

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DETECÇÃO DE *Burkholderia* spp. ASSOCIADAS A SEMENTES DE ARROZ
NACIONAIS E IMPORTADAS

Dana Moreira Cruz
Bióloga, UnC

Dissertação apresentada com o requisito
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Agosto de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Cruz, Dana Moreira
Detecção de Burkholderia spp. associadas a
sementes de arroz nacionais e importadas / Dana
Moreira Cruz. -- 2014.
85 f.

Orientador: Valmir Duarte.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2014.

1. Burkholderia. 2. Transmissão por sementes. 3.
Oryza sativa. I. Duarte, Valmir, orient. II. Título.

DANA MOREIRA CRUZ

Bióloga - Universidade do Contestado - UnC

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 29.08.2014
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 11.08.2015
Por

VALMIR DUARTE
Orientador - PPG Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

ROBERTO LANNA FILHO
PPG Fitotecnia/UFRGS

GERTRUDES CORÇÃO
PPG Microbiologia Agrícola e
do Ambiente/UFRGS

ANDRÉIA MARA ROTTA DE OLIVEIRA
FEPAGRO/RS

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

DEDICO

Aos meus queridos pais, Ubirajara e Nilda, que foram sempre meus maiores incentivadores e me mostraram que com dedicação e trabalho alcançamos nossos sonhos.

Meu eterno agradecimento por todo incentivo e por todo amor.

À minha irmã, Daniele, por entender as ausências necessárias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo em minha vida, pois sem ele seria impossível cumprir mais essa etapa.

À minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao professor e orientador Valmir Duarte, pelos ensinamentos, pela dedicação, pela paciência e por todo o auxílio.

Aos atuais e antigos colegas do Agrônômica-Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, em especial Marisa, Rita, Luciano, Edson, Marla, Renato, Margaroni, Samara, Vinícius F., Priscila, Fábio, Daniel, Julie, Renata, Juliane, Cristiane, Kellen, Josi, Raquel e Fernanda, pela amizade e pelo apoio em todos os momentos, e principalmente aos diretores Patrícia de Souza Teló e Valmir Duarte, pela oportunidade e pelo incentivo.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento da Fitossanidade.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Marisa Carvalho Bello.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos meus amigos sempre presentes em todos os momentos: Fábio, Fernanda P., Fabíola, Rita, Ismail, Yuliet, Tatiana, Michele, Suely, Soyan, e Rejane.

Às famílias Moreira e Oriques por todo carinho.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

DETECÇÃO DE *Burkholderia* spp. ASSOCIADAS A SEMENTES DE ARROZ NACIONAIS E IMPORTADAS¹

Autora: Dana Moreira Cruz

Orientador: Valmir Duarte

RESUMO

Burkholderia gladioli, *B. glumae* e *B. plantarii* causam o crestamento bacteriano da panícula e a podridão das plântulas do arroz e são transmitidas pelas sementes, mas não têm registro no Brasil. Considerando os registros do aumento do potencial de dano destas doenças à cultura do arroz no mundo e o intenso comércio nacional e internacional, esta pesquisa foi conduzida com o intuito de detectar, isolar e determinar as possíveis espécies presentes nas sementes de arroz. Utilizou-se 342 amostras, 290 de sementes importadas, onde 283 da Argentina, seis dos EUA, uma do Uruguai, e 52 amostras nacionais do RS, recebidas pelo Laboratório Agrônomo. Para o isolamento e PCR, 5 g de cada amostra de sementes foram agitados em 15 ml de PBS e Tween 20. Alíquotas (200 µl) foram incubadas em meio líquido para o enriquecimento e o restante, após adicionar 300 mg de PVPP e 150 mg de Na₂SO₃, foi agitado, sonicado e filtrado, sendo utilizado diretamente na qPCR com sonda para o gênero *Burkholderia*, qPCR com SYBR® Green para detectar a espécie *B. glumae* e PCR multiplex para as espécies *B. glumae*, *B. gladioli* e *B. plantarii*, conforme protocolo de extração proposto para Xoo/Xoc (Vera Cruz *et al.*, 2012). Colônias translúcidas, elevadas, com margens definidas, brancas acizentadas ou amarelas, Gram -, catalase +, oxidase +/-, RH + em tabaco, foram submetidas à qPCR e aos sistemas GN2 e GEN III (Biolog Inc., CA, EUA). A presença de *B. glumae* foi detectada em duas amostras de sementes importadas dos EUA. *B. vietnamiensis*, não fitopatogênica, foi detectada e confirmada em uma amostra nacional e duas importadas da Argentina. Embora os resultados positivos com as amostras de sementes nacionais na qPCR e PCR para *B. glumae*, isolados bacterianos não foram obtidos, não permitindo a confirmação da presença desta praga no Brasil. Em virtude da relevância da cultura do arroz no país e a confirmação de *B. glumae* em sementes importadas, a utilização do método de isolamento adaptado do IRRI, associado à qPCR, deve ser adotado nas análises de sementes importadas.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (73p.) Agosto, 2014.

DETECTION OF *Burkholderia* spp. ASSOCIATED TO NATIONAL AND IMPORTED RICE SEEDS¹

Author: Dana Moreira Cruz
Advisor: Valmir Duarte

ABSTRACT

Burkholderia gladioli, *B. glumae* and *B. plantarii* cause bacterial blight and rot panicle of rice seedlings and are transmitted by seeds, but do not have registration in Brazil. Considering the records of the increase in damage potential of these diseases to the rice crop in the world and the intense national and international trade, this research was conducted in order to detect, isolate and determine the possible species present in rice seeds. We used 342 samples, 290 of imported seed, where 283 of Argentina, six USA and a sample of Uruguay, and 52 national samples of RS received by the Laboratory Agronômica. For the isolation and PCR, 5 g of each sample seeds were stirred in 15 ml of PBS and Tween 20. Aliquots (200 µl) were incubated in liquid medium for the enrichment and the remainder, after adding 300 mg of PVPP and 150 mg Na₂SO₃, stirred, sonicated and filtered, and used directly in qPCR probe for the genus *Burkholderia*, qPCR with SYBR® Green to detect the species *B. glumae* and PCR multiplex for the species *B. glumae*, *B. gladioli* and *B. plantarii* as extraction protocol proposed for Xoo / Xoc (Vera Cruz et al., 2012). Translucent, elevated colonies, with greyish or yellow, Gram -, catalase +, oxidase +/-, HR + in tobacco were submitted to qPCR and GN2 and GEN III systems (Biolog Inc., CA, USA). The presence of *B. glumae* was detected and confirmed two samples of seeds imported from the USA. *B. vietnamiensis*, not plant pathogen, was detected and confirmed in a national sample and two imported from Argentina. Although the positive results with the national seed samples in qPCR and PCR for *B. glumae*, bacterial isolates were not obtained, not allowing for confirmation of the presence of this pest in Brazil. Based on the relevance of rice in the country and the confirmation of *B. glumae* in imported seeds, the method of isolation adapted from IRRI, associated with qPCR, should be adopted in the analysis of imported seeds.

¹ Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (73p.) August, 2014.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Cultura do arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	4
2.2 O gênero <i>Burkholderia</i>	5
2.2.1 <i>Burkholderia glumae</i>	7
2.2.2 <i>Burkholderia gladioli</i>	8
2.2.3 <i>Burkholderia plantarii</i>	9
2.3 Distribuição e danos.....	10
2.4 Sintomatologia e disseminação	11
2.5 Manejo	13
2.6 Métodos de detecção de <i>Burkholderia</i> spp. em sementes	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Estirpes bacterianas	19
3.1.1 Manutenção das culturas bacterianas	19
3.2 Clonagem dos fragmentos de DNA de <i>Burkholderia glumae</i>	20
3.3 Detecção de <i>Burkholderia</i> spp. por qPCR com sonda TaqMan.....	21
3.3.1 Amostras de arroz utilizadas nos experimentos	21
3.3.2 Preparo das amostras de arroz para detecção direta e por enriquecimento.....	22
3.3.3 Especificidade da sonda TaqMan.....	22
3.3.4 Eficácia da reação	23
3.3.5 qPCR com sonda TaqMan para detecção de <i>Burkholderia</i> spp. em sementes de arroz	23
3.3.6 Avaliação do método de obtenção de células ou DNA bacteriano usando qPCR para detecção de <i>Burkholderia</i> spp. em sementes de arroz inoculadas.....	24
3.3.6.1 Inoculação das sementes.....	24
3.3.6.2 Método de extração por lavagem.....	25
3.3.6.3 Método de extração por maceração.....	26
3.3.6.4 Método de extração direta e enriquecimento.....	26
3.4 Detecção de <i>Burkholderia glumae</i> por qPCR com SYBR® Green.....	26

	Página
3.4.1 Amostras de DNA.....	26
3.4.2 Especificidade dos oligonucleotídeos BgF e BgR.....	27
3.4.3 Limite de detecção.....	27
3.4.4 qPCR com SYBR® Green para detecção de <i>Burkholderia glumae</i>	27
3.4.5 Purificação dos produtos de amplificação para sequenciamento	28
3.4.6 Sequenciamento e análise dos produtos amplificados	29
3.5 Detecção de <i>Burkholderia glumae</i> , <i>B. gladioli</i> e <i>B. plantarii</i> por PCR multiplex	29
3.5.1 Amostra de DNA.....	29
3.6 Caracterização de isolados bacterianos obtidos de sementes de arroz positivos na qPCR para <i>Burkholderia</i> spp.	30
3.6.1 Isolados bacterianos das amostras positivas na qPCR	30
3.6.2 Morfologia, fisiologia e nutrição.....	31
3.6.3 Reação de hipersensibilidade.....	32
3.6.4 Perfil de utilização dos sistemas GN2 e GEN III.....	32
3.6.5 Virulência.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Clonagem.....	34
4.2 Eficiência da reação.....	35
4.3 Especificidade da sonda TaqMan	37
4.4 Detecção de <i>Burkholderia</i> spp. por qPCR usando o sistema TaqMan	37
4.5 Avaliação dos métodos de extração de DNA na detecção de <i>Burkholderia</i> spp. por qPCR usando o sistema TaqMan em sementes de arroz inoculadas	40
4.6 qPCR com SYBR® Green para <i>Burkholderia glumae</i>	42
4.6.1 Limite de detecção	42
4.6.2 Detecção de <i>Burkholderia glumae</i> por qPCR com SYBR® Green.....	44
4.6.3 Sequenciamento.....	46
4.7 PCR multiplex para <i>Burkholderia glumae</i> , <i>B. gladioli</i> e <i>B. plantarii</i>	48
4.8 Caracterização de isolados bacterianos obtidos de sementes de arroz positivos na qPCR para <i>Burkholderia</i> spp.	50
4.8.1 Isolamento do patógeno e testes de determinação	50
4.8.2 Reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco	52
4.8.3 Virulência.....	53
4.8.4 Utilização dos sistemas GN2 e GEN III.....	55

	Página
5 CONCLUSÕES.....	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8 APÊNDICE.....	73

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Estirpes bacterianas utilizadas no estudo como referência em PCR e qPCR. Porto Alegre, RS, 2014.....	20
2. Amostras de sementes de arroz nacionais e importadas. Porto Alegre, RS, 2014.....	21
3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR-multiplex para <i>Burkholderia</i> sp. (Maeda <i>et al.</i> , 2006). Porto Alegre, RS, 2014.....	30
4. Amostras de sementes de arroz positivas na qPCR com sonda de hidrólise TaqMan para <i>Burkholderia</i> spp. Porto Alegre, RS, 2014.....	31
5. Quantidade de DNA dos padrões de <i>Burkholderia</i> sp. empregados na curva de calibração e número o de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2014.....	36
6. Detecção de <i>Burkholderia</i> sp. em quatro métodos de extração em sementes de arroz inoculadas. Porto Alegre, RS, 2014.....	41
7. Quantidade de DNA dos padrões de <i>Burkholderia glumae</i> empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2014.....	43
8. Número de amostras de sementes de arroz nacionais e importadas com resultado positivo na qPCR por sonda de hidrólise para <i>Burkholderia</i> spp., qPCR por SYBR [®] Green e PCR multiplex. Porto Alegre, RS, 2014.....	49
9. Perfil dos isolados de <i>Burkholderia</i> sp. produtores de toxoflavina e qPCR positivas para o gênero. Porto Alegre, RS, 2014.....	55

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Análise eletroforética em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR obtidos com oligonucleotídeos específicos para *Burkholderia glumae* 1: Marcador 100 Kb DNA (Qiagen), 2-3: *Burkholderia glumae* purificado, clonado (Bk 3200)..... 35
2. Curva de calibração da concentração de DNA ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) de *Burkholderia* sp. em relação ao ciclo threshold (Ct). Porto Alegre, RS, 2014..... 36
3. Detecção de *Burkholderia* spp. em amostras de arroz através de qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores BF1/BR1 e sonda de hidrólise Burk P, específica para o gênero. Porto Alegre, RS, 2014..... 39
4. Curva de calibração da concentração de DNA ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) de *Burkholderia glumae* em relação ao ciclo threshold (CT). Porto Alegre, RS, 2014..... 43
5. Detecção de *Burkholderia glumae* através de qPCR com os oligos BgF/BgR usando DNA total das amostras de sementes de arroz e DNA molde de *B. glumae* como controle da reação. Porto Alegre, RS, 2014... 45
6. Alinhamento de sequências do gene da região 16S-23S rDNA ITS das amostras Bk09, Bk14, Bk26, Bk30, Bk32, Bk1592 e Bk1595 com a estirpe *Burkholderia glumae* BGR 1. Porto Alegre, RS, 2014..... 47
7. Alinhamento de sequências do gene da região 16S-23S rDNA ITS das amostras Bk07 e Bk32 com a estirpe *Burkholderia glumae* BGR 1. Porto Alegre, RS, 2014..... 47
8. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores glu-FW/glu-RV; gla-FW/gla-RV; pla-FW/pla-RV de quatro isolados de amostras de arroz importadas; M-marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Qiagen); 1-Bk 07(1), 2-3, 1592(1) e 1592(3), 4-238(5), 5-6, 1595(2) e 1595(5), 7-Bk 14(1), 8- Bk 35(1), 9-7312(4), 10-8600(1), 11-8716(1), 12-controle negativo (água), 13-controle positivo *B. gladioli* (479 pb), 14-controle positivo *B. glumae* (529 pb) e M-marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Qiagen) Porto Alegre, RS, 2014..... 49

9. A. Crescimento bacteriano em meio de cultivo B de King-MKB, colônia característica; B. Colônias de *Burkholderia* sp. mostrando a pigmentação amarela da toxoflavina em meio de cultivo B de King-MKB; C. Colônias de *Burkholderia* sp. de coloração branca em meio de cultivo B de King-MKB..... 51
10. Reação de hipersensibilidade de folhas de tabaco 24 h após a infiltração de suspensão de células de estirpes de *Burkholderia* sp. Porto Alegre, RS, 2013..... 53
11. Teste de virulência realizado sob escamas de cebola. A) Cebola inoculada com *Burkholderia glumae* apresentando maceração. B) Cebola assintomática sem a presença de maceração. Porto Alegre, RS, 2013..... 54
12. Perfil metabólico da bactéria *Burkholderia glumae* pelo sistema Biolog TM GN2 obtido do isolado 1595-2. Porto Alegre, RS, 2013..... 56
13. Perfil metabólico da bactéria *Burkholderia vietnamiensis* pelo sistema Biolog TM GENIII obtido do isolado 238-3. Porto Alegre, RS, 2014..... 57

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos mais importantes cereais em termos de valor econômico e social, sendo considerado a cultura de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania (AGRIANUAL, 2008). Dados da FAO mostram que a produção de arroz em 2012/13 atingiu cerca de 500 milhões de toneladas colhidas em uma área de aproximadamente 150 milhões de hectares. O Brasil está entre os dez maiores produtores de arroz do mundo, sendo destaque no Mercosul, com cerca de 2,4 milhões de hectares cultivados e uma produtividade estimada em 11,9 milhões de toneladas, seguido pelo Uruguai, Argentina e Paraguai (CONAB, 2013). A maioria das lavouras de arroz no país encontra-se na região sul, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor que utiliza o sistema de cultivo irrigado e responde por 66,5% da produção nacional (CONAB, 2013).

Sementes podem abrigar e transportar um grande grupo de microrganismos patogênicos. Essas associações podem ocasionar grandes epidemias no campo com até 100% de perdas (Goto *et al.*, 1988; Machado, 2000). Várias bactérias estão presentes em sementes de arroz (Cottyn *et al.*, 2001), mas somente algumas espécies são patogênicas e transmitidas pelas sementes, entre elas estão: *Pseudomonas fuscovaginae* (Batoko *et al.*, 1997; Cother *et al.*, 2009), *P. syringae* pv. *syringae* (Goto *et al.*, 1988), *Acidovorax*

avenae subsp. *avenae* (Cottyn, 1996), *B. gladioli* (Nandakumar *et al.*, 2009), *B. plantarii* (Azegami *et al.*, 1987), *B. glumae* (Kurita e Tabei, 1967) Urakami *et al.* 1994, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Mew *et al.*, 1992; Xie & Mew, 1998; Niño-Liu *et al.*, 2006).

Burkholderia glumae é considerado um dos mais importantes agentes patogênicos de arroz (Rush *et al.*, 2003), responsável pelo crestamento bacteriano da panícula (CBP). Em média, as perdas causadas no rendimento são de 15%, no entanto, já foram registradas perdas de 80% em campos severamente infectados no sudeste Asiático, nas Américas e na África (Fang *et al.*, 2009). *Burkholderia gladioli* e *B. plantarii* também são consideradas bactérias importantes para a cultura do arroz e estão associadas à podridão das sementes e morte das plântulas, além de mostrar sintomas semelhantes aos provocados por *B. glumae* (Azegami *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1994; Nunes *et al.*, 2009). No entanto, essas bactérias são isoladas com menor frequência de plantas e sementes de arroz infectadas e apresentam menor agressividade.

