

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES
PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE *Fusarium*
oxysporum f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* E *Curtobacterium*
flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*

MAYTHSULENE INÁCIO DE SOUSA OLIVEIRA

Orientador:

Prof^a Dr. Murillo Lobo Junior

Maio - 2015

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

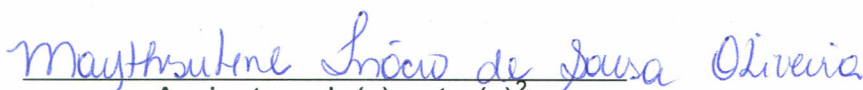
Nome completo do autor: Maythsulene Inácio de Sousa Oliveira

Título do trabalho: Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção simultânea de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 30 / 07 / 18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

MAYTHSULENE INÁCIO DE SOUSA OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS
MOLECULARES PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA
DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* E
Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitossanidade

Orientador(a)

Prof^a Dr. Murillo Lobo Junior

Co-orientador(a)

Dra^a. Adriane Wendland

Goiania, GO – Brasil
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Inácio de Sousa Oliveira, Maythsulene

Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção simultânea
de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* e
Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*. [manuscrito] /
Maythsulene Inácio de Sousa Oliveira. - 2015.

LXXVIII, 78 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Murillo Lobo Junior; co-orientador Dr. Adriane
Wendland.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Agronomia (EA) , Agronomia, Goiânia, 2015.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MAYTHSULENE INÁCIO DE SOUSA OLIVEIRA - Aos onze dias do mês de maio do ano de dois mil e quinze (11.05.2015), às 09h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Dr. Murillo Lobo Júnior - Orientador/Presidente, Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha, Dr^a. Adriane Wendland e Dr^a. Regina Sartori Coelho, para, em sessão pública realizada no auditório do PPGA da EA/UFG, procederem à avaliação da defesa de Dissertação intitulada: **"Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção simultânea de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*"**, de autoria de **Maythsulene Inácio de Sousa Oliveira**, discente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, na área de Concentração em **Fitossanidade**, em nível de **Mestrado**, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Dr. Murillo Lobo Júnior, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra a seguir, foi concedida a autora da Dissertação que, em 40 minutos apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a examinanda, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. De acordo com a Resolução nº 1051, de 09.09.2011 do CEPEC - Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura, que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Agronomia, e desde que procedidas às correções recomendadas, a dissertação será considerada **APROVADA** pela Banca Examinadora, estando integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM AGRONOMIA**, na área de concentração em **FITOSSANIDADE**, pela Universidade Federal de Goiás. A mestranda deverá efetuar as modificações sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar os exemplares da versão definitiva da Dissertação à secretaria do PPGA, no prazo máximo de trinta dias após a data da defesa. A conclusão do curso e a emissão do diploma dar-se-ão após o cumprimento do Artigo 69, § 1º e § 2º, da Resolução CEPEC nº 1051, de 09.09.2011. A Banca Examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científico(s), oriundo(s) dessa Dissertação, em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de efetuadas as modificações sugeridas. No caso da discente titulada não providenciar a publicação de seu trabalho final em forma de artigo(s) científico(s) no prazo de seis meses, após a data da defesa, serão aplicados os dispositivos do Artigo 70, § 1º e § 2º, da mesma Resolução. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12h00min a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, Welinton Barbosa Mota, Secretário do PPGA, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em quatro vias de igual teor.

Dr. Murillo Lobo Júnior
Presidente da Banca – Embrapa Arroz e Feijão

Prof. Dr. Marcos Gomes da Cunha
Membro – EA/UFG

Dr^a. Adriane Wendland
Membro – Embrapa Arroz e Feijão

Dr^a. Regina Sartori Coelho
Membro – MAPA/LANAGRO-GO

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus pelo dom da vida, pela família em que me permitiu nascer, e por ter me contemplado com a capacidade de me maravilhar com a natureza e suas criaturas. Sem Ele nenhum agradecimento faria sentido.

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela formação e realização do Mestrado.

À Embrapa Arroz e Feijão e Laboratório de Fitopatologia, pela oportunidade de desenvolvimento do projeto e auxílio financeiro, sou grata.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos para o mestrado.

À minha família e aos meus verdadeiros amigos, sempre. Sempre mesmo.

Aos meus pais, por me terem dado educação, valores e por terem me ensinado a andar. A vocês que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, partilho a alegria deste momento.

A todos os meus familiares, irmão, cunhada, primos, tios, sobrinhos. Não citarei nomes para não me esquecer de ninguém.

