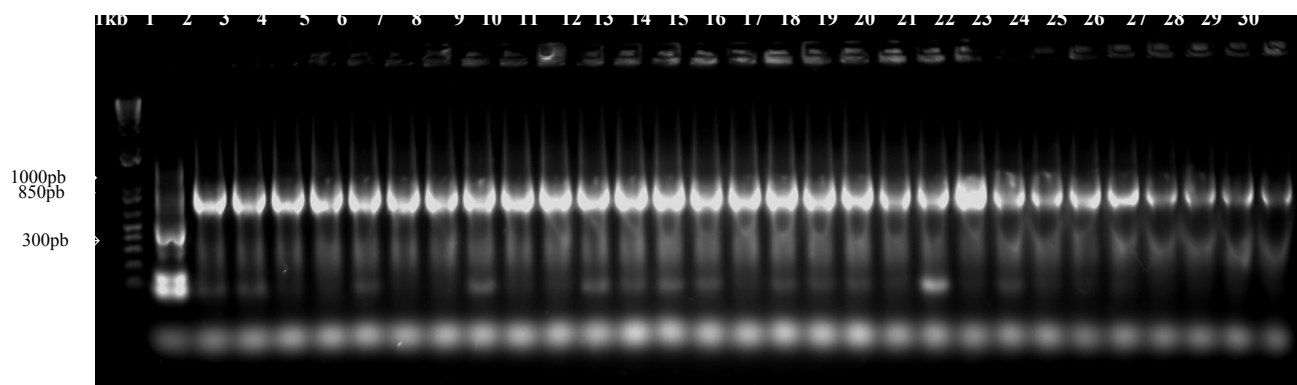


Figura 2. Amplificação de DNA de isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* utilizando-se os *primers* Pas-R e Pas-D. 1. *X. campestris* pv. *campestris*, 2. PA1, 3. PA2-1, 4. PA3-1, 5. PA3-2, 6. PA3-3, 7. PA3-4, 8. PA4-1, 9. PA4-2, 10. PA4-3, 11. PA4-4, 12. PA4-5, 13. PA4-6, 14. PA4-7, 15. PA5-1, 16. PA5-2, 17. PA5-3, 18. PA5-4, 19. PA5-5, 20. PA7-2, 21. PA8-4, 22. PA8-5, 23. PA-10, 24. PA-12, 25. PA-14, 26. PA-15, 27. PA-16, 28. PA-17, 29. PA-18, 30. PA-20. Marcador de peso molecular 1.0 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Conclusão

Os *primers* Pas-R e Pas3-D não foram específicos para a detecção de isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Os *primers* Pas-R/Pas-D demonstraram-se específicos para a detecção de isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* com a amplificação de fragmentos iguais para todos os isolados.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará e a Embrapa, pelo apoio financeiro.



Referências Bibliográficas

GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* utilizando-se sondas de DNA e “primers” específicos. **Summa Phytopathologica**, v.28, n.1, p.20-27, 2002.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L.; MATTIONI, J. A. M. **Doenças do maracujá no Estado de Roraima**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2007. 18 p. (Embrapa Roraima. Documentos, 01).

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, n.6, p.969-976, 1970.

MUNHOZ, C. F. **Diversidade genética de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* com base em marcadores de rep-PCR e AFLP e construção de primers específicos para diagnose**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.