No caso do Brasil, de acordo com a Instrução Normativa nº 41 de 01 de julho de 2008 (D.O.U., 2008), a bactéria *B. glumae* é considerada praga quarentenária sem registros da ocorrência. Neste contexto, essa bactéria, caso introduzida no país, comprometeria seriamente a produção nacional de arroz, assim como a *B. plantarii*, também não reportada no país (Takeuchi *et al.*, 1997; Miyagawa & Inoue, 2002; Cabi, 2014). Notadamente, com o intenso intercâmbio comercial entre países, o que possibilita a transmissão de agentes fitopatogênicos por sementes, torna-se indispensável a implementação de medidas que permitam minimizar os riscos de entrada das pragas que ainda não ocorrem no país importador a fim de proteger a cadeia produtiva do agronegócio brasileiro.

Embora existam inúmeras técnicas e métodos disponíveis para a detecção de fitopatógenos, ainda não há uma padronização para o uso em laboratórios e inspeção para muitas bactérias. Contudo, um método bem estabelecido para tal finalidade consiste na Polymerase Chain Reaction (PCR) em tempo real (qPCR), que é descrito como uma importante ferramenta de detecção de fitopatógenos por permitir quantificar produtos de amplificação a cada ciclo da PCR (Schaad & Frederick, 2002; De Boer *et al.*, 2007).

Considerando registros de aumento do potencial de dano de doenças à cultura do arroz associadas à *Burkholderia* spp. no mundo (Ham *et al.*, 2011; Riera-Ruiz *et al.*, 2014) e ao intenso comércio nacional e internacional, o presente trabalho teve como objetivo principal propor a implantação de um método sensível e rápido, que possa ser adotado por laboratórios credenciados, com o intuito de atender à legislação para defesa fitossanitária em vigor e, com isso, prevenir a entrada e a disseminação de pragas no Brasil.

Objetivos específicos

Determinar a presença de *Burkholderia glumae*, *B. gladioli* e *B. plantarii* em amostras de sementes de arroz nacionais e importadas por PCR e qPCR.

Avaliar métodos de isolamento de células ou de extração de DNA para a detecção de *Burkholderia* sp. em sementes de arroz.

Identificar os isolados de *Burkholderia* spp. por métodos bioquímicos, fisiológicos e de DNA.

Avaliar a patogenicidade e virulência de isolados de *Burkholderia* spp.

Propor um protocolo de detecção de *B. glumae* em sementes de arroz para uso em laboratórios de diagnóstico fitossanitário.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do arroz (*Oryza sativa* L.)

O arroz é uma planta monocotiledônea da família das gramíneas (*Poaceae*), adaptada a ambientes aquáticos devido à presença de aerênquima no colmo e nas raízes das plantas, possibilitando a passagem de oxigênio do ar para a camada da rizosfera (SOSBAI, 2012). O ciclo de desenvolvimento do arroz pode ser dividido em três fases principais: plântula, vegetativa e reprodutiva. A duração de cada fase depende da cultivar, época de semeadura, região de cultivo e das condições de fertilidade do solo. A duração do ciclo varia entre 100 e 140 dias para a maioria das cultivares cultivadas em sistema inundado, sendo que a maior parte da variação entre cultivares ocorre na fase vegetativa. As cultivares de arroz de sequeiro têm duração de ciclo entre 110 e 155 dias (SOSBAI, 2012).

O arroz é a segunda maior cultura cerealífera produzida no mundo, especialmente nos países subdesenvolvidos, por ser de importante valor nutritivo e de custo relativamente baixo. A área ocupada pelo plantio é de aproximadamente 158 milhões de hectares, que representa uma produção de 489 milhões de toneladas (FAO, 2013). Em torno de 90% da produção de arroz é oriunda do continente Asiático. A América Latina ocupa o segundo lugar em produção de arroz e o terceiro em consumo. O Brasil é o nono maior produtor mundial e o maior fora do eixo asiático, com uma produção variando entre 11 e 13

milhões de toneladas, participando com cerca de 82% da produção do MERCOSUL (SOSBAI, 2010; FAO, 2013).

Na safra 2012/13, a América Latina produziu 24,5 milhões de toneladas, enquanto o Brasil foi responsável por uma produção de 11,6 milhões de toneladas (FAO, 2013). A Argentina e o Uruguai sustentaram posições inferiores, com produção no mesmo período, de 1,4 e 1,2 milhões de toneladas, respectivamente (CONAB, 2013).

As maiores áreas de cultivo de arroz no país são manejadas sob o sistema irrigado, tradicionalmente praticado na região sul do Brasil, que tem contribuído com a maior parte da produção nacional. Com 7,7 toneladas, a produção da região sul representa 67% do total brasileiro, com uma área cultivada de aproximadamente um milhão de hectares, isto é, 44,5% da área nacional (CONAB, 2013).

2.2 O gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* foi descrito por Yabuuchi *et al.* (1992) a partir da divisão do gênero *Pseudomonas* em decorrência da análise de hibridização RNAr-DNA que indicou considerável diversidade genética entre os membros destes dois gêneros, sendo a espécie *B. cepacia*, escolhida como espécie tipo. Estudos de taxonomia polifásica revelaram que *B. cepacia* não era uma única espécie. Constitui-se, assim, o que se chamou de complexo, composto de inúmeras novas espécies similares fenotipicamente (Vandamme *et al.*, 2002).

Este gênero é formado por bactérias Gram-negativas, pertencentes ao filo das Proteobacterias, classe Betaproteobacterias, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae (Holmes *et al.*, 1998; Ham *et al.*, 2011). As bactérias deste

gênero são bastonetes retos ou ligeiramente curvos; oxidase variável e catalase positiva (Savoia & Zucca, 2007). São bactérias móveis com um único flagelo polar ou um tufo de flagelos polares de acordo com a espécie, mesófilos e não esporulados, e seu metabolismo é aeróbico (Savoia & Zucca, 2001; Mahenthiralingam *et al.*, 2008).

As bactérias pertencentes a este gênero têm sido amplamente utilizadas para uma série de aplicações biotecnológicas, como agentes de biocontrole, promotores de crescimento vegetal, biorremediação, biodegradação ambiental de poluentes e como produtor de importantes moléculas de interesse na medicina, agricultura e indústria (Araújo, 2013).

Embora alguns membros do gênero *Burkholderia* sejam patógenos ou associados com alguma doença em seus hospedeiros, a maioria das espécies associadas às plantas não é patogênica e pode apresentar uma interação neutra ou benéfica com os seus hospedeiros (Oliveira *et al.*, 2002).

Burkholderia representa um interessante grupo de bactérias que compreende mais de 30 espécies com nomenclatura validada, e podem ser encontradas em diferentes habitats, como solo, água, ou em associação com plantas, fungos, insetos e outros animais, incluindo seres humanos (Coenye & Vandamme, 2003; Salles, 2005). É o caso de *B. vietnamiensis* e *B. brasiliensis*, bactérias diazotróficas endofíticas identificadas em associação com variedades de arroz, que favorecem o crescimento vegetal por meio da fixação biológica do nitrogênio (Silva *et al.*, 2006; Sabino *et al.*, 2006). Guimarães *et al.* (2010) observaram que as plantas inoculadas com *Burkholderia* sp. apresentaram acúmulo de nitrogênio (N) em torno de 12% acima do controle sem inoculação. Em geral, espécies de *Burkholderia* são bactérias saprofíticas, mas espécies

como *B. mallei* e *B. pseudomallei* podem causar doenças em animais e humanos (Dance, 2000), assim como *B. cepacia*, que pode ser isolada de amostras clínicas, principalmente de pacientes com fibrose cística (FC), onde são considerados patógenos oportunistas (Martins, 2007).

Apenas algumas espécies são relatadas como fitopatogênicas, como *B. plantarii*, *B. gladioli* e *B. glumae* em arroz, sendo que esta última também causa apodrecimento de tubérculos de batata e foi considerada, por mais de duas décadas, a bactéria patogênica mais importante para a cultura do arroz no Japão, na Coreia e em Taiwan (Cottyn *et al.*, 1996; Maeda *et al.*, 2006; Nandakumar *et al.*, 2009). Além dessas, *B. andropogonis* está associada a mancha bacteriana em folhas de citros, milho, feijão e sorgo (Conye & Vandamme, 2003; EMBRAPA, 2008), *B. caryophylli* causa a podridão em cravo (*Dianthus caryophyllus*) e alho (*Allium sativum*), mas também em cebola (*Allium cepa*), assim como *B. gladioli* pv. *allicola* e *B. cepacia* (Palleroni & Holmes, 1981; Jacobs *et al.*, 2008).

2.2.1 *Burkholderia glumae*

A bactéria *B. glumae*, antigamente denominada como *Pseudomonas glumae* (Kurita e Tabei, 1967) Uramaki *et al.*, 1994 é Gram-negativa, apresentando células em forma de bastonetes com dimensões que variam entre 0,5-0,7 x 1,5-2,5 µm, móveis devido à presença de um a três flagelos polares. É capaz de crescer em temperaturas entre 11-40 °C, sendo o intervalo ótimo de crescimento entre 30-35 °C (Ham *et al.*, 2011), hidrolisa a arginina, cresce em 3% de NaCl e produz ácido a partir do sorbitol e inositol (Cottyn *et al.*, 1995; Schaad *et al.*, 2001), é pectolítica e capaz de induzir a reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco (Furuya *et al.*, 1997; Ham *et al.*, 2011).

Burkholderia glumae forma colônias brancas acinzentadas ou amarelas devido à produção da fitotoxina toxoflavina (Kim *et al.*, 2004; Nandakumar *et al.*, 2009), considerada um importante fator de virulência por causar a podridão das plântulas de arroz e grãos descoloridos (Liyama *et al.*, 1998; Jeong *et al.*, 2003). A presença de toxoflavina também reduz o crescimento de folhas e raízes de mudas de arroz, induz sintomas cloróticos na panícula (Liyama *et al.*, 1998) e foi identificada como a responsável por induzir murcha bacteriana em muitas culturas, tais como batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), pimenta forte (*Capsicum frutescens* L.), sésamo (*Sesamum indicum* L.) e tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (Jeong *et al.*, 2003).

2.2.2 *Burkholderia gladioli*

A bactéria *B. gladioli*, denominada como *Pseudomonas gladioli* (Yabuuchi *et al.* 1993), é Gram-negativa em forma de bastonetes, que podem ser retos ou ligeiramente curvos, não é fluorescente, acumula na célula poli- β -hidroxibutirato (PHB), é aeróbica, apresenta reação positiva para catalase e urease, sendo móvel devido à presença de flagelos que estão dispostos em tufo polares (Lucca Filho *et al.*, 2006). Apresenta reação negativa para indol, nitrato e lisina descarboxilase e, assim como a *B. glumae*, produz um pigmento amarelo difuso em meios de cultivo devido à presença da fitotoxina toxoflavina (Coenye & Vandamme, 2007; Nandakumar *et al.*, 2009).

É uma bactéria com ampla distribuição que pode infectar a panícula do arroz, causando sintomas semelhantes ao crestamento bacteriano causado pela bactéria *B. glumae* (Nandakumar *et al.*, 2009). Em relação a *B. gladioli*, são

conhecidos três patovares como bactérias fitopatogênicas: *B. gladioli* pv. *gladioli*, causadora da podridão em bulbos de flores do gênero *Iris* da família Iridaceae (Jiao *et al.*, 2003); *B. gladioli* pv. *alliicola*, agente causal da podridão em bulbos de cebola (Young *et al.*, 1978; Lucca Filho *et al.*, 2006); e *B. gladioli* pv. *agaricicola*, que promove podridão mole em cogumelos (Lincoln *et al.*, 1991) e também tem sido relatada como patógeno de vários gêneros de orquídeas, incluindo *Dendrobium*, *Oncidium* e *Miltonia* spp. (Keith *et al.*, 2005).

2.2.3 *Burkholderia plantarii*

A bactéria *B. plantarii*, identificada como *Pseudomonas plantarii* (Azegami *et al.*, 1987) Uramaki *et al.* 1994, é um patógeno do arroz, responsável por causar a morte das plântulas (Coenye & Vandamme, 2003), é Gram-negativa, apresentando células em forma de bastonetes retos que podem estar isolados, aos pares e em cadeias curtas e com dimensões que variam de 0,7-1,0 x 1,4-1,9 µm em largura e comprimento, sendo móveis devido à presença de um a três flagelos polares. Forma colônias de coloração amarela, translúcidas, brilhantes, convexas e com margens definidas (Azegami *et al.*, 1987). Esta bactéria não é fluorescente, é positiva para a reação da oxidase, catalase, liquefação da gelatina, manitol e não produz ácido a partir de maltose, lactose, trehalose e rafinose. Além disso, a bactéria não é pectolítica e não induz reação de hipersensibilidade em tabaco (Azegami *et al.*, 1987; Schaad *et al.*, 2001). É capaz de crescer em temperaturas entre 4 e 38 °C, sendo o intervalo ótimo de crescimento entre 32 e 35 °C (Schaad *et al.*, 2001).

2.3 Distribuição e danos

O crestamento bacteriano da panícula (Uematsu *et al.*, 1976) e a morte de plântulas (Azegami *et al.*, 1987) são causados por *B. glumae* e *B. plantarii*, respectivamente, e são consideradas graves doenças do cultivo de arroz e em mudas transplantadas a partir de viveiros para o campo (Maeda *et al.*, 2006). O (CBP) é uma das principais doenças desta cultura, também conhecida como podridão bacteriana da panícula do arroz ou podridão das plântulas e de grãos e com potencial de ameaçar a produção de arroz em todo o mundo (Prado, 2010; Riera-Ruiz *et al.*, 2014).

Burkholderia glumae foi registrada pela primeira vez no Japão em 1956 (Yuan, 2004). Desde então, tem sido relatada como um importante patógeno do arroz em outros países produtores na Ásia Oriental (Cottyn *et al.*, 1996; Jeong *et al.*, 2003) na América Latina e nos Estados Unidos (Zeigler & Alvarez, 1990; Nandakumar *et al.*, 2007) causando perdas superiores a 70%, quando as condições são favoráveis à doença (Ham *et al.*, 2011). Por causa da perda de rendimento elevado, o CBP é a segunda doença mais importante do arroz na Louisiana, nos EUA, após a queima das bainhas (Ham *et al.*, 2011).

No Japão, plantas de arroz infectadas com *B. gladioli* apresentaram sintomas que foram relatados como necrose ou mancha foliar clorótica (Furuya *et al.*, 1997). Os mesmos autores revelaram que *B. gladioli* foi um dos agentes causais do CBP em Louisiana nos Estados Unidos, manifestando sintomas semelhantes aos ocasionados por *B. glumae*, não sendo possível assim distinguir *B. glumae* de *B. gladioli* com base unicamente nos sintomas.

Alguns estudos ecológicos sobre *B. glumae* e *B. plantarii* foram relatados para o desenvolvimento de métodos para o controle das doenças causadas por

estas duas bactérias. No entanto, a ecologia e patogenicidade de *B. gladioli* em plantas de arroz ainda necessitam de mais estudos (Maeda *et al.*, 2006).

2.4 Sintomatologia e disseminação

B. glumae, *B. gladioli* e *B. plantarii* infectam as sementes, e suas células podem ser detectadas em várias partes, incluindo a parte basal e o interior do grão de arroz (Tsushima, 2011), podendo sobreviver no interior da semente por até três anos (Tsushima *et al.*, 1989). Além disso, as células destas bactérias presentes nas plântulas são importantes para uma infecção primária, o que, por sua vez, proporciona uma fonte de inóculo para as panículas emergentes (Tsushima *et al.*, 1996). Trabalhos indicam que *B. glumae* foi isolada de sementes de arroz assintomáticas (Zhu *et al.*, 2008; Nandakumar *et al.*, 2009), demonstrando que as sementes podem conter a bactéria sem apresentar sintomas. Além disso, a doença pode ser dissimulada pelo ácaro *Steneotarsonemus spinki smiley*, pelo vento e/ou pela irrigação (Kurita & Tabei, 1967).

Essas bactérias invadem as plântulas através dos estômatos e ferimentos, proliferando-se nos espaços intercelulares do parênquima (Azegami *et al.*, 1985; Hikichi *et al.*, 1995), e são transmitidas por sementes, flores, folhas e restos culturais, podendo viver nas raízes de arroz sem manifestar sintomas e com período crítico durante a emergência da panícula e florescimento.

Os sintomas do CBP causados por *B. glumae* incluem pequenas lesões (1-5 mm) com margens castanhas sobre as folhas e as espiguetas bem como o abortamento dos grãos de arroz antes do seu completo enchimento (Zapata & Vélez, 2011). As flores infectadas podem apresentar bases escuras de coloração cinza ou marrom, mas a ráquis da panícula permanece verde e muitas vezes

permanece ereta, devido a uma perda de peso de grãos e uma lesão linear que se estende para baixo a partir da lâmina foliar sob a forma de um colarinho. Estas e a descoloração dos grãos são as principais características dos sintomas. Contudo, se essas características não forem identificadas precocemente, fungos saprófitas podem crescer sobre os tecidos mortos e mascarar os sintomas típicos (Zapata & Vélez, 2011).

A presença de toxoflavina em plântulas de arroz infectadas com *B. glumae* (Liyama *et al.*, 1998) esta relacionada à murcha que pode ocorrer em plantas de arroz devido ao bloqueio vascular causado pela produção da toxina, impedindo a chegada de monossacarídeos e polissacarídeos essenciais para a síntese do amido e sua união com açúcares que são essenciais na formação da panícula (Ham *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2003). Os focos do CBP tendem a ocorrer em condições prolongadas de calor e umidade durante as fases de crescimento do arroz, favorecendo o desenvolvimento de epidemias graves (Cha *et al.*, 2001). Plantações de arroz com sintomas de CBP incluindo panículas eretas com grãos manchados foram relatadas na cidade de Palestina, uma das áreas de arroz mais extensas do Equador, em julho de 2013, mas os sintomas similares foram observados na região desde o início de 2012 (Riera-Ruiz *et al.*, 2014). Na Colômbia, sintomas semelhantes foram observados principalmente nos distritos de Monteria e Ambalema, quando registraram altas temperaturas (32,4 e 37,3 °C), proporcionando, assim, um ambiente favorável para o desenvolvimento da doença (Ham *et al.*, 2011).