Aos meus orientadores, Dra. Adriane Wendland e Murillo Lobo Junior, agradeço pelos ensinamentos e incentivos. Pela paciência de me escutar de enxugar minhas lágrimas e de ouvir minhas inquietações, certamente não teria conseguido ordenar as ideias que borbulhavam na minha cabeça. A vocês, pela amizade e atenção, devo essa dissertação.

Aos irmãos que Deus colocou em minha vida e escolhi conviver: Fábio Gonçalves, Stella Cristina, Ana Paula Sena, Lidianne Lemes, Bárbara Estevan, Mytalli, Rejane, Lorena, Alaerson, Fernanda Yoshida, Alan Carlos, Priscila Ferreira, Jordene Aguiar, Bruna Alícia, Eugenio, e a tantos outros que passaram pelo Laboratório durante essa caminhada. Amor incondicional, sempre. A distância não nos separa. Seus corações estão comigo e o meu com vocês.

Aos funcionários do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Arroz e Feijão: Marcio, Ronair, Elder, Alécio, Livia, Anaíres e Mônica, pela torcida, amizade e contribuição direta e indireta para a realização deste trabalho.

Meu agradecimento mais profundo só poderia ser dedicado a uma pessoa: Meu esposo. O tempo todo ao meu lado, incondicionalmente. Nos momentos mais difíceis, que não foram raros, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta gratificante etapa. Por acumular muitas das minhas responsabilidades domésticas e compreender todos os meus momentos de dificuldades. Seu valioso e incansável apoio foi definitivo em todos os momentos deste trabalho. Este período nos mostrou a verdade sobre nosso relacionamento: Somos uma Família! Sou grata por cada gesto carinhoso e cada sorriso.

Com vocês, queridos, divido a alegria desta experiência.

Ao meu filho José Victor, com muito amor dedico.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	
	LISTA DE FIGURAS	
	RESUMO.....	
	ABSTRACT.....	
1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	FEIJOEIRO-COMUM.....	19
2.2	GÊNERO <i>Fusarium</i>	20
2.3	MURCHA OU AMARELECIMENTO DE FUSARIUM EM FEIJOEIRO-COMUM.....	21
2.4	PODRIDÃO-RADICULAR-SECA.....	23
2.5	MURCHA-DE-CURTOBACTERIUM.....	24
2.6	IMPORTÂNCIA DA DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM SEMENTES	25
2.7	DETECÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM SEMENTES	26
2.7.1	Testes convencionais de sanidade de sementes.....	26
2.7.2	Métodos moleculares	27
2.7.3	Reação em cadeia da polimerase	28
2.7.4	Multiplex PCR	30
2.7.5	Amplificação isotérmica do DNA (LAMP).....	31
2.7.5.1	Etapa não-cíclica.....	33
2.7.5.2	Etapa cíclica	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	AMOSTRAS.....	37
3.2	EXTRAÇÃO DO DNA	38
3.2.1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> e <i>Fusarium solani</i>	38
3.2.2	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	39
3.3	DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>Fusarium solani</i> , <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> e <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	39
3.3.1	Especificidade dos iniciadores de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> e <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	39
3.3.2	Padronização da concentração dos iniciadores para detecção de <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> ou <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> por PCR	41
3.3.3	Desenho dos iniciadores e especificidade dos iniciadores para detecção de <i>F. solani</i>	42
3.4	MULTIPLEX-PCR	43
3.4.1	Determinação da temperatura ótima de anelamento	43