Plantas de arroz com escurecimento da bainha e podridão de grãos foram observadas em Fukuoka, no Japão, durante o outono de 1995 e 1996, sendo que espécies de *Burkholderia* foram isoladas das bainhas e de grãos infectados.

Essas estirpes causaram sintomas de podridão das plântulas, podridão de grãos, e escurecimento da bainha em plantas de arroz, bem como em folhas de algumas *Orchidaceae* e bulbos de cebola. Com base em testes morfológicos, fisiológicos, patológicos, e moleculares, os isolados foram identificados como *B. glumae* ou *B. gladioli*. Nos testes de patogenicidade, essas bactérias infectaram as plantas de arroz após a inoculação artificial e reproduziram sintomas semelhantes aos observados após infecções naturais, confirmando, dessa forma, que o arroz é um hospedeiro de *B. gladioli* e que a podridão de grãos de arroz bacteriana é causada não só pela *B. glumae* mas também por *B. gladioli* (Ura *et al.*, 2006).

A virulência de *B. plantarii* está associada à presença da fitotoxina tropolona, uma substância solúvel em água, que é produzida por algumas espécies de *Burkholderia* e está relacionada ao nanismo que pode ocorrer em mudas de arroz infectadas e clorose que ocorre na parte basal das folhas, seguido do escurecimento e morte das plântulas.

2.5 Manejo

As medidas de controle para *B. glumae* e *B. gladioli* incluem práticas culturais, químicas e de controle biológico (Miyagawa & Takaya, 2000) e pelo uso de cultivares com resistência genética (Iwai *et al.*, 2002; Ham *et al.*, 2011). Contudo, a utilização de sementes livres de patógenos é a principal medida para reduzir a incidência das doenças (Saichuk & Landry, 2009).

Algumas estirpes de *Burkholderia* spp. podem inibir o desenvolvimento do CBP. Resultados foram observados quando uma estirpe não virulenta de *B. gladioli* impediu a ocorrência da doença quase completamente quando foram co-

inoculadas com *B. glumae* (Miyagawa & Takaya, 2000). Os mesmos autores citam que sementes de arroz pulverizadas usando uma solução mista com uma estirpe virulenta de *B. glumae* e uma estirpe avirulenta de *B. gladioli* inibiram a podridão de grãos e de mudas de arroz em experimento a campo, o que indica que o pré-tratamento de sementes com estirpes avirulentas de *Burkholderia* spp. é um método eficiente como controle biológico.

Entre as práticas culturais utilizadas para o controle destas bactérias está a remoção de plantas doentes e plantas hospedeiras, a retirada dos restos culturais antes do plantio, a fertilização adequada evitando o excesso de nitrogênio, uma vez que estimula o rápido crescimento vegetativo das plantas, favorecendo o desenvolvimento da doença (Mizukami & Wakimoto, 1969; Goto, 1992)

Alguns agroquímicos têm demonstrado capacidade de controlar de forma eficaz ou suprimir a ocorrência da podridão de mudas e da podridão da panícula causada por *Burkholderia* spp. incluindo antibióticos que contêm cobre (Katsube & Takeda, 1998; Shahjahan *et al.*, 2000a). O uso de ácido oxolínico, um bactericida sintético desenvolvido a partir de uma quinolona, têm se mostrado eficazes para o controle destas doenças em arroz, como tratamento das sementes exibindo efeito preventivo (Hikichi, 1993b).

O desenvolvimento de cultivares e linhagens resistentes por meios genéticos e biotecnológicos é uma das principais tendências no controle de doenças de plantas (Yuan, 2004), mas, até o momento, apenas algumas variedades de arroz têm demonstrado uma resistência parcial no controle do crescimento bacteriano da panícula (Shahjahan *et al.*, 2000b). Entre essas, a variedade Júpiter exibiu um nível elevado de resistência à doença em comparação com outras variedades testadas (Sha *et al.*, 2006)

Portanto, a integração de vários métodos, tais como a resistência do hospedeiro, as práticas culturais e o uso de produtos químicos controlados proporcionam uma melhor gestão destas doenças.

2.6 Métodos de detecção de *Burkholderia* spp. em sementes

Um grande grupo de microrganismos, como bactérias, vírus, nematoides e fungos, pode utilizar as sementes como meio de transporte, sendo essa a maneira mais eficiente de sobrevivência e de dispersão de patógenos a longas distâncias (Goto *et al.*, 1988; Machado, 2000). Assim, com o aumento do intercâmbio comercial de sementes de arroz entre países, tornou-se necessária a implementação de medidas fitossanitárias que permitam minimizar os riscos de entrada de pragas que ainda não são encontradas nos países importadores (Parizzi & Morandi, 2006).

Um dos pré-requisitos para o controle efetivo de qualquer praga ou doença é a capacidade de detectar e identificar rápida e corretamente seu agente causal (Schaad & Frederick, 2002). A utilização de métodos rápidos, específicos e sensíveis que possam detectar o patógeno em baixos níveis a partir do material vegetal é um passo essencial para contenção de patógenos. No entanto, ferramentas robustas de diagnose e de baixo custo não estão disponíveis para identificação de muitos fitopatógenos.

Técnicas empregadas para a detecção de *Burkholderia* spp. estão baseadas em testes biológicos (Kawaradani *et al.*, 2000), bioquímicos (Cottyn *et al.*, 1996; Yuan, 2004; Riera-Ruiz *et al.*, 2014), sorológicos por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), moleculares, utilizando a reação em cadeia da

polimerase (PCR), e o sequenciamento (Maeda *et al.*, 2006; Saylor *et al.*, 2006; Karki, 2010; Riera-Ruiz *et al.*, 2014),

No entanto, algumas técnicas, apesar da simplicidade e rapidez, como as sorológicas, podem gerar reações cruzadas com bactérias saprófitas presentes em tecidos das plantas ou no solo, o que pode levar a falso-positivos (Ozakman & Schaad, 2003).

Os métodos de detecção têm se beneficiado com o advento de tecnologias moleculares mais modernas. Essas técnicas constituem uma ferramenta que muito podem auxiliar na detecção e identificação de organismos de forma rápida e segura, possibilitando a investigação de ácidos nucleicos ou de produtos gênicos (Martin *et al.*, 2000).

Uma das principais aplicações da PCR na fitopatologia é a detecção de patógenos em sementes e outros materiais propagativos assintomáticos, tais como tubérculos e estacas, já que a baixa população de propágulos e o estado quiescente dos fitopatógenos nesse tipo de material dificulta sua detecção por métodos microbiológicos tradicionais (Schaad & Frederick, 2002).

A técnica de reação em cadeia da polimerase PCR (qualitativa ou convencional) possibilita uma amplificação seletiva e específica de sequências de ácidos nucleicos, propiciando a identificação qualitativa de bactérias fitopatogênicas. PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa ou simplesmente qPCR, foi descrita pela primeira vez em 1993, por Higuchi e seus colaboradores e tem como principal particularidade a estimativa da amplificação em tempo real (Mackay, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Esse método apresenta diversas vantagens sobre a PCR convencional. Uma delas é a ausência da eletroforese em gel de agarose para detectar o

produto da reação, uma vez que a leitura e a mensuração do acúmulo de produtos são obtidas a cada ciclo, usando um dos dois sistemas: uma molécula química intercalante de DNA de fita dupla (SYBR-Green) ou um sistema que utilize sonda de oligonucleotídeos marcada com fluoróforos nas extremidades 3' e 5' (sistema TaqMan®, sondas FRET®, Molecular Beacons® e oligonucleotídeos Scorpions®) (Schaad & Frederick, 2002).

O SYBR® Green é um fluoróforo que se liga ao DNA de dupla-fita por incorporação nos produtos de amplificação a cada ciclo de PCR, e a intensidade da emissão de fluorescência é aumentada. A mensuração da fluorescência durante a amplificação por PCR se dá em função da quantidade de produtos de amplificação presentes na mistura de reação (De Boer *et al*, 2007).

A vantagem desta molécula em relação aos outros métodos de PCR em tempo real é que nenhuma sonda adicional é requerida. Entretanto, uma análise pós-amplificação é necessária para identificar o produto de amplificação, que se dá através da análise da curva de dissociação. A análise da curva de dissociação, passo posterior à amplificação, é realizada no próprio equipamento para confirmar a amplificação específica, pela temperatura de dissociação do produto de amplificação, que produz um único pico na curva de dissociação (Schaad & Frederick, 2002).

Sistemas que utilizam oligonucleotídeos marcados com fluoróforos ou sondas também marcadas com fluoróforos nas extremidades 5' e 3' são mais específicos do que o sistema utilizando o intercalante de DNA de fita dupla, visto que estes somente hibridizam-se com regiões específicas do DNA, gerando a fluorescência apenas quando essas sondas são degradadas (Schaad & Frederick, 2002; De Boer *et al.*, 2007).

A confiabilidade dos métodos de detecção por PCR depende, em certo grau, da pureza e do número de sequências-alvo. Muitas vezes, para que haja um aumento na sensibilidade das técnicas de detecção bacteriana, um enriquecimento prévio em meio líquido ou sólido é aconselhável (Lopes, 2003). Entretanto, bactérias e o meio de cultivo onde são postas a crescer contêm muitas substâncias que podem interferir na PCR (Rogers & Burgoyne, 1997). Além disso, métodos de extração influenciam a quantificação do DNA, onde a presença de inibidores não eliminados no processo de extração afeta diretamente o desempenho e a interpretação das reações da PCR e qPCR.

Na medida em que o controle de qualidade de sementes é uma preocupação no sentido de garantir material de propagação livre de patógenos e com identidade genética comprovada, além de outros atributos, métodos de precisão ganham cada vez mais importância (Vieira, 2002). Deste modo, é possível não apenas obter resultados quanto à presença destes organismos mas também quantificar o organismo alvo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Bacteriologia Vegetal e Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Agronômica-Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, situados em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

3.1 Estirpes bacterianas

As estirpes bacterianas utilizadas estão listadas na Tabela 1. Para as bactérias quarentenárias *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) e *Burkholderia glumae* utilizou-se o DNA genômico como controle positivo, o último, obtido do Internacional Center for Tropical Agriculture (CIAT), Colômbia).

3.1.1 Manutenção das culturas bacterianas

As culturas bacterianas foram mantidas rotineiramente em meio CPG (casamino ácido, peptona, glicose e ágar) e ágar nutritivo (peptona, extrato de carne, extrato de levedura, cloreto de sódio e ágar) (Schaad *et al.*, 2001). Para a reativação de isolados preservados por liofilização, as ampolas foram desinfetadas com álcool 70%, hidratadas com 200 µL de água destilada esterilizada (ADE) e incubadas por 30 min; 10 µL da suspensão da ampola

foram diluídos em 1,5 mL de ADE. Em seguida as estirpes bacterianas foram cultivadas sob agitação (150 rpm) em caldo LB (Luria-Bertani: triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio) a 28 °C por 24-48 h. As culturas bacterianas foram mantidas em glicerol 40% em ampolas de criopreservação a -20 °C.

TABELA 1. Estirpes bacterianas utilizadas no estudo como referência em PCR e qPCR. Porto Alegre, RS, 2014.

Isolados/referência	Parte, Hospedeiro	Origem	Fonte
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> / AGR 008.1	Fruto, melancia	Brasil	Agronômica
<i>Burkholderia</i> sp./ AGR 035.1	Semente, arroz	Argentina	Agronômica
<i>B. gladioli</i> * / 3600	Semente, arroz	Colômbia	CIAT
<i>B. glumae</i> * / 3200	Semente, arroz	Colômbia	CIAT
<i>B. plantarii</i> *	-	-	-
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> / 1337	Feijão	Brasil	IBSBF
<i>Pectobacterium brasiliensis</i> / AGR 030.1	Tubérculo, batata	Brasil	UFRGS
<i>Pseudomonas</i> sp./ AGR 232	Folha, tabaco	Brasil	Agronômica
<i>P. fuscovaginae</i> / 743	Trigo	Brasil	IBSBF
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> / AGR 038.1	Folha, tomate	Brasil	Agronômica
<i>Ralstonia solanacearum</i> / AGR 031.1	Tubérculo, batata	Brasil	Agronômica
<i>Xanthomonas</i> sp./ 3021	Semente, arroz	Brasil	UFRGS
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> / AGR 026.1	Fruto, laranja	Brasil	Agronômica
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> / AGR 035.3	Folha, couve	Brasil	Agronômica
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> */ AGR 021.1	Folha, arroz	Índia	Agronômica
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> */ AGR 023.1	Folha, arroz	Índia	Agronômica

* DNA genômico

3.2 Clonagem dos fragmentos de DNA de *Burkholderia glumae*

O DNA da estirpe *Burkholderia glumae* adquirido do Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e estabelecido como controle positivo foi purificado e clonado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os produtos selecionados das ampliações por PCR a partir dos primers específicos BgF-5'-ACGTTTCAGGGATRCTGAGCAG-3' e BgR-5'-

AGTCTGTCTCGCTCTCCCGA-3' (Sayler *et al.*, 2006) foram purificados utilizando-se o kit de purificação comercial PCR *Clean-up System - Promega®* e clonado utilizando o kit pGEM®-T *Easy Vector (PROMEGA®)*, conforme instruções do fabricante. O produto de ligação entre os insertos e o vetor pGEM-T foram inseridos em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* XL-1 (Stratagene, CA, EUA) com auxílio do eletroporador MicroPulser™ (BIO RAD).

3.3 Detecção de *Burkholderia* spp. por qPCR com sonda TaqMan

3.3.1 Amostras de arroz utilizadas nos experimentos

Trezentos e quarenta e duas amostras de arroz, das safras 2011/12, 2012/13 e 2013/14 provenientes da Argentina, do Brasil, dos Estados Unidos e do Uruguai foram recebidas pelo Agrônômica-Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, situado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul (Tabela 2).

TABELA 2. Amostras de sementes de arroz nacionais e importadas. Porto Alegre, RS, 2014.

Origem	Safrá			Total
	2011/12	2012/13	2013/14	
Argentina	84	167	32	283
Brasil ¹	0	50	2	52
EUA	0	6	0	6
Uruguai	0	1	0	1
Total	84	224	34	342

¹(Camaquã, Capivari, Faxinal, Glorinha, Mostardas, Santo Antônio, São Jerônimo, São Vicente do Sul, Tapes, municípios do RS).

3.3.2 Preparo das amostras de arroz para detecção direta e por enriquecimento

As amostras foram processadas conforme protocolo proposto para Xoo e Xoc (Vera Cruz *et al.*, 2012). Cinco gramas de cada amostra de sementes foram colocadas em um tubo de 50 mL contendo 15 mL de solução salina de tampão de fosfato (PBS) (cloreto de sódio, 8 g; cloreto de potássio, 0,2 g; fosfato de sódio, 1,15 g; fosfato de potássio, 0,2 g; ázida sódica, 0,2 g; água destilada, 1000 mL; 0,01% de Tween 20% e pH 7,0) e sonicadas por 5 min. Uma alíquota de 200 µL do extrato foi transferida para um microtubo contendo 1,8 mL de caldo nutritivo (Bio-PCR), incubada por 28 ± 2 °C, durante 24 h, centrifugada por 10 min a 13.000 rpm. Logo, o pelete foi ressuspendido em tampão 100 µL de TE1X e armazenado a -20 °C até sua utilização. Em seguida, 300 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 150 mg de sulfito de sódio (Na₂SO₃) foram adicionados à amostra, que foi novamente sonicada por 5 min, filtrada, em papel filtro, para remover resíduos e o PVPP. Dois mililitros do filtrado foram colocados em um microtubo e centrifugados por 10 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pelete foi ressuspendido em tampão 200 µL de TE1X e armazenado a -20 °C até sua utilização (Vera Cruz *et al.*, 2012) (APÊNDICE 1). Dois mililitros da suspensão foram utilizados diretamente na qPCR.

3.3.3 Especificidade da sonda TaqMan

Para o teste da especificidade da sonda Burk P, o DNA das estirpes de *Xanthomonas* sp., Xoo, Xoc, *Burkholderia* sp., *B. gladioli* e *B. glumae*, bactérias estas isoladas de arroz, além do DNA das bactérias *Acidovorax avenae* subsp.

citruli, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Pseudomonas* sp., *P. fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Pectobacterium brasiliensis*, *Ralstonia solanacearum*, *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris* (Tabela 1) foram utilizadas na qPCR, usando os oligonucleotídeos iniciadores BF1 e BR1.

3.3.4 Eficência da reação

A eficiência de reação foi calculada baseando-se na inclinação da curva de calibração com a seguinte fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Diluições seriadas do DNA genômico de *B. glumae* foram realizadas partindo da concentração de 100 ng.µL⁻¹. A precisão dos dados da qPCR foi avaliada a partir do desvio padrão entre as três replicatas.

3.3.5 qPCR com sonda TaqMan para detecção de *Burkholderia* spp. em sementes de arroz

As 342 amostras de sementes de arroz das safras 2011/12, 2012/13 e 2013/14, provenientes da Argentina, do Brasil, dos EUA e do Uruguai (Tabela 2), foram testadas para a presença de *Burkholderia* spp. Para este estudo, as amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.3.2.

Para a detecção de bactérias do gênero *Burkholderia*, foi utilizada a qPCR pelo método de quantificação absoluta com a sonda de hidrólise Burk P. A análise por qPCR foi realizada a partir de curvas de calibração para a espécie bacteriana, relacionando o valor do C_T com as concentrações dos padrões. Os dados de qPCR foram analisados pelo software do aparelho Rotor Gene Q 2 Plex (QIAGEN).

O volume final de 20 μL , sendo 10 μL de 2 x Rotor-Gene Probe PCR Master Mix (Invitrogen), 0,4 μL de cada oligonucleotídeo iniciador específico para a região 16S-23S, BF1 (5'GAGGAAAGTCCGGACTCC 3') e BR1 (5'-TCTTACCGCACCGTTTCA-3') (0,5 μM), 0,8 μL de sonda Burk P (5' FAM-ACACGCGGAACAGGGCAA-BHQ1-3') (0,2 μl), 0,1 μL (5% de Dimetilsulfóxido-DMSO) e 2 μL de DNA genômico (100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) e água Milli-Q esterilizada.

As reações foram submetidas às seguintes condições: 95 °C por 10 min; a 50 ciclos cada um a 95 °C por 10 s; 60 °C por 30 s; e um passo final de resfriamento de 40 °C por 10 s, seguindo as condições propostas por Minogue *et al.* (2013).

3.3.6 Avaliação do método de obtenção de células ou DNA bacteriano usando qPCR para detecção de *Burkholderia* spp. em sementes de arroz inoculadas

3.3.6.1 Inoculação das sementes

Primeiramente, as sementes foram imersas em etanol 70%, 1 g de sementes para 5 mL de álcool, com agitação por 4 h em temperatura ambiente (± 25 °C). Em seguida as sementes foram lavadas quatro vezes com água destilada esterilizada, usando a mesma proporção (1 g: 5 mL). As sementes foram secas em fluxo laminar por 6 h. Para verificar a eficiência da desinfestação das sementes, 15 mL de PBS foram adicionados a 5 g de sementes, que foram agitadas por 5 min e, então, 1 mL da suspensão foi transferida para placas de petri com meio de cultivo B de King-MKB (peptona,

20,0 g; potássio fosfato dibásico, 1,5 g; sulfato de magnésio, 1,5 g; glicerina, 15 mL; ágar, 20,0 g; e água para completar 1000 mL).

A concentração de células bacterianas de Burk-AGR 035.1 foi ajustada por Escala Nefelométrica de Mc Farland, correspondendo a uma concentração ($\sim 10^8$ UFC.mL⁻¹) para a realização de diluições seriadas que foram plaqueadas para quantificação do número de células bacterianas. As sementes previamente desinfestadas foram imersas na suspensão bacteriana por 2 h \pm 25 °C sob agitação (150 rpm). Subsequentemente, foram levadas para geladeira a 4 °C durante a noite (Vera Cruz *et al.*, 2012). As sementes foram secas em fluxo laminar por 6 h e, em seguida, estocadas a 4 °C até a sua utilização (Vera Cruz *et al.*, 2012) para testes com os métodos de extração por lavagem e maceração, direta e de enriquecimento.

3.3.6.2 Método de extração por lavagem

Cinco gramas de sementes inoculadas foram colocados em 15 mL de solução salina de fosfato (PBS), com uma gota de Tween 20[®], e agitados por 90 min a 200 rpm. A partir do extrato das sementes inoculadas, 1 mL foi adicionado em 9 mL de PBS para diluições seriadas até 10^{-8} . Dez μ L de cada diluição foram transferidos para placas contendo meio de cultivo B de King-MKB e incubados por 28 \pm 2 °C, durante 48 h, para contagem das células bacterianas, e as triplicatas de cada diluição do extrato da lavagem das sementes foram utilizadas diretamente na qPCR com a sonda Burk P, seguindo as condições descritas anteriormente no item 3.3.5.

3.3.6.3 Método de extração por maceração

Cinco gramas de sementes mais 15 mL de PBS, com uma gota de Tween 20®, foram macerados em liquidificador por aproximadamente 20 s e agitados por 30 min a 200 rpm. A partir do extrato das sementes trituradas, 1 mL foi adicionado em 9 mL de PBS para diluições seriadas até 10⁻⁸. Dez µL de cada diluição foram transferidos para placas contendo meio de cultura B de King-MKB e incubados conforme descrito anteriormente no item 3.3.6.2, as triplicatas de cada diluição do extrato das sementes maceradas foram utilizadas diretamente na qPCR com a sonda Burk P, seguindo as condições descritas anteriormente no item 3.3.5.

3.3.6.4 Método de extração direta e enriquecimento (Bio-PCR)

Para o método de extração direta e enriquecimento, as sementes inoculadas foram processadas conforme descrito no item 3.3.2. Diluições seriadas até 10⁻⁸ foram realizadas a partir do DNA extraído pelo método direto e enriquecido, e triplicatas de cada diluição foram utilizadas diretamente na qPCR com a sonda Burk P, seguindo as condições descritas anteriormente no item 3.3.5.

3.4 Detecção de *Burkholderia glumae* por qPCR com SYBR® Green

3.4.1 Amostras de DNA

Alíquotas do DNA extraído das 342 amostras de arroz (Tabela 2), conforme item 3.3.1, foram utilizadas na qPCR por SYBR® Green.

3.4.2 Especificidade dos oligonucleotídeos BgF e BgR

Para o teste da especificidade dos oligonucleotídeos BgF e BgR, o DNA das estirpes de *Xanthomonas* sp., *Xoo*, *Xoc*, *Burkholderia* sp., *B. gladioli* e *B. glumae*, bactérias estas isoladas de arroz, além de *Acidovorax avenae* subsp. *citruli*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Pseudomonas* sp., *P. fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Pectobacterium brasiliensis*, *Ralstonia solanacearum*, *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris* (Tabela 1) foram utilizados na qPCR, usando SYBR[®] Green.

3.4.3 Limite de detecção

Os níveis de sensibilidade da técnica foram calculados a partir de diluições seriadas do DNA genômico da estirpe BK 3200 (CIAT) de *B. glumae*, de 100 a 0,00001 ng. Os resultados foram avaliados a partir das curvas de dissociação, estabelecendo a linha limiar (*threshold line*) em função da fluorescência emitida pela curva de dissociação. A precisão dos dados de qPCR da curva-padrão foi avaliada a partir do desvio padrão entre as três replicatas.

3.4.4 qPCR com SYBR[®] Green para detecção de *Burkholderia glumae*

A reação foi conduzida em termociclador Rotor Gene Q 2 Plex (QIAGEN) com um volume final de 25 µl, com 12,5 µl 2x SYBR Green PCR (Master Mix Qiagen, Valencia, CA), 0,5 µl dos oligonucleotídeos iniciadores BgF/BgR (Sayler *et al.*, 2006) e 1µL (100 ng.µL⁻¹) do DNA-molde adicionado à mistura, nas seguintes condições: 95 °C por 15 min; 40 ciclos cada

desnaturação de 95 °C durante 15 s; 60 °C de anelamento durante 30 s; extensão a 72 °C durante 15 s; 95 °C durante 1 min e 55 °C durante 30 s. A análise da curva de dissociação, passo posterior à amplificação, foi realizada no próprio equipamento onde foi estabelecendo a linha limiar (*threshold line*) em função da fluorescência emitida, pelos controles positivo e negativo, sendo observada a curva de dissociação do controle positivo com aproximadamente 85,5 °C do produto de amplificação, que produziu um único pico na curva de dissociação (Schaad & Frederick, 2002). As amostras que apresentarem uma temperatura de dissociação igual ao do controle positivo $\pm 0,3$ °C foram consideradas positivas.

3.4.5 Purificação dos produtos de amplificação para sequenciamento

Os produtos da qPCR foram purificados em coluna GenElute clean_UP (SIGMA), seguindo as recomendações do fabricante. O volume total foi aplicado no interior da coluna, acrescido de 5 volumes de PBS. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 60 s. A solução aquosa foi descartada do tubo coletor no qual a coluna é fixada. A coluna foi, então, deslocada para remoção do volume a ser descartado e recolocada no tubo coletor, onde foram adicionados 0,50 mL de tampão *PE* e centrifugada (13.000 rpm, 60 s). O sobrenadante foi descartado e a coluna reinserida no mesmo tubo e centrifugada (14.000 rpm, 60 s). Posteriormente, a coluna foi transferida para um tubo de 2 mL novo, acrescida de 50 μ L do tampão *EB* (10mM Tris-Cl, pH 8,5), incubada durante 1 min a temperatura ambiente e centrifugada (13.000

rpm, 60 s). A coluna foi, então, descartada. A concentração de DNA purificado foi quantificada em Nanodrop 2000 (Uniscience).

3.4.6 Sequenciamento e análise dos produtos amplificados

Os fragmentos de DNA gerados pela amplificação das amostras positivas para *B. glumae*, com os primers BgF e BgR, após a purificação, foram enviados para sequenciamento na empresa Genewiz, Inc. (NJ, EUA).

A reação para sequenciamento foi realizada em um volume final de 10 µL, utilizando 40 ng de DNA molde e 5 pmol dos oligonucleotídeos iniciadores BgF e BgR. Os eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento foram analisados através do programa Genewiz, Inc. (NJ, EUA) comparando as sequências obtidas no sequenciamento com as depositadas nas bases de dados do GenBank através da plataforma BLASTn.

3.5 Detecção de *Burkholderia glumae*, *B. gladioli* e *B. plantarii* por PCR multiplex

3.5.1 Amostra de DNA

O DNA extraído de 110 amostras de sementes de arroz, conforme citado no item 3.3.2, foi submetido à PCR multiplex com oligonucleotídeos para detecção de *B. glumae*, *B. gladioli* e *B. plantarii* (Tabela 3). A PCR multiplex foi conduzida com os oligonucleotídeos combinados do *gyr B* conforme descrito (Maeda *et al.*, 2006).

O volume final da reação foi de 40 µL, sendo 0,8 µL de dNTPs a 10 µM; 4,0 µl de tampão 10 X (20 mM Tris-Cl pH 8,4; 50 mM KCl sem MgCl₂); 1,6 µl

de MgCl₂ (25 mM); 0,5 U de Taq polimerase; 0,80 µL de cada oligonucleotídeo (25 mM) e 2 µL de DNA genômico como controles positivos (100 ng.µL⁻¹) e água Milli-Q como controle negativo. A PCR multiplex foi realizada em termociclador MyCycler (BIO-RAD) nas condições: uma desnaturação inicial de 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 63 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, e uma extensão final a 72 °C por 10 min. Alíquotas de 5 µL do produto da amplificação foram analisadas em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) e coradas com *Blue Green Loading Dye I* (LCG-Biotecnologia). Após a eletroforese, os produtos de amplificação no gel foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados (Maeda *et al.*, 2006).

TABELA 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR multiplex para *Burkholderia* sp. (Maeda *et al.*, 2006). Porto Alegre, RS, 2014.

	Direto (5' a 3')	Reverso (5' a 3')	Produto (pb)
<i>gyrB- B. glumae</i>	GAAGTGTCGCCGATGGAG	CCTTCACCGACAGCACGCAT	529
<i>gyrB- B. gladioli</i>	CTGCGCCTGGTGGTGAAG	CCGTCCCGCTGCGGAATA	479
<i>gyrB- B. plantarii</i>	TCGAGCTGGCTGCGCCTC	GTCGTGCCCCGAGGTCTCG	597

3.6 Caracterização de isolados bacterianos obtidos de sementes de arroz positivos na qPCR para *Burkholderia* spp.

3.6.1 Isolados bacterianos das amostras positivas na qPCR

Inicialmente 5 g de cada uma das 27 amostras de sementes de arroz positivas na qPCR para *Burkholderia* foram adicionados a 15 mL de PBS e uma gota de Tween 20® e sonicadas durante 5 min. Alíquotas de 0,2 µL foram adicionadas a 1,8 de caldo nutritivo e incubadas por 24 h; 10 µL de cada diluição seriada (10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵) foram transferidos para placas com meio

MKB (Vera Cruz *et al.*, 2012). Simultaneamente, 50 g daquelas amostras foram transferidos para erlenmeyer (250 mL) mais 100 mL PBS. Após a adição de uma gota de Tween 20®, foram incubados por 90 min a temperatura ambiente em agitador (200 rpm); 10 µL de cada diluição seriadas (10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) foram transferidas para placas contendo meio de cultivo B de King-MKB (Sakthivel *et al.*, 2001).

A suspensão bacteriana foi espalhada usando alça de Drigalski e as placas foram incubadas à 28 ± 2 °C por 48 h. Colônias suspeitas foram marcadas na placa e, com uma alça esterilizada, uma delas, distinta foi selecionada, repicada e submetida a testes moleculares, bioquímicos e biológicos.

TABELA 4. Amostras de sementes de arroz positivas na qPCR com sonda de hidrólise TaqMan para *Burkholderia* spp. Porto Alegre, RS, 2014.

Amostras	Safra	Origem
BK 238, Bk7312, Bk8600, Bk8716, Bk9312, Bk9313, Bk9314, Bk9432, Bk9489, Bk9490, Bk9493, Bk9494, Bk9496, Bk10320, Bk10813, Bk10817 e Bk10947	2012/13	Argentina
Bk 10019	2013/14	Argentina
Bk07, Bk09, Bk14, Bk26, Bk30, Bk32 e Bk35	2012/13	Brasil
Bk1592 e Bk1595	2011/12	EUA

3.6.2. Morfologia, fisiologia e metabolismo

O DNA e células bacterianas de colônias amarelas ou brancas acinzentadas crescidas em meio de cultivo B de King-MKB, Gram negativos, obtidos das 27 amostras de sementes de arroz oriundas do Brasil, Argentina e Estados Unidos (Tabela 4) foi extraído pelo método de fervura (Sepp *et al.*,

1994) e submetido a ampliações por qPCR com a sonda de hidrólise Burk P, para confirmação do gênero *Burkholderia*, conforme citado anteriormente (3.3.5).

3.6.3 Reação de hipersensibilidade

Suspensões de células ($\sim 10^8$ UFC.mL⁻¹) de isolados bacterianos de *Burkholderia* sp. foram infiltradas na região abaxial das folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). O controle negativo foi água destilada. O resultado foi verificado após 24 h (Romeiro, 1995).

3.6.4 Perfil de utilização dos sistemas GN2 e GEN III

Microplacas GN2 e GEN III (Biolog Inc., CA, USA) foram inoculadas com sete isolados bacterianos, que primeiramente foram cultivados em meio BUGM (Bacterial Universal Growth Medium) e incubados por 24 h a 28 °C. Após, colônias bacterianas foram colhidas com auxílio de um cotonete esterilizado e suspensas em solução salina e ajustadas ao padrão de turbidez dos sistemas (Biolog Inc., CA, USA). Alíquotas de 150 µL das suspensões de células bacterianas foram dispostas em cada poço das microplacas. A visualização da mudança da troca de cor, de transparente para roxa, foi feita após 24 h a 28 °C. O perfil metabólico de cada isolado foi inserido na base de dados do Sistema Biolog e também comparado a fontes utilizadas por estirpes de *Burkholderia* (Yuan, 2004).

3.6.5 Virulência

Retângulos (2 x 3 cm) de escamas internas de bulbos de cebola foram destacados e inoculados ($\sim 10^8$ UFC.mL⁻¹) de cada um dos 17 isolados de

Burkholderia sp. pelo depósito de 5 µL da suspensão. A presença de maceração do tecido foi registrada após a incubação por 48 h a 30 °C (Karki, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem

Os produtos da qPCR usando o sistema SYBR[®] Green e os oligonucleotídeos BgF/BgR foram purificados e clonados. Assim, a fidelidade da cópia foi verificada pela comparação entre os padrões de banda de fragmentos clonados e os purificados (Figura 1). Os produtos da amplificação foram específicos para *B. glumae*, resultados que corroboram com os obtidos por Saylor *et al.* (2006), que também obtiveram 282 bp detectados em gel de agarose por eletroforese. Os clones mostraram-se eficientes quando aplicados como molde de DNA em PCR, produzindo fragmentos de peso molecular semelhante aos fragmentos de DNA genômico. Sendo *B. glumae* uma praga quarentenária, os clones da amplificação foram utilizados como controle positivo para as reações dos testes por PCR realizados pelo Agronômica-Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria, para análise da ocorrência da bactéria em lotes de sementes de arroz.

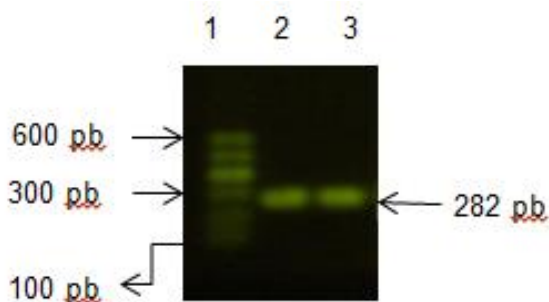


FIGURA 1. Análise eletroforética em gel de agarose (1%) dos produtos da PCR obtidos com oligonucleotídeos específicos para *Burkholderia glumae* 1-Marcador 100 Kb DNA (Qiagen), 2- *B. glumae* purificada, 3- *B. glumae* clonada (Bk 3200)

4.2 Eficiência da reação

Na análise da qPCR, observou-se que a eficiência de amplificação da reação utilizando a sonda Burk P, obtida a partir da curva de calibração com os padrões de DNA, foi de 99% e com valor da pendente de -3,33 (Figura 2), o que indica que a cada ciclo o produto de amplificação vem sendo duplicado. Estes valores encontram-se dentro do intervalo aceitável de -3,1 a -3,6, com eficiência de 90-110%, que é considerado um limite tolerável para a eficiência de amplificação de oligonucleotídeos iniciadores (Raymaekers *et al.*, 2009).