3.4.2	Padronização e concentração dos iniciadores para detecção de <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> e <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> por Multiplex-PCR.....	44
3.4.3	Multiplex-PCR direto das sementes.....	44
3.5	AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA DO DNA PARA DETECÇÃO DE <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>.....	45
3.5.1	Desenho de iniciadores para LAMP.....	45
3.5.2	Especificidade dos iniciadores externos F3/B3 por meio da PCR convencional.....	48
3.5.3	Otimização das reações de LAMP.....	48
3.5.4	Visualização dos produtos de amplificação de PCR convencional, Multiplex-PCR e LAMP.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	EXTRAÇÃO DO DNA	51
4.2	DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>Fusarium solani</i>, <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> e <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	51
4.2.1	Especificidade dos iniciadores de <i>F.oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> e <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	51
4.2.2	Padronização da concentração dos iniciadores para detecção de por PCR convencional	52
4.2.3	Desenho dos iniciadores e especificidade dos iniciadores para detecção de <i>F. solani</i>.....	53
4.3	MULTIPLEX-PCR.....	54
4.3.1	Determinação da temperatura ótima de anelamento.....	55
4.3.2	Padronização da concentração dos iniciadores para detecção de <i>F. solani</i>, <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> e <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>phaseoli</i> ...	56
4.3.3	Multiplex-PCR direto das sementes	57
4.4	LAMP - LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION PARA DETECÇÃO DE <i>F. oxysporum</i> f. sp <i>phaseoli</i>	60
4.4.1	Especificidade dos iniciadores externos F3/B por PCR convencional.....	60
4.4.2	Otimização das reações de LAMP	61
5	CONCLUSÕES	66
6	REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Relação de isolados utilizados no estudo para o desenvolvimento da multiplex-PCR e amplificação isotérmica do DNA (LAMP).....	37
Tabela 2.	Iniciadores utilizados para realização da PCR e multiplex-PCR de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> e <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	40
Tabela 3.	Componentes da reação utilizada para determinar especificidade dos iniciadores de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> e <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	40
Tabela 4.	Componentes e respectivas concentrações avaliados para determinar a concentração ótima de cada conjunto de iniciadores para detecção de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> e <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	41
Tabela 5.	Iniciadores projetados para detecção de <i>F. solani</i> por PCR e multiplex-PCR.....	42
Tabela 6.	Componentes da reação utilizada para verificar a especificidade de cada conjunto de iniciadores para detecção de <i>F. solani</i>	43
Tabela 7.	Componentes da reação utilizada para determinar a temperatura de anelamento dos iniciadores para detecção simultânea de <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	43
Tabela 8.	Componentes da reação utilizada para determinar a concentração final de cada conjunto de iniciadores para detecção simultânea de <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> e <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	44
Tabela 9.	Amostras de sementes de feijão-comum utilizadas para testes de sanidade e extração do DNA total das sementes.....	45
Tabela 10.	Conjuntos de iniciadores utilizados para LAMP baseado no gene <i>ftf1</i>	47
Tabela 11.	Resultados das análises de sanidade de sementes de feijoeiro-comum com os testes blotter e rolo de papel, mostrando a porcentagem (%) de sementes com <i>Fusarium</i> spp.....	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática e parâmetros a serem considerados no desenho dos quatro iniciadores (F3, FIP, B3 e BIP) para LAMP e suas respectivas regiões de anelamento. Note que: FIP é constituído por dois iniciadores, F1C e F2, separados por quatro timinas; BIP é constituído por dois iniciadores B1C e B2, separados por quatro timinas (Eiken Chemical, 2000) 33
- Figura 2.** Representação esquemática da etapa não cíclica da amplificação por LAMP (passo de 1 a 7) com a geração da estrutura básica em forma de halteres (Eiken Chemical, 2000) 34
- Figura 3.** Representação esquemática da etapa cíclica da amplificação por LAMP (passos de 8 a 9). Amplificação exponencial da estrutura básica do LAMP (Eiken Chemical, 2000) 35
- Figura 4.** Sequência ilustrativa da região alvo do gene *Fusarium oxysporum* zinc finger transcription factor 1 (*ftf1*) com o número de acesso DQ280313 na base de dados NCBI-GenBank) 46
- Figura 5.** Padrão de peso molecular 100 bp DNA Ladder visualizado por coloração com brometo de etídeo em gel de agarose 1,5% TBE. Os valores de massa são para 0,5 ng/linha)..... 49
- Figura 6.** Produtos da PCR visualizados em gel de agarose 1,5%, TBE 1,0X corado com brometo de etídeo, sob luz UV. (A) PCR de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Colunas: 1 - controle negativo e 2 - isolado referência (BRM14991) e (B) PCR de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Colunas: 1 - controle negativo e 2 - isolado referência (BRM14946)..... 52

Figura 7. Produtos da PCR visualizados em gel de agarose 1,5%, TBE 1,0X corado com brometo de etídeo, sob luz UV. A) PCR de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* com os iniciadores A280/B310. Colunas: 1, 3, 5, 7, 9 - controles negativos e 2, 4, 6, 8, 10 - isolado referência (BRM14991) (609pb). B) PCR de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* com os iniciadores FOR2/REV4. Colunas: 1, 3, 5, 7, 9 - controles negativos e 2, 4, 6, 8, 10 - isolado referência *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (BRM14946) (306pb))...... 53

Figura 8. Produtos da PCR para verificar a especificidade dos iniciadores de *F. solani* visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídeo, sob luz UV. A) IGS1, B) IGS3 e C) IGS4. Colunas: 1 - *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (controle negativo), 2 - *F. solani*., 3 - *F. solani*., 4 - *F. solani*, 5 - *F. solani* f. sp. *phaseoli* e 6 - *F. solani* f. sp. *phaseoli*..... 54

Figura 9. Produtos da m-PCR obtidos com os iniciadores FOR2/REV4 para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (306 pares de base) e A280/B310 para *F. oxysporum* pv. *phaseoli* (609 pares de base), visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, sob luz UV. A - Colunas: 1 - controle da reação (água); 2 - controle negativo (*Fusarium* spp.) 3 - *Fus*, *Cff*; 4 - *Cff*, 5 - *Fop*; 6 - *Fus/Cff/Fop* (temperaturas de anelamento 55°C e 56,5°C, respectivamente). B - Colunas: 1 - controle da reação (água); 2 - controle negativo (*Fusarium* spp.) 3 - *Fus*, *Cff*; 4 - *Cff*, 5 - *Fop*; 6 - *Fus/Cff/Fop* (temperaturas de anelamento 57,6 °C e 60 °C, respectivamente) 55

- Figura 10.** Produtos da multiplex-PCR obtidos com os iniciadores FOR2/REV4 para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (306 pares de base) e A280/B310 para *F. oxysporum* pv. *phaseoli* (609 pares de base), visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, sob luz UV. Colunas: 1 - controle negativo; 2 - *Cff*; 3 - *Fop*; 4 - *Cff/Fop* (concentração 0,2 µM); 5 - controle negativo; 6 - *Cff*; 7 - *Fop*; 8 - *Cff/Fop* (concentração 0,4 µM); 9 - controle negativo; 10 - *Cff*; 11 - *Fop*; 12 - *Cff/Fop* (concentração 0,6 µM); 13 - controle negativo; 14 - *Cff*; 15 - *Fop*; 16 - *Cff/Fop* (concentração 0,8 µM); 17 - controle negativo; 18 - *Cff*; 19 - *Fop*; 20 - *Cff/Fop* (concentração 1,0 µM)..... 56
- Figura 11.** Produtos da m-PCR obtidos com os iniciadores FOR2/REV4 para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (306 pares de base), A280/B310 para *F. oxysporum* pv. *phaseoli* (609 pares de base) e IG1For/IGS1Rev para *Fusarium solani* (143pb) visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, sob luz UV. Colunas: 1 – *Fusarium solani*; 2 - *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, 3 - *F. oxysporum* pv. *phaseoli*, 4 - *F. oxysporum* pv. *phaseoli*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *Fusarium solani*, respectivamente e 5 – Controle negativo 57
- Figura 12.** Produtos da m-PCR utilizando extrato bruto das sementes obtidos pelo método extração alcalina. Colunas: C - controle positivo *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; 2 - controle positivo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Linhas 1 a 30 amostras de sementes, respectivamente 59

- Figura 13.** Produtos da PCR obtidos com os iniciadores externos F3/B3, visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, sob luz UV. Colunas: 1 - LAMP1, 2 - LAMP2, 3 - LAMP3, 4 - LAMP4, 5 - LAMP5, 6 - LAMP6, 7 - LAMP7, 8 - LAMP8, 9 - LAMP9, 10 - LAMP10, 11 - LAMP11, 12 - LAMP12, 13 - LAMP13, 14 - LAMP14, 15 - LAMP15, 16 - LAMP16, 17 - LAMP17, 18 - LAMP18, 19 - LAMP19 e 20 controle negativo, respectivamente..... 61
- Figura 14.** Produtos de LAMP obtidos correspondentes a reações LAMP utilizando 17 conjuntos de iniciadores LAMP, nas condições propostas por Notomi (2000). Colunas 1 - LAMP1, 2 - LAMP2, 3 - LAMP3, 4 - LAMP4, 5 - LAMP6, 6 - LAMP7, 7 - LAMP8, 8 - LAMP9, 9 - LAMP10, 10 - LAMP11, 11 - LAMP13, 12 - LAMP14, 13 - LAMP15, 14 - LAMP16, 15 - LAMP17, 16 - LAMP18, 17 - LAMP19 e 18 - controle negativo..... 61
- Figura 15.** Detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* por LAMP baseados nas diferentes concentrações de iniciadores internos e MgCl₂. A) Conjunto de iniciadores nº 13 descrito na Tabela 10, colunas: 1 - controle negativo; 2 - LAMP e 3 - LAMP com produtos de PCR amplificados com os iniciadores internos na concentração de 1,6 µM com MgCl₂ nas reações. Colunas: 5 - Controle negativo; 6 - LAMP e 7 - LAMP com produtos amplificados com os iniciadores externos, na concentração de 1,6 µM sem MgCl₂ nas reações. B) Conjunto nº 15, colunas: 1 - controle negativo; 2 - LAMP e 3 - LAMP com produtos de PCR amplificados com os iniciadores internos na concentração de 2,4 µM com MgCl₂ nas reações. Colunas: 5 - Controle negativo; 6 - LAMP e 7 - LAMP com produtos amplificados com os iniciadores externos na concentração de 2,4 µM sem MgCl₂ nas reações..... 62