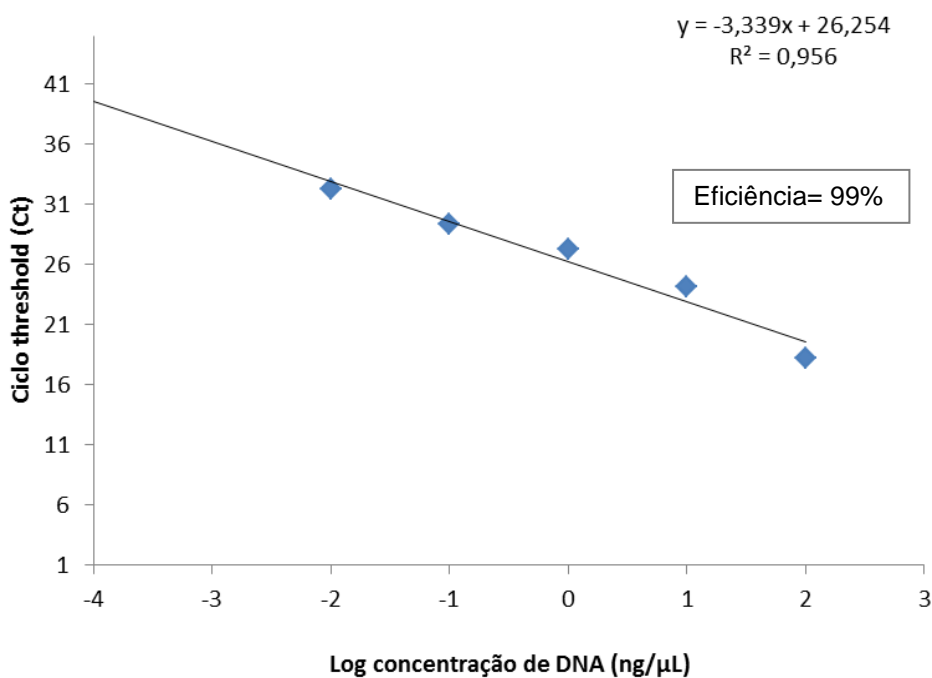


FIGURA 2. Curva de calibração da concentração de DNA ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) de *Burkholderia* sp. em relação ao ciclo threshold (Ct). Porto Alegre, RS, 2014.

O coeficiente de correlação (r^2) da curva-padrão foi de 0,95, indicando relação linear entre o valor de C_T e a quantidade de DNA dos padrões que variaram de 100 a $0,01 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (Tabela 5). O coeficiente de correlação $r^2 > 0,95$ indica o nível de confiabilidade para a correlação dos valores de C_T e da concentração de DNA (Applied Biosystems, 2008).

TABELA 5. Quantidade de DNA dos padrões de *Burkholderia* sp. empregados na curva de calibração e número o de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2014.

Concentração de DNA ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	C_T médio	C_T Desvio padrão
100	18,17	0,18
10	24,18	0,13
1	27,29	0,18
0,1	29,35	0,12
0,01	32,28	0,28

4.3 Especificidade da sonda TaqMan

Para a especificidade dos oligonucleotídeos BF1/BR1 e da sonda Burk P para *Burkholderia* spp. foi verificada somente a amplificação das estirpes de *Burkholderia* sp., *B. gladioli* e *B. glumae* a partir do DNA utilizado na reação, quando foi testada com não alvos associados a sementes de arroz como: *Xanthomonas* sp., Xoo, Xoc, e verificou-se que não houve a amplificação. Além desses, foram utilizados os não alvos *Acidovorax avenae* subsp. *citruli*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Pseudomonas* sp., *P. fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Pectobacterium brasiliensis*, *Ralstonia solanacearum*, *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris*, utilizados rotineiramente nas reações do laboratório como controles positivos, e que também não amplificaram para a sonda Burk P testada.

4.4 Detecção de *Burkholderia* spp. por qPCR usando o sistema TaqMan

Não foi possível detectar a presença de *Burkholderia* sp. nas 342 amostras de sementes arroz nacionais e importadas testadas pelo método de extração direta, utilizando o PVPP para melhorar a pureza do DNA a partir da remoção de contaminantes, tais como os compostos polifenólicos e polissacarídeos, durante o processo de extração. Todavia, este reagente também está associado à diminuição da quantidade do DNA na extração conforme (Braid *et al.*, 2003). Direito *et al.* (2001) observaram que na técnica de Selbach (SEL), ao adicionar o PVPP 4% em PBS obtiveram um produto mais puro, notadamente, porque o reagente se liga às moléculas de ácidos húmicos. Entretanto, a utilização do PVPP colaborou também para diminuir o

rendimento da extração, como foi também observado por Zhou *et al.* (1996). Assim, os autores concluíram que o PVPP, pode causar redução de DNA, por também se ligar às suas moléculas, o que pode ter contribuído para a não detecção de *Burkholderia* sp. nas amostras de arroz no método de extração direta.

Para o método de enriquecimento, essa inibição pode ser superada e a sensibilidade aumentada pelo cultivo da bactéria em meio de cultura antes da PCR, conforme dados de Deuner *et al.* (2012). Entre as formas de extração de DNA das sementes direta e por enriquecimento (Bio-PCR) para a detecção de *Burkholderia* spp., verificou-se que o DNA obtido por meio da Bio-PCR foi o método mais eficaz quando comparado com o método de extração direta. A Bio-PCR é uma técnica eficaz na detecção de *Burkholderia* spp. em análises de rotina de sementes de arroz. Esse fato é confirmado por Kim *et al.* (2012), cujo estudo pôde detectar pela Bio-PCR, a bactéria *B. glumae* naturalmente associadas a lotes de sementes de arroz contaminadas.

Neste estudo, a presença de *Burkholderia* spp. foi detectada em 27 do total de 342 amostras de sementes de arroz analisadas, através de qPCR com sonda para o gênero (Minogue *et al.*, 2013), aliado ao método enriquecimento (Bio-PCR) proposto por Vera Cruz *et al.* (2012). Entre as 52 amostras nacionais, sete delas (uma de cada um dos seguintes municípios: Dona Francisca, Glorinha, Itaquí, Mostardas, Pelotas, Santa Vitória do Palmar e São Borja) foram positivas para *Burkholderia* sp. Entre as 290 amostras de sementes importadas, 20 foram positivas para gênero, duas oriundas dos EUA e 18 da Argentina (Figura 3).

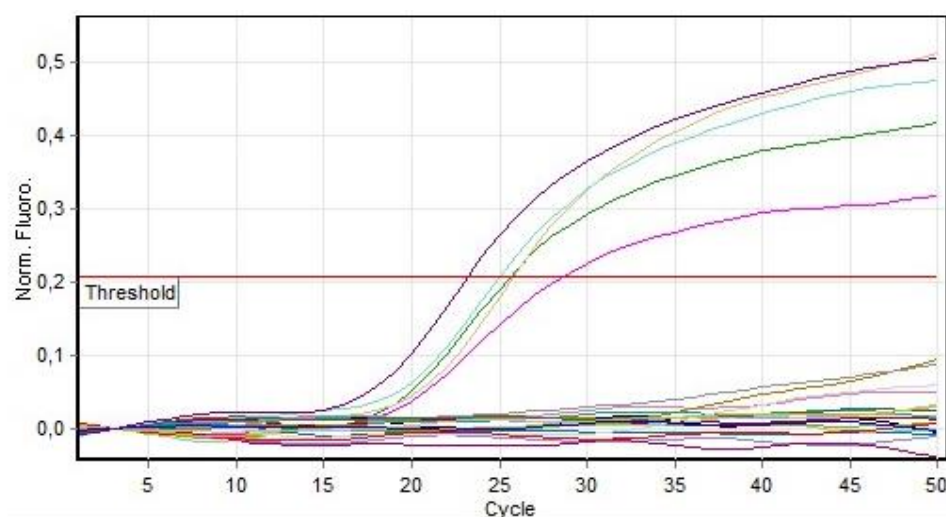


FIGURA 3. Detecção de *Burkholderia* spp. por Bio-PCR em amostras de arroz através de qPCR com os oligonucleotídeos iniciadores BF1/BR1 e sonda de hidrólise Burk P, específica para o gênero. Porto Alegre, RS, 2014.

Isso justifica a importância de detecção das espécies de *Burkholderia* associadas ao arroz. Diversas espécies do gênero *Burkholderia* podem estar associadas ao arroz em diferentes países, uma vez que há uma ampla distribuição, com interações fitopatogênicas ou não. As espécies consideradas fitopatogênicas, como *B. gladioli*, *B. plantarii* e *B. glumae* causam problemas em arroz e dessas, a *B. glumae* é o principal agente causal da podridão bacteriana da panícula (Shajahan *et al.*, 2000), causando grandes prejuízos à cultura em importantes áreas produtoras de arroz, como no Japão (Goto & Ohata, 1956), na Colômbia (Zeigler & Alvarez, 1989), nos Estados Unidos (Nandakumar *et al.*, 2009), na Venezuela (González *et al.*, 2011) e no Equador. Neste último, o primeiro caso foi registrado recentemente (Riera-Ruiz *et al.*, 2014).

4.5 Avaliação dos métodos de extração de DNA na detecção de *Burkholderia* spp. por qPCR usando o sistema TaqMan em sementes de arroz inoculadas

Para as amostras de sementes inoculadas artificialmente e submetidas a diferentes métodos de extração, verificou-se que, independente do método, foram obtidas as concentrações de 2,6, 3,3 e 3,6 x 10² UFC.mL⁻¹, respectivamente, quando comparadas com o controle, com diluição diretamente da semente 2,3 x 10² UFC.mL⁻¹ de *Burkholderia* spp.

Este valor foi bem inferior ao encontrado por Zhao *et al.* (2007), que, com uma sonda de hidrólise para detecção de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), usando a suspensão direta de sementes, encontraram um limite de detecção de 1,9 x 10⁷ UFC.mL⁻¹. No entanto, Souza Júnior (2014), testando o método de extração direta das sementes de arroz, com a sonda XRS, obteve uma sensibilidade de 4 X 10² UFC.mL⁻¹ de Xoo, corroborando com os resultados obtidos neste estudo. Isso mostra que o método de qPCR aliado ao método de processamento das amostras de sementes proposto por Vera Cruz *et al.* (2012) foi eficiente na detecção de *Burkholderia* spp. em sementes de arroz, podendo ser recomendado para as análises de rotina de laboratórios de diagnóstico fitossanitário.

As amostras foram submetidas a reação de qPCR em diluições seriadas de até 10⁻⁸, e os resultados demonstram robustez dos métodos de extração utilizados neste estudo. Para os métodos de extração de lavagem, macerado, direto (PVPP) e enriquecido foi possível obter um limite de detecção de até 10⁻⁷ UFC.mL⁻¹ de *Burkholderia* spp. (Tabela 6), apresentando C_{Ts} de 39,28; 38,93; 41,89 e 37,33, respectivamente. O método da extração direta, apesar de ser

rápido, uma vez que não se faz necessárias as etapas de isolamento e de enriquecimento (Bio-PCR), apresentou um C_T de 41,89, o que pode indicar um menor número de células bacterianas. Isso demonstra a necessidade de amostras com maior número de células bacterianas para este método, conforme dados evidenciados anteriormente no item 4.4.

Em se tratando dos métodos de lavagem e de macerado, estes consumiram mais tempo e etapas quando comparados ao enriquecimento e à extração direta.

TABELA 6. Detecção de *Burkholderia* sp. por quatro métodos de extração da bactéria ou DNA em sementes de arroz inoculadas. Porto Alegre, RS, 2014.

Método	Diluição				Controle
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
Lavagem	+++*	+++	+++	---	---
Maceração	+++	+++	+++	---	---
Direto	+++	+++	+-	---	---
Enriquecimento	+++	+++	+++	---	---

* Média dos positivos de três repetições.

A partir dessas constatações, vem-se buscando cada vez mais o desenvolvimento de técnicas que sejam alternativas, onde se tenha rapidez na obtenção dos resultados em análises de rotina.

Métodos de purificação, tais como enriquecimento (Bio-PCR), têm sido amplamente utilizados para purificar as células bacterianas antes da PCR (Schaad *et al.*, 1995; Elphinstone, 1996). Outros trabalhos também mostraram que a detecção pelo método de enriquecimento (BIO-PCR) tem aumentado a sensibilidade obtida pelos métodos convencionais de extração do DNA (Orlandi & Lampel, 2000). O método de enriquecimento, além de ser rápido e eficiente, quando comparado com isolamento, favoreceu o

monitoramento de *Burkholderia* sp. nas sementes de lotes comerciais, uma vez que ele elimina a etapa de isolamento e pode ser usado diretamente na qPCR com sonda TaqMan, com SYBR® Green e PCR multiplex.

4.6 qPCR com SYBR® Green para *Burkholderia glumae*

4.6.1 Limite de detecção

No teste de detecção de *B. glumae* em sementes de arroz, foram realizados testes para avaliar a especificidade e a sensibilidade da qPCR com SYBR Green. Na avaliação, a especificidade dos primers BgF/BgR para *B. glumae* foi confirmada, visto que não foi verificada a amplificação das outras estirpes testadas a partir do DNA genômico de *Xanthomonas* sp, Xoo, Xoc, *Burkholderia* sp., *B. gladioli* isoladas de sementes de arroz, além de *Acidovorax avenae* subsp. *citruli*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Pseudomonas* sp., *P. fuscovaginae*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Pectobacterium brasiliensis*, *Ralstonia solanacearum*, *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris*.

Já no estudo de sensibilidade, para avaliar o limite de detecção de *B. glumae* por qPCR, nas sete diluições testadas, a quantidade de DNA presente nos padrões corresponde ao número de células bacterianas, baseado no tamanho do genoma de *B. glumae*. Obteve-se o limite de detecção de *B. glumae* de 10 ng/μL de DNA, correspondendo a 18,76 células/μL, em um Ct médio de 37,58. Abaixo desse limite não foi observada amplificação (Tabela 7).

TABELA 7. Quantidade de DNA dos padrões de *Burkholderia glumae* empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2014.

Concentração de DNA (ng.µL ⁻¹)	C _T médio	C _T Desvio padrão	Número de células
100	16,39	0,08	18761726,08
10	18,96	0,16	1876172,60
1	23,78	0,15	187617,26
0,1	27,88	0,26	18761,73
0,01	30,23	0,27	1876,17
0,001	33,89	0,25	187,62
0,0001	37,58	0,30	18,76

Na análise da qPCR, observou-se a eficiência de amplificação da reação com os primers BgF e BgR, obtida a partir da curva com os padrões de DNA de 91% e com valor da pendente de -3,56 (Figura 4), o que indica que a cada ciclo o produto de amplificação vem sendo duplicado. Esses valores encontram-se dentro do intervalo aceitável de -3,1 a -3,6, com eficiência de 90-110%, que é considerado um limite tolerável para a eficiência de amplificação de oligonucleotídeos iniciadores (Raymaekers *et al.*, 2009).

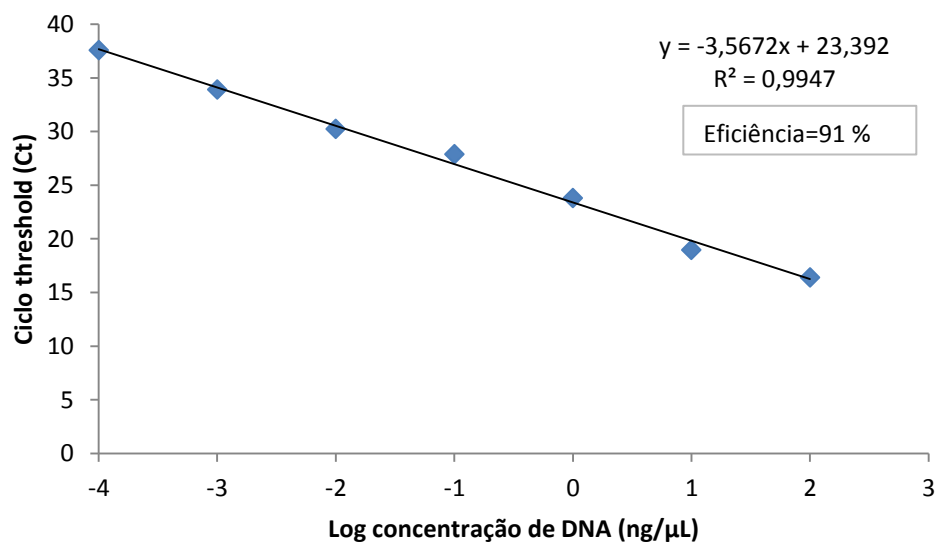


FIGURA 4. Curva de calibração da concentração de DNA (ng.µL⁻¹) de *Burkholderia glumae* em relação ao ciclo threshold (CT). Porto Alegre, RS, 2014.

A eficiência calculada pelo método da curva-padrão assume que eficiências de amplificação entre os padrões de quantificação e amostras desconhecidas testadas sejam as mesmas, ou seja, os oligonucleotídeos iniciadores amplificam o fragmento esperado de DNA com a mesma eficiência para as diluições de DNA conhecidas e amostras com concentrações variáveis. Essa eficiência de amplificação mostra o quão sensível serão os oligonucleotídeos iniciadores para detectar a sequência-alvo na PCR (Applied Biosystems, 2008).

O coeficiente de correlação (r^2) da curva-padrão foi de 0,99, indicando relação linear entre o valor de C_T e a quantidade de DNA dos padrões que variaram de 100 a 0,0001 ng. μ L⁻¹. O coeficiente de correlação $r^2 > 0,99$ indica o nível de confiabilidade para a correlação dos valores de C_T e da concentração de DNA (Applied Biosystems, 2008).

4.6.2 Detecção de *Burkholderia glumae* por qPCR com SYBR® Green

O método de extração direta de DNA a partir de sementes de arroz utilizando o PVPP evita a oxidação por compostos fenólicos, removendo contaminantes como polissacarídeos da extração e melhorando a qualidade do DNA (Silva, 2010). Todavia, está associado à redução do rendimento da concentração final de DNA extraído (Robe *et al.*, 2003). Isso foi observado neste estudo e pode ter colaborado para a não detecção de *B. glumae*, já que 342 amostras de arroz nacionais e importadas avaliadas não foi possível detectar a presença da bactéria. A detecção de patógenos em sementes pode ser extremamente difícil quando a população é baixa. Portanto, técnicas

sensíveis, capazes de detectar a pequena população do patógeno são necessárias (Schaad & Frederick, 2002).

A técnica de enriquecimento (Bio-PCR) permitiu a detecção de *B. glumae* em nove do total de 342 amostras de sementes de arroz analisadas, mostrando-se eficiente na detecção desta espécie. Entre as 52 amostras nacionais, sete oriundas dos municípios Dona Francisca, Glorinha, Itaquí, Mostardas, Pelotas, Santa Vitória do Palmar e São Borja apresentaram curva de amplificação para a espécie *B. glumae*. Entre as 290 amostras importadas, duas oriundas dos EUA foram positivas para a espécie.