Figura 16. Produtos de LAMP utilizando o conjunto de iniciadores LAMP 13 e 15. Colunas: 1, 2 - controles negativos; 3 - LAMP1, 4 - LAMP2, 5 - LAMP3, 6 - LAMP4, 7 - LAMP6, 8 - LAMP7, 9 - LAMP8, 10 - LAMP9, 11 - LAMP10, 12 - LAMP11, 13 - LAMP13, 14 - LAMP14, 15 - LAMP15, 16 - LAMP16, 17 - LAMP17, 18 - LAMP18, 19 - LAMP19, 20 - LAMP 20..... 64

RESUMO

OLIVEIRA, M.I.S. **Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção simultânea de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)– Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.^{1,2}

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado durante todo o ano no território brasileiro, em três épocas distintas e em vários agroecossistemas. Nestes ambientes distintos, a cultura está exposta a diversos fatores que causam perdas de rendimento, como o ataque de patógenos. Dentre as doenças do feijoeiro-comum encontram-se a murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*), a podridão-radicular-seca (*Fusarium solani*) e a murcha-de-curtobacterium (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) que apresentam sintomas semelhantes, dificultando seu diagnóstico no campo, e cuja identificação em testes de sanidade de sementes também é limitada. Em ambos os casos, a identificação em nível de espécie é uma importante etapa do manejo deste complexo de patógenos, cuja detecção pode ser aperfeiçoada com a adoção de ferramentas de biologia molecular. Portanto, este estudo teve como objetivos: 1) Desenvolver e validar um método de multiplex PCR (m-PCR) para identificação simultânea de três espécies de patógenos do feijoeiro-comum, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *F. solani* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; e 2) desenvolver a técnica de amplificação isotérmica de DNA (LAMP) para detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes. O método de m-PCR foi desenvolvido para identificação de colônias isoladas bem como sementes infectadas. Nas sementes, o DNA total foi obtido pela lise alcalina, método que inativa nucleases durante o processo de extração. A m-PCR possibilitou a identificação de todos os patógenos, com detecção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *F. solani* em bandas formadas em gel de agarose respectivamente com 306, 609 e 143 pares de base. Além disso, a extração do DNA total das sementes pela lise alcalina em combinação com a m-PCR também possibilitou redução de custos e tempo de realização do diagnóstico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, de 10 dias para três horas. Não foi possível estabelecer um protocolo otimizado para detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* pelo método LAMP, utilizando somente o gene *tf1* para desenho dos iniciadores, uma vez que, os iniciadores revelaram-se funcionais apenas para a amplificação com grandes quantidades de DNA alvo. Diante dos resultados obtidos com LAMP, sugere-se que estudos posteriores sejam realizados empregando outras sequências de DNA disponíveis no banco de dados GenBank.

Palavras-chave: Amplificação isotérmica do DNA, multiplex-PCR, *Phaseolus vulgaris* L., murcha-de-fusarium, podridão-radicular-seca, murcha-de-curtobacterium.

¹Orientador: Dr. Murillo Lobo Junior

ABSTRACT

OLIVEIRA, M.I.S. **Development of molecular methods for simultaneous detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***. 2015. 78 f. Dissertation (Master in Agronomy:)- School of Agronomy, Federal University of Goiás, Goiânia, 2015.^{1,2}

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is grown in Brazil in three different cropping seasons, and in diverse agroecosystems. In such different environments, the crop is exposed to several constraints responsible for yield losses, such as pathogenic organisms. Among common bean relevant diseases, fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*), dry root-rot (*Fusarium solani*) and Curtobacterium wilt (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) have similar symptoms, hindering diagnosis in the field, and whose identification in seed health testing is also limited. In both cases, identification at species level is an important step to manage this root pathogen complex, whose detection can be improved by molecular biology tools. Therefore, this study aimed to: 1) to develop and validate a multiplex PCR (m-PCR) method for simultaneous identification of three common bean pathogens, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *F. solani* and *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; and 2) develop an isothermal amplification of DNA (LAMP) method to detect of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* on seeds. M-PCR method was developed for identification of isolated colonies, as well as infected seeds. In seeds, total DNA was obtained by alkaline lysis method, which inactivates nucleases during the extraction process. M-PCR allowed the identification of all pathogens, with detection of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* and *F. solani* amplicons in agarose gel with respectively 306, 609 and 143 base pairs. Furthermore, m-PCR also reduced costs and time to detect *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* from 10 days to three hours. It was not possible to develop an optimized protocol for detection of *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* by the LAMP method, using only the *tf1* gene for design of primers, since such primers were functional only for amplifying large amounts of target DNA. Based on the negative results with LAMP, it is suggested that further studies should be performed using other DNA sequences available in GenBank database.

Key words: DNA isothermal amplification, multiplex-PCR, *Phaseolus vulgaris* L., fusarium wilt, root rot dry, wilt bacterial wilt.

¹Adivaser: Dr. Murillo Lobo Junior

²Co-Adivaser: Dra. Adriane Wendland

1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta grande importância socioeconômica tanto em nível mundial quanto nacional, pois constitui uma importante fonte de proteínas, ferro e carboidratos para milhões de consumidores. O Brasil é o maior produtor mundial de feijão-comum, com produção estimada em 3,3 milhões de toneladas, obtidas em uma área total de 3,1 mil hectares na safra 2013/2014. Os principais estados produtores do grão são Paraná, Minas Gerais, São Paulo e Goiás, que contribuem com 68% da produção nacional, sendo o Paraná o maior produtor, com 23% deste total (Conab, 2014).

Conforme Sartorato (2006), esta cultura está sujeita a perdas na sua produção por ser cultivada durante todo o ano, em diferentes ambientes, o que faz com que inúmeros fatores tornem-se limitantes para a sua produção. Dentre os mais importantes fatores responsáveis pela baixa produtividade estão as doenças, causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides.

Citam-se mais de 45 enfermidades em feijoeiro-comum, em suas maiores transmitidas por meio das sementes. As doenças causadas por fungos habitantes do solo estão entre as principais causadoras da baixa produtividade da cultura (Menezes et al., 2004). Dentre estas se destacam a murcha-de-fusarium e a podridão-radicular-seca, causadas respectivamente pelos fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Fusarium solani*. Dentre os patógenos de origem bacteriana, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* também merece destaque, devido à similaridade de sintomas com a murcha-de-fusarium e danos que provoca nesta cultura. Eventualmente, pode-se também confundir as colônias amarelas de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* com as de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, o que dificulta o correto diagnóstico da doença, importante etapa para o manejo (Hedges, 1926; Wendland et al., 2012).

As perdas ocasionadas por estas doenças variam de acordo com a cultivar utilizada, o nível de infestação do solo, as propriedades, características físico-químicas e

biológicas do solo e as condições ambientais. No Brasil têm sido relatadas perdas de 80% a 100% de produtividade, devido principalmente, às dificuldades de manejo da doença em cultivares suscetíveis e à ocorrência cada vez mais frequente nas áreas produtoras (Costa et al., 1993).

Como se tratam de doenças cujos patógenos podem ser transmitidos pelas sementes, recomenda-se o uso de sementes sadias (principalmente certificadas) e cultivares resistentes para a obtenção de bons rendimentos (Rava et al., 2006). Desta forma, a detecção e a identificação de fitopatógenos em lotes de sementes é uma das estratégias mais importantes para a adoção de medidas preventivas no manejo de doenças no feijoeiro, para evitar a introdução e a propagação de patógenos em novas áreas de cultivo (Silva et al., 2007).

Os métodos rotineiros de patologia de sementes, como papel de filtro, plaqueamento em ágar e/ou em meios seletivos e confirmação bioquímica de isolados, requerem até 10 dias para serem concluídos. Avanços no campo da biologia molecular têm gerado novas técnicas para o diagnóstico de doenças de plantas mediante a detecção de sequências nucleotídicas específicas dos microrganismos. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) (Mullis & Faloona, 1987) permite a utilização de sequências específicas do genoma microbiano como marcadores genéticos em nível de gênero, espécie, bem como de subespécie, podendo ser utilizado como uma alternativa viável aos métodos morfológicos e bioquímicos tradicionalmente utilizados.