As nove amostras consideradas positivas apresentaram uma temperatura de *melting* igual ao do controle positivo de $85,5 \pm 0,3$ °C, e o levantamento realizado neste trabalho indicou a presença de *Burkholderia glumae*, demonstrando que a bactéria está presente nas amostras analisadas (Figura 5).

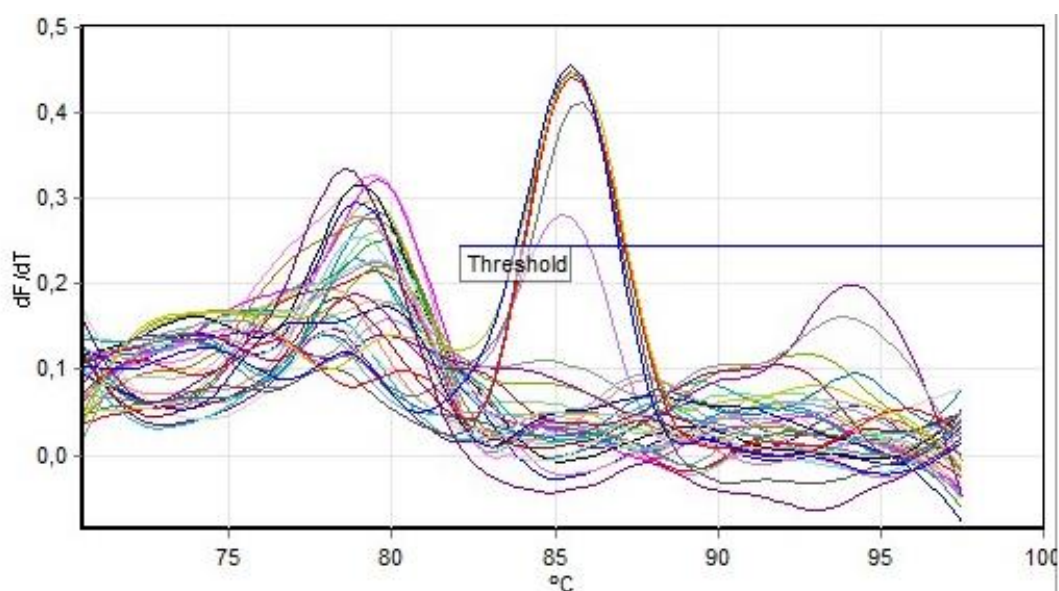


FIGURA 5. Detecção de *Burkholderia glumae* através de qPCR com os oligos BgF/BgR usando DNA total das amostras de sementes de arroz e DNA molde de *B. glumae* como controle da reação. Porto Alegre, RS, 2014.

Relatos na literatura (Schaad *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2013) afirmam que a técnica de Bio-PCR possui muitas vantagens comparada aos métodos convencionais para PCR, principalmente para a detecção de patógenos em sementes em análises de rotina, o que se comprova neste estudo. Entre as vantagens, pode-se destacar a simplicidade da técnica, o aumento da sensibilidade e a detecção somente de células vivas. Dessa forma, por meio da Bio-PCR, minimiza-se a possibilidade de falso-positivos resultantes da presença de células mortas associadas às sementes e de falso-negativos, devido à eliminação de inibidores da PCR presentes em extratos de sementes e à multiplicação do patógeno, aumentando a sensibilidade de detecção (Schaad *et al.*, 1999). Portanto, as técnicas moleculares surgem como ferramentas importantes para detecção da bactéria *B. glumae*, com a disponibilidade de oligonucleotídeos específicos que detectam de forma eficiente o patógeno alvo. A Bio-PCR, aliada a qPCR com SYBR® Green, possibilitou a detecção de *B. glumae* nas amostras de arroz analisadas, uma vez que aumentou a sensibilidade de detecção.

4.6.3 Sequenciamento

O alinhamento da sequência de parte do gene da região 16S-23S rDNA ITS dos isolados nas amostras nacionais Bk07, Bk09, Bk14, Bk26, Bk30, Bk32, Bk35 e importadas dos EUA Bk1592 e Bk1595 com a estirpe de *Bulkholderia glumae* BGR 1 (GenBank acesso CP001504.2) indicou 99 e 100% de homologia, conforme as Figuras 6 e 7, respectivamente, demonstrando que este gene é de uma região bem conservada, mesmo com amostras de outras regiões. No entanto, no alinhamento das sequências para as amostras com

99% de homologia com as outras estirpes de *B. glumae* do Genbank, observou-se uma mutação na posição 156 (Figura 6).

Sendo assim, foi confirmado com o sequenciamento os resultados obtidos na qPCR com SYBR[®] Green usando os oligonucleotídeos BgF e BgR referentes à presença de *B. glumae* nas amostras de sementes analisadas.

```

Burkh 1   GAGCGAGAAGTAGCGCTTATCGGCTGTCGTTCTTTAACAACTCTGGAAGAAGTAGTAAAGT 60
          |||
          GAGCGAGAAGTAGCGCTTATCGGCTGTCGTTCTTTAACAACTCTGGAAGAAGTAGTAAAGT

Burkh 61   GGATAGCGGAAGCGCTTATTGAGATGGGCGTGGAAGTTATCCGGGTTGTGATTGTATCG 120
          |||
          GGATAGCGGAAGCGCTTATTGAGATGGGCGTGGAAGTTATCCGGGTTGTGATTGTATCG

Burkh 121  ATGTATCTCAAGATGATTGAAACGCAAGTTCCGCTAATTGGAATACGGCACAAATGCCA 180
          |||
          ATGTATCTCAAGATGATTGAAACGCAAGTTCCGCTCAATTGGAATACGGCACAAATGCCA

Burkh 181  GAACTCAACCTGTAGCGGCTGTCATCTCCTTCGGGAGAG 229
          |||
          GAACTCAACCTGTAGCGGCTGTCATCTCCTTCGGGAGAG
  
```

FIGURA 6. Alinhamento de seqüências do gene da região 16S-23S rDNA ITS das amostras Bk09, Bk14, Bk26, Bk30, Bk32, Bk1592 e Bk1595 com a estirpe *Burkholderia glumae* BGR 1. Porto Alegre, RS, 2014.

```

Burkh 1   GTGCCGTATTCCAATTGAGCCGAACTTGGGTTTGAATCATCTTGAGATACATCGATACAA 60
          |||
          GTGCCGTATTCCAATTGAGCCGAACTTGGGTTTGAATCATCTTGAGATACATCGATACAA

Burkh 61   TCACAACCCGGATAACTTCCACGCCCATCTCAAATAAGCGCTTCCGCTATCCACTTTACT 120
          |||
          TCACAACCCGGATAACTTCCACGCCCATCTCAAATAAGCGCTTCCGCTATCCACTTTACT

Burkh 121  ACTTCTTCCAGATTGTTAAAGAACGACAGCCGATAAGCGCTACTTCTCGCTCATCCTCTG 180
          |||
          ACTTCTTCCAGATTGTTAAAGAACGACAGCCGATAAGCGCTACTTCTCGCTCATCCTCTG

Burkh 181  ACTGGCTCAATCGCCAATGACAACTGCTCA 210
          |||
          ACTGGCTCAATCGCCAATGACAACTGCTCA
  
```

FIGURA 7. Alinhamento de seqüências do gene da região 16S-23S rDNA ITS das amostras Bk07 e Bk32 com a estirpe *Burkholderia glumae* BGR 1. Porto Alegre, RS, 2014.

4.7 PCR multiplex para *Burkholderia glumae*, *B. gladioli* e *B. plantarii*

Com base na análise de 110 amostras resultante da extração por enriquecimento (BIO-PCR), incluindo as 27 amostras com resultado positivo na qPCR para a detecção de *Burkholderia* spp., confirmou-se a presença de *Burkholderia glumae* em nove amostras (sete amostras nacionais e duas importadas dos EUA) analisadas pela PCR multiplex para as espécies *B. glumae*, *B. gladioli* e *B. plantarii* (Tabela 8), com oligonucleotídeos baseados no *gyr B* (Maeda *et al.*, 2006). Observou-se que as nove amostras tiveram amplificações do seu DNA, apresentando um produto de tamanho de 529 pb, similar ao DNA de *B. glumae* utilizado como controle positivo (Figura 8). Contudo, nenhuma das amostras testadas para *B. gladioli* ou *B. plantarii* apresentou amplificação do fragmento esperado 479 e 597 pb, respectivamente.

Uma vez que a técnica de PCR permite a amplificação do DNA proveniente tanto de células viáveis quanto de células não viáveis, a utilização da técnica de enriquecimento antes do processo de amplificação aumenta o número de células presentes na solução de extração do patógeno. Além de proporcionar um considerável aumento no nível de detecção, confirmado posteriormente na leitura do gel de agarose, o procedimento de enriquecimento ainda ajuda a reduzir a presença de inibidores da reação da polimerase em cadeia (Song *et al.*, 2004; Schaad *et al.*, 1995; Schaad *et al.*, 2003).



FIGURA 8. Perfil eletroforético dos produtos de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores glu-FW/glu-RV; gla-FW/gla-RV; pla-FW/pla-RV de quatro isolados de amostras de arroz importadas; M-marcador de peso molecular 100 pb *DNA ladder* (Qiagen); 1-Bk 07(1), 2-3, 1592(1) e 1592(3), 4-238(5), 5-6, 1595(2) e 1595(5), 7-Bk 14(1), 8-Bk 35(1), 9-7312(4), 10-8600(1), 11-8716(1), 12-controle negativo (água), 13-controle positivo *B. gladioli* (479 pb), 14-controle positivo *B. glumae* (529 pb) e M-marcador de peso molecular 100 pb *DNA ladder* (Qiagen) Porto Alegre, RS, 2014.

Entre os 17 isolados bacterianos oriundos das 27 amostras das safras 2011/12, 2012/13 e 2013/14 e do levantamento de *Burkholderia* spp., observou-se que quatro isolados (EUA) tiveram a amplificação do seu DNA e apresentaram um produto de 529 pb, similar ao DNA de *B. glumae* utilizado como controle positivo, enquanto 13 isolados não apresentaram amplificações do fragmento esperado para nenhuma das bactérias testadas neste estudo.

TABELA 8. Número de amostras de sementes de arroz nacionais e importadas com resultado positivo na qPCR por sonda de hidrólise para *Burkholderia* spp., qPCR por SYBR® Green e PCR multiplex. Porto Alegre, RS, 2014.

Gênero	qPCR com sonda	qPCR SYBR® Green	PCR multiplex
<i>Burkholderia</i> spp.	27/342	-	-
Espécies			
<i>B. glumae</i>	9/342	9/342	9/110
<i>B. gladioli</i>	-	-	0/110
<i>B. plantarii</i>	-	-	0/110

Embora a PCR seja uma técnica altamente sensível, ela não permite a diferenciação entre células viáveis e células não viáveis. Essa limitação é um

dos fatores que dificulta a aplicação da PCR em laboratórios de quarentena. No método desenvolvido por Sakthivel *et al.* (2001) para a detecção de Xoo em sementes e plantas de arroz, essa limitação pôde ser solucionada com o emprego da BIO-PCR, utilizando-se uma suspensão das células bacterianas obtidas como molde para a reação. Os autores concluíram que o método eliminou tanto o problema de resultados falso-negativos, devido à presença de inibidores da PCR em plantas ou em extratos de sementes, quanto o de falso-positivos resultantes da presença de células não viáveis.

Sendo assim, apesar de ser um método de detecção menos robusto quando comparado com a qPCR, devido ao fato de os resultados das análises de PCR serem apenas qualitativos, indicando somente a presença ou ausência do agente, não permitindo e extimativa exata de valores quantitativos (Kubista *et al.*, 2003), a PCR convencional pode ser utilizada para detecção, até porque não existe ainda sonda e ou qPCR usando SYBR Green desenvolvida para *B. gladioli* e *B. plantarii*, também fitopatogênicas para arroz.

4.8 Caracterização de isolados bacterianos obtidos de sementes de arroz positivos na qPCR para *Burkholderia* spp.

4.8.1 Isolamento do patógeno e testes de determinação

Das colônias que cresceram no meio de cultivo B de King-MKB a partir da lavagem e do enriquecimento, obteve-se pelo menos um isolado amarelo e/ou branco acinzentado, Gram negativo, de cada amostra, totalizando 43 isolados que foram analisados em qPCR para detecção de *Burkholderia* sp. Contudo, observou-se que apenas 17 isolados confirmaram ser de espécies

para gênero *Burkholderia*. Destes, quatro isolados apresentaram a produção de pigmento amarelo no meio de cultura B de King-MKB, como possível indicador morfológico para *B. glumae*; os outros 13 isolados apresentaram coloração branca ou acinzentada, com bordas irregulares (Figura 9). Características semelhantes são relatadas com as bactérias fixadoras de nitrogênio: *B. brasiliensis*, *B. tropica*, *B. kururiensis*, *B. vietnamiensis* (Reis *et al.*, 2002) e *B. silvatlantica* (Perin *et al.*, 2006). Além disso, conforme descrito por Yuan (2004), colônias apresentando margens lisas e/ou rugosas de coloração amarelada ou branca-acinzentada em meio de cultivo B de King-MKB são comuns para *Burkholderia* spp., e, universalmente, as estirpes não- virulentas estão associadas a colônias brancas-acinzentadas. A característica morfológica foi registrada, mas como pode apresentar variação de acordo com o meio de cultivo, não foi considerada para a análise (Hungria & Araújo, 1994).

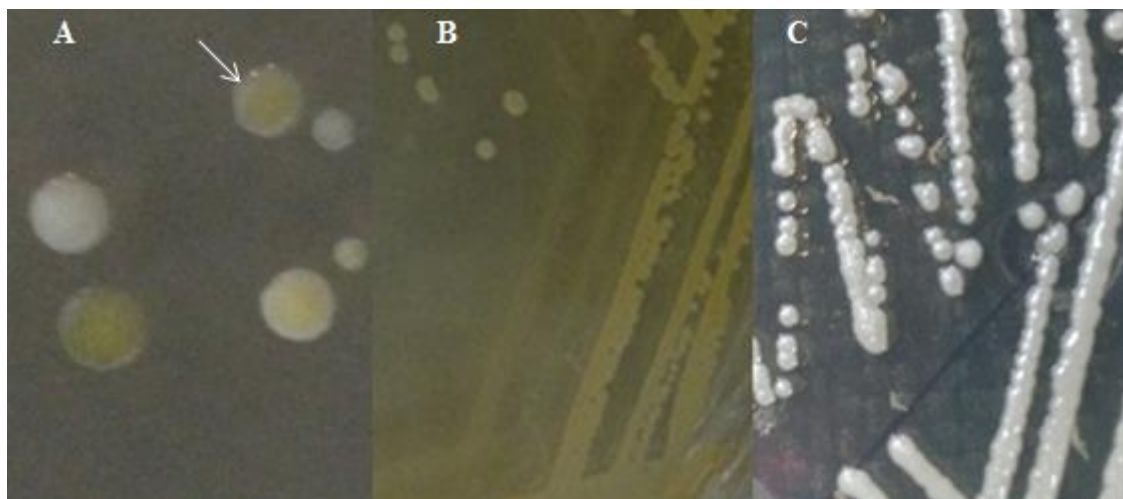


FIGURA 9. **A.** Crescimento bacteriano em meio de cultivo B de King-MKB, colônia característica; **B.** Colônias de *Burkholderia* sp. mostrando a pigmentação amarela da toxoflavina em meio de cultivo B de King-MKB; **C.** Colônias de *Burkholderia* sp. de coloração branca em meio de cultivo B de King-MKB.

No teste da presença da enzima catalase, observou-se que todos os isolados apresentaram reação positiva, e o teste de oxidase teve resultado variável conforme a espécie de *Burkholderia*, sendo que dos 17 isolados apenas os quatro isolados dos EUA (1592-1; 1592-3; 1595- 2; 1595- 5) apresentaram reação positiva (Tabela 9).

4.8.2 Reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco

As reações de hipersensibilidade (RH) em folhas de tabaco com os isolados selecionados apresentaram resultados positivos somente para quatro isolados (1592-1; 1592-3; 1595-2; 1595-5) originários dos EUA e que tiveram capacidade de induzir a RH após 24 h da infiltração com o inóculo bacteriano (Figura 10). Outros trabalhos mostraram que a virulência da bactéria *B. glumae* está fortemente correlacionada com a produção da toxoflavina (Kim *et al.*, 2004; Nandakumar *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 1991; Yoneyama *et al.*, 1998), um importante fator de virulência envolvido com o apodrecimento de grãos e mudas de arroz (Jeong *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007; Ham *et al.*, 2011), fatos estes observados neste estudo quando se avaliou que isolados oriundos de sementes de arroz apresentando características morfológicas como a pigmentação amarela em meio de cultivo B de King-MKB indicando a presença da toxina toxoflavina induziram RH. Esses resultados estão de acordo com os estudos realizados por Karki (2012), que confirmou que somente as estirpes virulentas de *Burkholderia* sp. e com a presença da toxina foram capazes de induzir RH.



FIGURA 10. Reação de hipersensibilidade de folhas de tabaco 24 h após a infiltração de suspensão de células de estirpes de *Burkholderia* sp. Porto Alegre, RS, 2013.

4.8.3 Virulência

As áreas maceradas de cebola foram relacionadas com a produção de fatores de virulência como a presença do pigmento toxoflavina em alguns isolados. Entre os 17 isolados, apenas os quatro isolados dos EUA (Tabela 9) foram capazes de produzir um pigmento amarelo, provavelmente da toxoflavina, e também de macerar as escamas de cebola, enquanto os outros 13 isolados, que provavelmente não são capazes de produzir a toxina toxoflavina, foram incapazes de macerar, ou seja, são avirulentas ou não patogênicas (Figura 11). Postula-se que *B. glumae* pode macerar escamas de bulbos de cebola porque algumas das estirpes são patógenos desta cultura (Karki, 2012). Estirpes de *Burkholderia* sp. que não produzem a toxoflavina, um pigmento amarelo sobre o meio de cultura B de King-MKB, são avirulentas (Nandakumar *et al.*, 2009) e sugerem que a produção da toxoflavina é um requisito para causar clorose nas panículas de arroz, a atividade de maceração em cebola e os sintomas de podridão causados por espécies deste gênero (Karki, 2012; Suzuki *et al.*, 2004).