Várias modificações da PCR foram descritas nas ultimas décadas para detecção, identificação e quantificação de fitopatógenos em sementes, e dentre essas, destacam-se a multiplex PCR (m-PCR), PCR quantitativo em tempo real (qPCR) e a amplificação isotérmica do DNA (LAMP) (Farber, 2001; Silva et al., 2013; Sousa et al., 2014; Notomi et al., 2015). A m-PCR é caracterizada pela utilização de dois ou mais pares de iniciadores na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de pelo menos duas sequências distintas de DNA. Assim, mais de uma espécie de microrganismo pode ser identificada na mesma reação, promovendo diagnóstico mais amplo, mais rápido e de menor custo. Apesar das suas grandes potencialidades, a m-PCR ainda requer recursos humanos qualificados, bem como materiais e equipamentos sofisticados, nomeadamente termocicladores, limitando a sua aplicação no campo e em laboratórios menos equipados (Gill & Ghaemi, 2008).

Por outro lado, a amplificação isotérmica do DNA (LAMP) caracteriza-se por amplificar sequências específicas de DNA com alta especificidade em única temperatura, o que proporciona menor custo analítico (Notomi et al., 2000). A LAMP tem o potencial de combinar a alta sensibilidade de um teste molecular, com a possibilidade de realização das análises em laboratórios onde poucos recursos técnicos e materiais são disponíveis. A utilização desta tecnologia tem sido relatada para detecção de espécies de *Fusarium* em trigo, pera, maçã e tomate (Niessen & Vogel, 2010; Temple & Johnson, 2011; Almasi et al., 2013), mas não há relatos da aplicação desta técnica para detecção e identificação de patógenos causadores de doenças no feijoeiro-comum.

Diante do exposto, desenvolveu-se este estudo com os seguintes objetivos: 1) Desenvolver um método de multiplex PCR (m-PCR) para identificação simultânea de três espécies de patógenos do feijoeiro-comum, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *F. solani* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; e 2) desenvolver a técnica de amplificação isotérmica de DNA (LAMP) para detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FEIJOEIRO-COMUM

O gênero *Phaseolus* possui cerca de 55 espécies, das quais quatro são as mais cultivadas: *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman. Entre elas, o feijoeiro-comum (*P. vulgaris*) é a espécie mais cultivada do gênero, e a mais importante, por ser a espécie cultivada mais antiga e utilizada. O feijoeiro-comum possui ciclo variando de 60 a 110 dias. Na classificação dos hábitos de crescimento do feijão, um dos caracteres mais importantes é o hábito de florescimento das plantas que pode ser determinado ou indeterminado. O hábito de crescimento determinado caracteriza-se por ter o caule e os ramos laterais terminando em uma inflorescência (inflorescência terminal) e possuir número limitado de nós; a floração inicia-se do ápice para a base da planta. O hábito indeterminado é caracterizado por possuir caule principal com a célula de desenvolvimento vegetativo que permite um crescimento contínuo, numa sucessão de nós e entrenós; as inflorescências são axilares, isto é, desenvolvem-se nas axilas das folhas, e a floração inicia-se da base para o ápice da planta (Debouck, 1993; Carneiro et al., 2015).

O cultivo dessa leguminosa é bastante difundido em todo o território nacional, no sistema solteiro ou consorciado. O feijão-comum apresenta ampla adaptação edafoclimática, o que permite seu cultivo durante todo o ano, em todos os estados brasileiros, nas diferentes épocas em três safras distintas. A safra das "águas" ou primeira safra é plantada nas regiões Sul, Sudeste, e Centro-Oeste, sendo semeada entre os meses de agosto a dezembro. A safra da "seca" ou segunda safra ocorre na região Sul, em maior parte, seguida do Centro-Oeste e dos estados da Região Nordeste. Essa safra é realizada entre os meses de janeiro a abril. Já a safra de terceira época, também designada como safra irrigada, de inverno ou simplesmente terceira safra, acontece com o feijão-comum cultivado entre os meses de maio a julho, nas regiões Centro-Oeste e Sudeste e nos estados do Paraná e Bahia (Carneiro et al., 2015). Além disso, o feijoeiro-comum é cultivado por

diversas classes de agricultores, desde os que praticam agricultura de subsistência em pequenas propriedades, com pouco uso de tecnologia, até os empresários agrícolas, com a utilização de tecnologias avançadas, incluindo plantio, irrigação, controle fitossanitário e colheita mecanizada (Debouck, 1993; Yokoyama et al., 1996; Yokoyama, 2003; Borém & Caixeta, 2006).

O feijoeiro-comum é uma espécie com pouca tolerância a estresses hídricos severos, sendo que 60% da produção mundial estão submetidas a esta variável, tornando a seca o segundo maior redutor da produtividade, a qual é superada apenas pela ocorrência de doenças (White, 1993). A utilização de técnicas como a irrigação reduz ou acaba com os riscos de déficit hídrico, contribuindo para a obtenção de altos rendimentos, porém favorece a disseminação de doenças que não eram consideradas de risco para a cultura. Entre estas, destacam-se doenças causadas por fungos, bactérias e nematoides, causadores de murchas vasculares e podridões no sistema radicular.