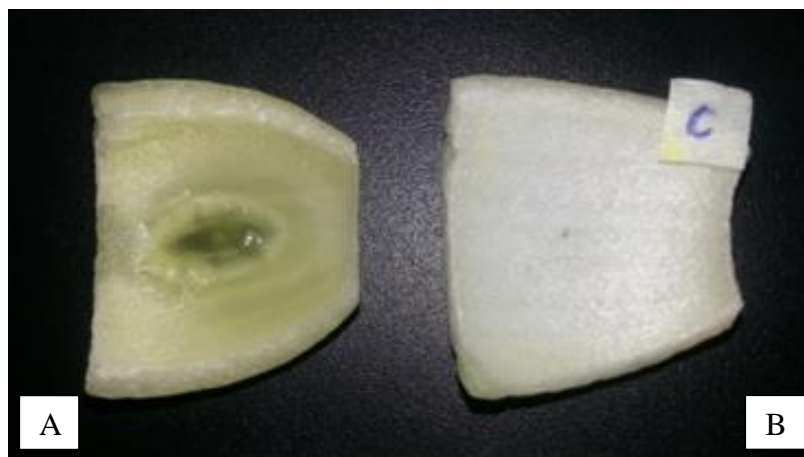


FIGURA 11. Teste de virulência realizado sob escamas de cebola. A) cebola inoculada com *Burkholderia glumae* apresentando maceração; B) cebola assintomática sem a presença de maceração. Porto Alegre, RS, 2013.

Estes resultados corroboram com os realizados por Jacobs *et al.* (2008), que usou um sistema de análise alternativa usando escamas do bulbo de cebola para a determinação da virulência de *B. glumae* e para testar cepas de *B. cepacia* patogênicas à cebola. Estes dados estão de acordo com os realizados por Karki (2012), onde estirpes virulentas de *B. glumae* maceraram escamas de bulbos de cebola, sendo correlacionadas com a virulência em panículas de arroz.

TABELA 9. Perfil dos isolados de *Burkholderia* sp. produtores de toxoflavina e qPCR positivas para o gênero. Porto Alegre, RS, 2014.

Isolado/origem	Toxoflavina	Gram	Oxidase	Catalase	RH	Cebola
238-3*	-	-	-	+	-	-
1592-1***	+	-	+	+	+	+
1592-3***	+	-	+	+	+	+
1595-2***	+	-	+	+	+	+
1595-5***	+	-	+	+	+	+
7312-1*	-	-	-	+	-	-
7312-3*	-	-	-	+	-	-
9313-2*	-	-	-	+	-	-
9313-3*	-	-	-	+	-	-
9314-3*	-	-	-	+	-	-
Bk09-1**	-	-	-	+	-	-
Bk32-1**	-	-	-	+	-	-
Bk30-1**	-	-	-	+	-	-
9494-4*	-	-	-	+	-	-
9493-5*	-	-	-	+	-	-
13804-1*	-	-	-	+	-	-
Bk26-4**	-	-	-	+	-	-

* Argentina

** Brasil

***EUA

4.8.4 Utilização dos sistemas GN2 e GEN III

Os resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos selecionados, como a produção de ácido a partir de sorbitol, inositol, thehalose, a redução do nitrato e a ausência de ácido a partir da sacarose, indicaram que a caracterização dos isolados utilizando o sistema Biolog, resultou na identificação de quatro isolados de *B. glumae* (Figura 12), oriundos dos EUA (Tabela 6), uma vez que apresentaram perfil metabólico semelhante aos encontrados na base de dados do sistema, permitindo correspondência com a espécie. Características semelhantes foram relatadas por Cottyn *et al.* (1995), que, a partir de isolados associados a grãos descoloridos e à podridão da bainha do arroz, identificaram através da utilização de fontes de carbono pelo sistema Biolog GN2 as estirpes *B. glumae*, *Acidovorax avenae* e *Pseudomonas*

fuscovaginae. Fato semelhante foi descrito por Yuan (2004), que constatou, na avaliação de 402 isolados bacterianos, a partir de grãos e bainhas do arroz sintomáticos oriundos de áreas de produção em Louisiana, EUA, utilizando o sistema Biolog, que estes isolados pertenciam a 39 espécies distribuídas em 16 gêneros, e que *Burkholderia* foi o gênero mais comum. Além disso, as quatro espécies mais comumente isoladas foram *B. glumae*, *B. gladioli*, *B. multivorans* e *B. plantarii*, compondo 90% das estirpes de bactérias fitopatogênicas e indicando serem agentes do CBP e podridão da bainha. Ainda três isolados de *B. cocovenenans* e três de *B. vietnamiensis* indicaram que estas espécies raramente colonizam arroz nos EUA.

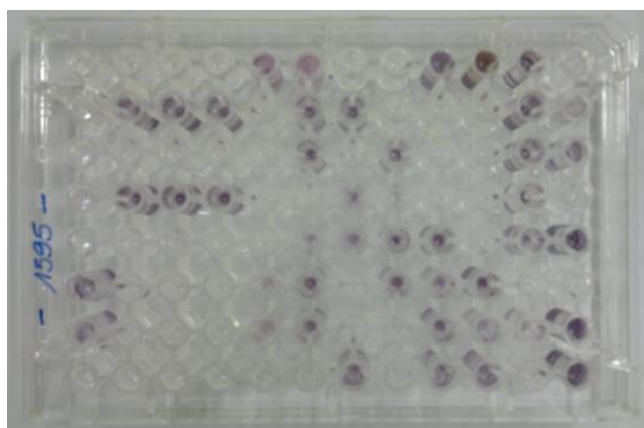


FIGURA 12. Placa mostrando o resultado da análise do perfil metabólico da bactéria *Burkholderia glumae* pelo sistema Biolog TM GN2, obtido com o isolado 1595-2. Porto Alegre, RS, 2013.

Três isolados (Bk32-1, 238-3 e 9314-3) submetidos ao sistema GEN III (Biolog Inc., CA, EUA) indicaram tratar-se de *B. vietnamiensis* (Figura 13). Esta bactéria é a terceira espécie do complexo *B. cepacia* (Bcc) mais frequentemente isolada em pacientes com fibrose cística (Menard *et al.*, 2007).

Rodrigues *et al.* (2006), analisando isolados de duas variedades de arroz, principalmente das amostras radiculares, cultivadas em solos

proveniente de Goiás e Rio de Janeiro, confirmaram, a partir da caracterização fisiológica baseada no uso de fontes de carbono, para os isolados de *Burkholderia*, a presença de *B. kururiensis* e *B. vietnamiensis*, na qual cerca de 20% dos 95 compostos de carbono testados foram usados por todos os isolados e pelas estirpes de *Burkholderia*. Os resultados revelaram que, de modo geral, a maioria dos isolados se comportou como a estirpe de tipo *B. vietnamiensis* (TVV75). Segundo Reis *et al.* (2002), quatro microrganismos do gênero *Burkholderia* analisados em seus estudos (*B. brasiliensis*, *B. tropica*, *B. kururiensis* e *B. vietnamiensis*) são urease negativos, catalase positivos e possuem capacidade de reduzir nitrato, características também observadas neste trabalho e que colaboraram para a detecção de *B. vietnamiensis* nas amostras de arroz nacionais e importadas.

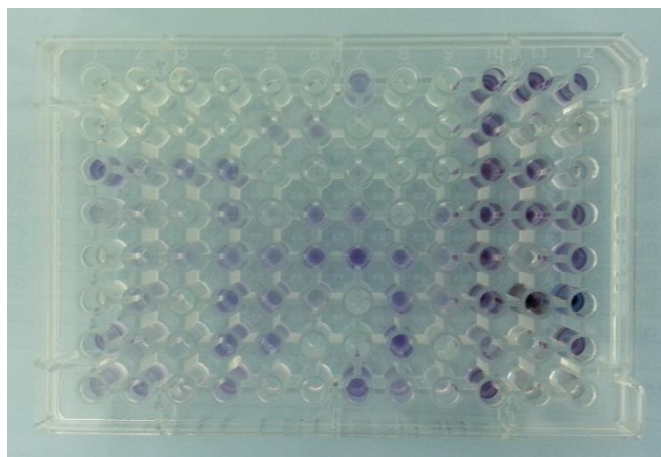


FIGURA 13. Placa mostrando o resultado da análise do perfil metabólico da bactéria *Burkholderia vietnamiensis* pelo sistema Biolog TM GEN III, obtido com o isolado 238-3, Porto Alegre, RS, 2014.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições em que esta pesquisa foi conduzida, permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. *Burkholderia glumae*, *B. gladioli* e *B. plantarii* não estão presentes em sementes de arroz nacionais.
2. Sementes de arroz importadas são uma ameaça real de introdução de *B. glumae* no Brasil.
3. O método proposto para detecção de *B. glumae* deve ser adotado pelos laboratórios responsáveis pela análise de sementes de arroz importadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O destaque ocupado pela cultura do arroz no Brasil e o crescimento da importação de sementes aumentam a necessidade de um controle rigoroso pela defesa sanitária vegetal. Planos de contingências nas atividades de proteção de plantas, especialmente, se há um risco iminente da entrada de pragas exóticas, contribuem para a proteção do agronegócio brasileiro, considerando não apenas os efeitos diretos de uma praga, mas as medidas a serem tomadas para sua contenção. Espécies de *Burkholderia* podem causar impacto econômico no comércio de sementes, como a bactéria *B. glumae*, responsável por causar o crestamento bacteriano da panícula (CBP), dessa forma, o trabalho buscou subsidiar medidas de prevenção de entrada destas bactérias no país a partir da utilização de um método específico que permita a realização das análises fitossanitárias assegurando a liberação do material vegetal livre desses patógenos, como uma estratégia de manejo em áreas indenes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2008.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-Time PCR: understanding CT**. 2008. Disponível em:
<http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_053906.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2014.

ARAÚJO, W. L. **Caracterização de genes de *Burkholderia* sp. associados ao controle biológico de patógenos**. 2013. Disponível em:
<<http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/141886/caracterizacao-de-genes-de-burkholderia-sp-associados-ao-controle-biologico-de-patogenos/>>. Acesso em: 21 jan. 2013.

AZEGAMI K. et al. *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling slight. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 37, p. 144-152, 1987.

AZEGAMI K. et al. Tropolone as a root growth-inhibitor produced by a plant pathogenic *Pseudomonas* sp. causing seedling blight of rice. **Annals of the Phytopathology Society of Japan**, Tokio, v. 51, p. 315-317, 1985.

BATOKO, H. et al. Involvement of toxins produced by *Pseudomonas fuscovaginae* in etiology of rice Bacterial Sheath Brown Rot. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 145, p. 525-531, 1997.

BRAID, M. D.; DANIELS, L. M.; KITTS, C. L. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 52, p. 389-393, 2003.

BRASIL. Instrução Normativa nº 41, de 01 de julho de 2008. Estabelece a lista de pragas quarentenárias ausentes (A1) e de pragas quarentenárias presentes (A2) para o Brasil e aprova os procedimentos para as suas atualizações; altera a Instrução Normativa nº 52 de 20 de novembro de 2007, publicada no Diário Oficial da União de 21 de novembro de 2007, Seção 1, p. 31. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, p. 8., 02 jul. 2008.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO V. T. C. (Ed.) **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998.

CHA, K.H. et al. Influence of weather condition at heading period on the development of rice bacterial grain rot caused by *Burkholderia glumae*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 7, p. 150-154, 2001.

CHEN, Z.; MEW, T. W. Relationship between the colonization, concentration and spray timing of antagonistic bacteria and sheath blight of rice. **Jiangsu Journal of Agricultural Sciences**, Nanjing, v.14, n.1, p. 31-35, 1998.

COENYE, T.; VANDAMME, P. **Burkholderia**: molecular microbiology and genomics. Gent, Belgium : Horizon Bioscience, 2007.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 719–729, 2003.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Custos de Produção**. 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1277&t=2&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 30 maio 2014.

COTHER, E. J. et al. Polyphasic identification of *Pseudomonas fuscovaginae* causing sheath and glume lesions on rice in Australia. **Plant Pathology**, [Clayton], v. 38, n. 3, p. 247-261, 2009.

COTTYN, B. et al. Bacterial diseases of rice. I. Pathogenic bacteria associated with sheath rot complex and grain discoloration of rice in the Philippines. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, p. 429-437, 1996.

COTTYN, B. et al. Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, p. 282-292, 2001.

DANCE, D.A. Ecology of *Burkholderia pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia* spp. and human-animal hosts. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 74, p. 159–168, 2000.

DE BOER, S. H.; ELPHINSTONE, J. G.; SADDLER, G. S. Molecular detection strategies for phytopathogenic bacteria. In: BIOTECHNOLOGY and plant disease management. Oxford: Oxford Press, 2007. p. 165-166.

DE BOER, S. H.; WARD, L. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 854-858, 1995.

DEUNER, C.C. et al. Sensibilidade do método de obtenção das células bacterianas e da técnica de PCR para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 38, n. 1, p. 48-53, 2012.

DEVESCOVI, G. et al. Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 15, p. 4950-4958, 2007.

DIAGO, M. et al. Un buen manejo del cultivo, verdadera barrera contra el añublo bacterial. **Arroz**, Bogotá, v. 57, n. 482, p. 30-38, 2009.

DIREITO, I. C. N. et al. Otimização da técnica de extração de DNA de amostras de solo e da amplificação parcial dos genes nifH para avaliação de populações de bactérias diazotróficas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28., 2001, Londrina. **Resumos**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2001, p. 72.

ELPHINSTONE, J.G. et al. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. **Bull OEPP**, Oxford, v. 26, p. 663–678, 1996.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **[Informações obtidas no site]** 2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo_4_ed/doencas_foliare.htm>. Acesso em: 27 fev. 2014.

EMBRAPA - Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. **Sistemas de produção**. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/arroz/arrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>>. Acesso em: 27 jan. 2014.

FANG, Y. et al. Real-time fluorescence PCR method for detection of *Burkholderia glumae* from rice. **Rice Science**, Hangzhou, v. 16, p. 157-160, 2009.

FAO – Food and Agriculture Organization. **Crop Prospects and Food Situation**. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/017/al998e/al998e.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2014.

FEDEARROZ - Federación Nacional de Arroceros. **En Añublo bacterial de la panícula**. 2009. Disponível em: <http://www.fedearroz.com.co/documentos/2009/Aniublo_bacterial.pdf.2p>. Acesso em: 10 maio 2014.

FURUYA, N. et al. Reaction of tobacco and rice leaf tissue infiltrated with *Burkholderia glumae* or *B. gladioli*. **Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University**, Fukuoka, v. 42, n.1-2, p. 43-51, 1997.

FURUYA, N. Specific Oligonucleotide Primers Based on Sequences of the 16S-23S rDNA Spacer Region for the Detection of *Burkholderia gladioli* by PCR. **Plant Pathology**, [Clayton], v. 68, p. 220-224, 2002.

- GARRITY, G. M. et al. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. New York: Springer-Verlag, 2005. v. 2.
- GOTO, K.; OHATA, K. New bacterial diseases of rice (brown stripe and grain rot). **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v. 21, p. 46-47, 1956.
- GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1992.
- GOTO, M.; ZINGLER, R. S.; JOHN, V. T. Progress in seed health research on seedborne and contaminant bacteria, viruses and nematodes. In: RICE seed health: proceedings of the International Workshop on Rice Seed health. Manila: IRRI, 1988. p.131-150.
- GUIMARÃES, S. L. et al. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 4, p. 32-39, 2010.
- HAM, J. H.; MELANSON, R. A.; RUSH, M. C. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 32-339, 2011.
- HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology Nature Publishing Company**, New York, v. 11, n. 1, p. 1026-1030, 1993.
- HIKICHI, Y. Mode of action of oxolinic acid against bacterial seedling rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. 1. Relationship between population dynamics of *P. glumae* on seedlings of rice and disease severity of bacterial seedling rot of rice. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v. 59, p. 441–446,1993a.
- HIKICHI, Y. Mode of action of oxolinic acid against bacterial seedling rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*. 2. Efficacy of oxoninic acid against secondary infection. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v. 59, p. 447–451,1993b.
- HIKICHI, Y.; OKUNO, T.; FURUSAWA, I. Mode of action of oxolinic acid against bacterial seedling rot of rice caused by *Pseudomonas glumae*.I: Infection with *P. glumae* into plumules. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v. 61, n.2, p. 134-136, 1995.
- HIKICHI, Y. Relationship between population dynamics of *Pseudomonas glumae* on rice plants and disease severity of bacterial grain rot of rice. **The Journal of Pesticide Science**, Tokio, v. 18, p. 319–324,1993c.
- HOLMES, A.; GOVAN, J.; GOLDSTEIN, R. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human? **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, p. 221-227, 1998.

- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994.
- IWAI, T. et al. Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 15, p. 515- 521, 2002.
- JACOBS, J. L. et al. Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 3121-3129, 2008..
- JEONG, Y. et al. Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 890-895, 2003.
- JIAO, Z. et al. Need to Differentiate Lethal Toxin-Producing Strains of *Burkholderia gladioli*, Which Cause Severe Food Poisoning: Description of *B. gladioli* pathovar *cocovenenans* and an Emended Description of *B. gladioli*. **Microbiology Immunology**, Tokio, p. 915-925, 2003.
- KARKI, H. S. **Physiological, biochemical and molecular characteristics associated with virulence of *Burkholderia glumae***: the major causative agent of Bacterial Panicle Blight of Rice. Nepal: The Department of Plant Pathology and Crop Physiolog, 2010.
- KATSUBE, K.; TAKEDA, S. Increase in severity of bacterial seedling blight of rice with soil drenching of fungicides. **Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan**, Omagari, v. 49, p. 37-39, 1998.
- KAWARADANI, M.; OKADA, K.; KUSAKARI, S. New selective medium for isolation of *Burkholderia glumae* from rice seeds. **Journal of General Plant Pathology**, Tokio, v.66, p. 234-237, 2000.
- KEITH. K. E. et al. Functional characterization of OXA-57, a class D beta-lactamase from *Burkholderia pseudomallei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [Washington], v. 49, p. 1639-1641, 2005.
- KIM, B. K. et al. Rapid and Specific Detection of *Burkholderia glumae* in Rice Seed by Real-Time Bio-PCR Using Species - Specific Primers Based on an rhs Family Gene. **Plant Disease**, St. Paul, v. 96, n. 4, p. 441-707, 2012. Disponível em: <<http://www.cabi.org/cpc/search/?q=Burkholderia+plantarii>> Acesso em: 12 jul. 2014.
- KIM, J. et al. Quorum sensing and the LysR type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 921-934, 2004.

KREADER, C. A. Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 3, p.1102–1106, 1996.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 27, p. 95-125, 2003.

KURITA, T.; TABELI, H. On the pathogenic bacterium of bacterial grain rot of rice. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v. 33, p. 111, 1967.

LINCOLN, S. P. et al. Bacterial soft rot of *Agaricus bitorquis*. **Plant Pathology**, [Clayton], v. 404, p. 136-144, 1991.

LIYAMA, K. et al. Role of phytotoxins in the pathogenesis of *Burkholderia* species. **Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University**, Fukuoka, v. 42, n.3, p. 289-293, 1998.

LOPES, R. **Mapas de ligação AFLP e identificação de genes de resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá-amarelo**. 2003. 126 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

LUCCA FILHO, O. A. Patologia de sementes In: SEMENTES: fundamentos científicos e tecnológicos. 2. ed. Pelotas: Editora Universitária/UFPel, 2006.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: FAEPE, 2000.

MACKAY, I. M. **Real-Time PCR in microbiology**: from diagnosis to characterization. Norfolk UK: Caister Academic Press, 2007.

MAEDA, Y. et al. Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using gyrB and rpoD sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, p. 1031-1038, 2006.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C.G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1539-1551, 2008.

MARIANO, R. L. R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária, 2000.

MARTIN, R. R; JAMES, D.; LEVESQUE, C. A. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.38, p. 207-239, 2000.

- MARTINS, K. M. **Avaliação microbiológica e epidemiológica do complexo *Burkholderia cepacia* isoladas de pacientes com fibrose cística.** 2007. 106f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- MENARD, A. et al. Selection of nitrogen-fixing deficient *Burkholderia vietnamiensis* strains by cystic fibrosis patients: involvement of nif gene deletions and auxotrophic mutations. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 5, p.1176-1185, 2007.
- MEW, T. W.; VERA CRUZ, C. M.; MEDALLA, E. S. Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to rice cultivars planted in the Philippines. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, p. 1029-1032, 1992.
- MINOGUE, E. et al. Microbiology, School of Natural Sciences, National University of Ireland, Galway, Ireland. Diagnostics method for the rapid quantitative detection and identification of low-level contamination of high-purity water with pathogenic bacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 40, p. 1005-1013, 2013.
- MIYAGAWA, H.; TAKAYA, S. Biological control of bacterial grain rot of rice by avirulent strain of *Burkholderia gladioli*. **Bulletin of the Chugoku National Agricultural Experiment Station**, Hiroshima, v. 21, p. 1-21, 2000.
- MIYAGAWA, H.; INOUE, H. The distribution of *Burkholderia plantarii* in the paddy water in Japan. Rome: FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002.
- MIZUKAMI, T.; WAKIMOTO, S. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 7, n. 1, p. 51-72, 1969.
- NANDAKUMAR, R.; RUSH, M. C.; CORREA, F. Association of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with panicle blight symptoms on rice in Panama. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, n. 6, p. 767, 2007.
- NANDAKUMAR, R. et al. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. **Plant Disease**, St. Paul, v. 93, p. 896-905, 2009.
- NUNES, J.L. da S. et al. Eficiência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento do porta-enxerto de pessegueiro "Aldrighi". **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 4, p. 931-940, 2009.
- OLIVEIRA, A. L. M. et al. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 242, p. 205-215, 2002.
- ORLANDI, P.A.; LAMPEL, K.A. Extraction-free, filter-based template preparation for the rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic

protozoa. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 2271-2277, 2000.

OZAKMAN, M.; SCHAAD, N. W. A real-time BIO-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in asymptomatic potato tubers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 25, n. 3, p. 232-239, 2003.

PALLERONI, N. J.; HOLMES, B. *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 31, n. 4, p. 479-481, 1981.

PARIZZI P.; MORANDI, I. **Legislação fitossanitária e normas em fitossanidade**. Brasília, DF: ABEAS, 2006.

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**. Netherlands: Springer, 2008.

PÉREZ, C. R. Avances en el manejo integrado de *Burkholderia glumae*. **Arroz**, Bogotá, v. 58, n. 488, p. 4-8, 2010.

PERIN, L. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3103–3110, 2006.

PICARD, C. et al. Detection and Enumeration of Bacteria in Soil by Direct DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 9, p. 2717-2722, 1992.

PRADO, G. **Patólogo colombiano sugiere medidas para manejo bacteriano en arroz**. 2010. Disponível em: <http://www.idiaf.org.do/noticias/detallemain.php?recordID=1042> Acesso em: 17/02/2014.

RAYMAEKERS, M. et al. Checklist for optimization and validation of Real-Time PCR assays. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 23, n. 3, p. 145-151, 2009.

REIS, V.M. et al. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 227–247, 2000.

RIERA-RUIZ, C. A. et al. First Report of *Burkholderia glumae* Causing Bacterial Panicle Blight on Rice in Ecuador. **Plant Disease**, St. Paul, v. 98, n. 7, 2014.

ROBE, P. et al. Extraction of DNA from soil. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 39, p. 183-190, 2003.

RODRIGUES, L. S. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n. 2, p. 275-284, 2006.

ROGERS, C.; BURGOYNE, L. Bacterial typing: storing and processing of stabilized reference bacteria for polymerase chain reaction without preparing DNA - an example of an automatable procedure. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 247, n. 2, p. 223–227, 1997.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV Imprensa Universitária, 1995.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **Genome Research**, New York, v. 4, n. 1, p.185-194, 1995.

RUSH, M. C. et al. Biotechnology and control of rice diseases. **Louisiana Agriculture**, Baton Rouge, v. 46, p. 20-23, 2003.

SABINO, D. C. C. et al. **Avaliação da capacidade de bactérias *Burkholderia brasiliensis* e *Herbaspirillum seropedicae* em promover o crescimento de plântulas de arroz**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. (Boletim Técnico, 45)

SAICHUK, J. K.; LANDRY, K. J. **Louisiana Rice Research Verification Program 2009**. [S.l.]: LSU AgCenter, 2009.

SAKTHIVEL, N.; MORTENSEN, C. N.; MARTHUR, S. B. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 3, p. 435-441, 2001.

SALLES, J.F. ***Burkholderia* community structure in soils under different agricultural management**. 2010. 144 f. Tese (Doutorado) - Institute of Biology Leiden, Leiden University, Leiden, 2005. Disponível em: <https://openaccess.leidenuniv.nl/bitstream/handle/1887/1976/Thesis_Salles.pdf?sequence=1>. Acesso em: 25 mar. 2014.

SAVOIA, D.; ZUCCA, M. Clinical and environmental *Burkholderia* strains: biofilm production and intracellular survival. **Current Microbiology**, New York, v. 54, p. 440-444, 2001.

SAYLER, R. J.; CARTWRIGHT, R. D.; YANG, Y. Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, n. 5, p. 603-610, 2006.

SCHAAD, N. W. et al. A combined biological and enzymatic amplification BIO-PCR technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 2, p. 243-248, 1995.

SCHAAD, N.W. et al. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated real-time fluorescence detection system. **Plant Disease**, St. Paul, v.83, p. 1095-1100, 1999.

SCHAAD, N. W. et al. *Xylella fastidiosa* taxonomy. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93S, n. 6S, p. 76, 2003.

SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. Real Time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 24, p. 250-258, 2002.

SCHAAD N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathology Society, 2001.

SEPP, R. et al. Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 47, p. 318-323, 1994.

SHA, X. et al. Registration of 'Jupiter' rice. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 1811–1812, 2006.

SHAHJAHAN, A. K. M. et al. Epidemiological studies on panicle blight of rice: critical stage of infection and the effect of infected seeds on disease development and yield of rice. **Proceeding 28th RTWG**, [S.I.], v. 28, p. 77, 2000a. (Proceedings of the 28th Rice Technical Working Group, Biloxi, MS, Feb. 28th -March 1st.)

SHAHJAHAN, A. K. M. et al. Panicle blight, **Rice Journal**, [New Orleans], april, p. 26-28, 2000b.

SILVA, K. **Densidade e caracterização de bactérias diazotróficas associativas oriundas de diferentes sistemas de uso da terra na região amazônica**. 2006. 78f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SOLIS, R. et al. Involvement of quorum sensing and RpoS in rice seedling blight caused by *Burkholderia plantarii*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 259, p. 106-112, 2006.

SONG, J.J. et al. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. **Science**, New York, v. 305, p. 1434–1437, 2004.

SONG, W. Y. et al. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. **Journal of Phytopathology**, [Berlin], v. 152, p. 667-676, 2004.

SOSBAI – Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Bento Gonçalves, 2010.

SOSBAI. **Arroz Irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Gravatal, 2012.

- SOUZA JÚNIOR, I. T. **Desenvolvimento de qPCR para detecção de *Xanthomonas oryzae* em sementes de arroz.** 2014. 70 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- SUZUKI, F. et al. Identification of proteins involved in toxin production by *Pseudomonas glumae*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v. 64, n. 2, p. 75-79, 1998.
- SUZUKI, F. et al. Molecular characterization of the tox operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokio, v. 70, p. 97–107, 2004.
- TAKEUCHI, T. et al. Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by PCR using primers selected from the 16S-23S rDNA spacer regions. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v. 63, n. 6, p. 455-462, 1997.
- TANAKA, T.; KATOH, T.; FUJITA, Y. Isolation of *Pseudomonas plantarii*, pathogen of bacterial seedling blight of rice, from the weeds around the paddy field. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v. 60, n. 5, p. 640-643, 1994.
- TSUSHIMA, S.; MOGI, S.; SAITO, H. Existence of *Pseudomonas glumae* on the rice seeds and development of the simple method for detecting *P. glumae* from the rice seeds. **Bulletin of the Chugoku National Agricultural Experiment Station**, Hiroshima, v. 25, p. 261-270, 1989.
- TSUCHIMA, S.; NAITO, H.; KOITABASHI, M. Population dynamics of *Pseudomonas glumae*, the causal agent of bacterial grain rot of rice, on leaf sheaths of rice plants in relation to disease development in the field. **Annals of the Phytopathology Society of Japan**, Tokio, v.62, p. 108–113, 1996.
- TSUSHIMA, S. Study on control and epidemiology of bacterial grain rot of rice. **Journal of General Plant Pathology**, Tokio, v. 77, p. 358-360, 2011.
- UEMATSU, T. et al. Occurrence of bacterial seedling rot in nursery flat, caused by grain rot bacterium *Pseudomonas glumae*. **Annals of the Phytopathology Society of Japan**, Tokio, v. 42, p. 310–312, 1976.
- URA, H. et al. *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. **Plant Pathology**, [Clayton], v. 72, p. 98–103, 2006.
- VANDAMME, P. et al. *Burkholderia anthina* sp. nov. *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound test results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 33, p. 143-149, 2002.

VERA CRUZ, C. M. et al. **Laboratory manual on detection of *Xanthomonas oryzae* pathovars from rice seeds.** Manila: IRRI, 2012.

VIEIRA, M.G.G.C. Técnicas moleculares aplicadas a patologia de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7, 2002, Sete Lagoas, MG. [Anais]. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. p.183-186.

WANG, Z. et al. Relationship between productivity and some other bacteriological properties in the mutant strains of *Pseudomonas glumae* induced by nitrosoguanidine-treatment. **Annals of the Phytopathology Society of Japan**, Tokio, v. 57, p. 219-224, 1991.

WEINBERG, J. B. et al. *Burkholderia glumae* infection in an infant with chronic granulomatous disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45(2), p. 662-665, 2007.

XIE, G. L.; MEW, T. W. A leaf inoculation method for detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* from rice seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, p. 1007-1011, 1998.

YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology Immunology**, Tokio, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YONEYAMA, K. et al. Toxoflavin is an essential factor for virulence of *Burkholderia glumae* causing rice seedling rot disease. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokio, v. 64, n. 2, p. 91-96, 1998.

YOUNG, J. M. et al. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 21, p. 153–177, 1978.

YUAN, X. **Identification of bacterial pathogens causing panicle blight of rice in Louisiana.** 2004. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Agricultural and Mechanical College, Louisiana State University, Baton Rouge, 2004.

ZAPATA, N. M. V. F.; VÉLEZ, D. U. Determinación de la Infección de *Burkholderia glumae* en Semillas de Variedades Comerciales Colombianas de Arroz. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, [Medellín], v. 64, n. 2, p. 6093-6104, 2011.

ZEIGLER, R. S.; ALVAREZ, E. Characteristics of *Pseudomonas* spp. causing grain discoloration and sheath rot of rice, and associated *Pseudomonas* epiphytes. **Plant Disease**, St. Paul, v. 74, p. 917-922, 1990.

ZEIGLER, R.S.; ÁLVAREZ, E. Grain discoloration of rice caused by *Pseudomonas glumae* in Latin America. **Plant Disease**, St. Paul, v. 73, p. 368, 1989.

ZHAO, W. J. et al. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in seeds using a specific TaqMan probe. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 35, n. 2, p. 119-127, 2007.

ZHOU, J.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 316-322, 1996.

ZHU, B. et al. Isolation and identification of *Burkholderia glumae* from symptomless rice seeds. **Rice Science**, Hangzhou, v. 15, p. 145-149, 2008.

8 APÊNDICE

APÊNDICE 1. Método de extração direta de patovares de *Xanthomonas oryzae* para sementes de arroz – International Rice Research Institute (IRRI), proposto por Vera Cruz *et al.* (2012).

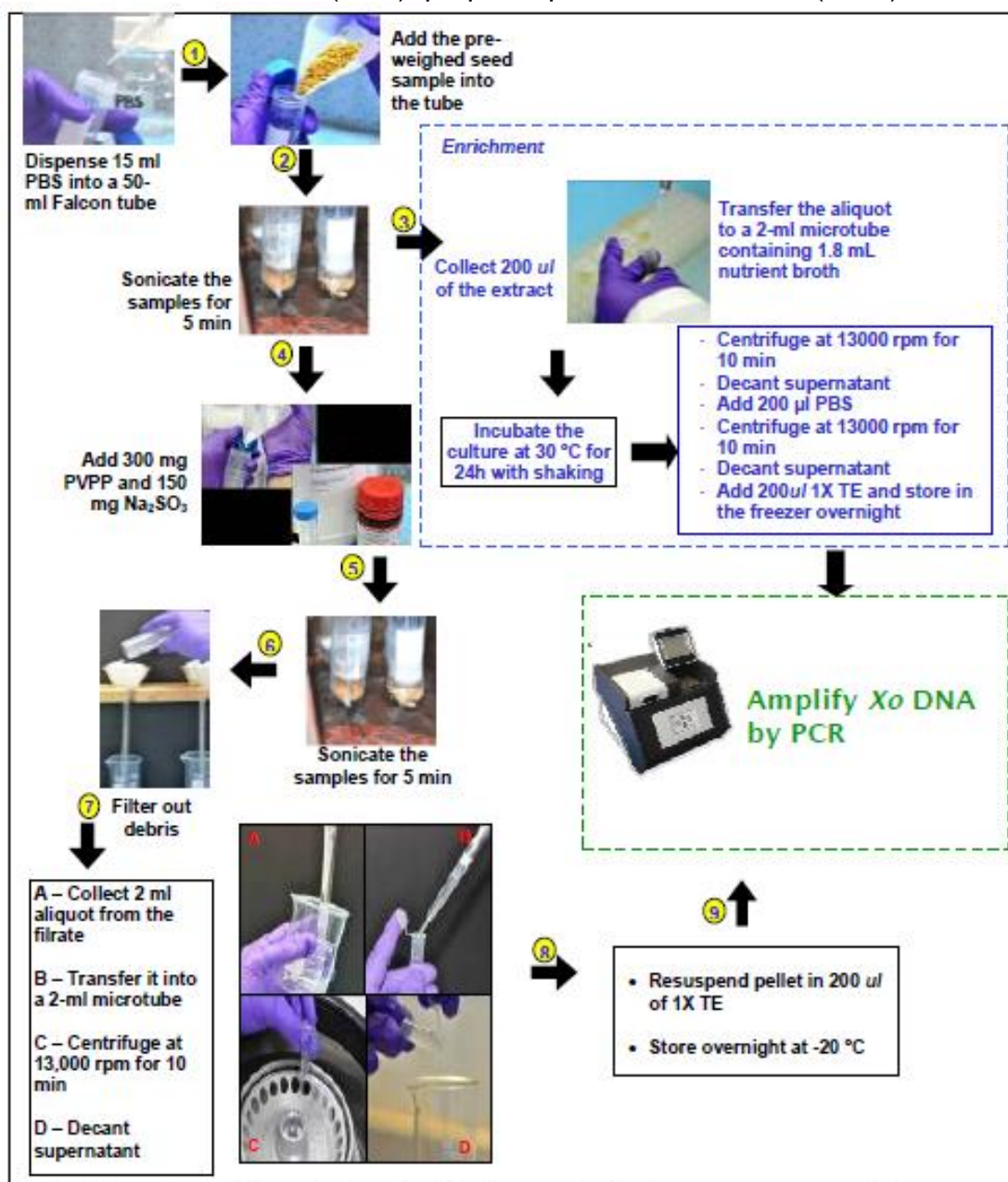


Fig. 2. Preparation of samples for the direct assay of *Xanthomonas oryzae* pathovars in rice seeds.