2.2 GÊNERO *Fusarium*

Os fungos do gênero *Fusarium* têm uma ampla distribuição geográfica, tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes. Estas espécies podem ser fitopatogênicas e saprófitas do solo (Duggal et al., 1997; Leslie et al., 2001; Sanabria et al., 2002). As espécies do gênero *Fusarium* possuem classificação baseada nas suas características morfológicas e moleculares. As principais características morfológicas consideradas para designar espécies dos isolados microscopicamente são: formação de mono ou poli fiálides, presença de clamidósporos, formato e dimensões de macro e microconídios. A morfologia das colônias também pode ser considerada, conforme a presença de micélio aéreo contonoso, com uma cor variável do branco ao rosa, roxa ou violeta sobre a superfície do meio de cultura, e micélio com pouca ou nenhuma formação de micélio aéreo. (Kendrick & Snyder, 1942; Desjardins et al., 2000; Leslie et al., 2001; Zemankova & Lebeda, 2001; Godoy & Colombo, 2004; Gandra, 2006).

As duas principais formas de conídios de *Fusarium* são os microconídeos e macroconídeos. Os microconídios são unicelulares e uninucleados, ligeiramente curvos, e em geral são os mais abundantes e frequentemente produzidos pelo fungo em todas as condições, inclusive no interior do sistema vascular das plantas infectadas. Os macroconídios apresentam-se em forma de lua, bi ou trisseptados, são multicelulares,

apresentando em cada célula somente um núcleo (Agrios, 2005). Todos os núcleos do macroconídio são descendentes mitóticos de um mesmo núcleo progenitor e são, portanto geneticamente idênticos (Puhalla, 1981).

Algumas espécies de *Fusarium* são primariamente organismos que causam decomposição e estão associadas com podridões em órgãos de reserva de vários vegetais (*F. moniliforme*, podridão da cana-de-açúcar); outras espécies são invasoras do tecido cortical, causando “damping off” ou tombamento (*Fusarium* spp., em cebola, eucalipto, fumo e tomate); podridões de raízes e da coroa e cancos em caules (*F. solani* f. sp. *phaseoli*, em feijoeiro-comum) e outras são parasitas vasculares altamente específicos (Snyder & Hansen, 1953; Bianchini et al., 1997; Leslie & Summerell, 2006). Além disso, algumas espécies de *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. graminearum* e *F. proliferatum*) proliferam-se em grãos produzindo micotoxinas como, zearalenona, fumonisinas e tricotecenos, representando ameaça à saúde da população e de animais, podendo causar câncer de esôfago, danos neurológicos e outros, em quem consome esses vegetais contaminados. Estas micotoxinas são produzidas antes ou logo após a colheita, quando armazenadas em condições inadequadas (Nelson et al., 1994; Moss, 2002; Leal et al., 2005; Leslie & Summerell, 2006; Hirooka et al., 2007)

As espécies de *Fusarium* que causam murchas vasculares e podridões radiculares conhecidas como *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* são na verdade um complexo de fungos habitantes do solo, compostos por patótipos classificados em várias *formae specialis* (Alexopoulos et al., 1996), com base em critério patogênico. O conceito *formae specialis* foi descrito por Snyder & Hansen (1953), para reconhecer isolados patogênicos que foram morfológicamente idênticos a isolados saprofíticos de mesma espécie, mas que se diferenciam pela sua capacidade de parasitar hospedeiros específicos. Os isolados patogênicos de *F. oxysporum* estão classificados dentro de mais de 120 *formae specialis*. Em *F. solani*, por sua vez, mais de vinte *formae specialis* são conhecidas (Alexopoulos et al., 1996; Kistler, 1997; Agrios, 2004).

2.3 MURCHA OU AMARELECIMENTO DE FUSARIUM EM FEIJOEIRO-COMUM

A murcha ou amarelecimento de *Fusarium* é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder. O patógeno encontra-se

disseminado em praticamente todo território nacional, e sua importância tem aumentado principalmente em áreas onde esta leguminosa é cultivada sob condições de temperaturas amenas, alta umidade do solo e rotações curtas. O fungo é conhecido por sobreviver em restos culturais ou na forma de estruturas de resistência, os clamidósporos.

O fungo foi primeiramente descrito no Vale do Sacramento, na Califórnia (EUA) por Harter (1929), tendo reaparecido na mesma área em 1933 e 1940, quando cultivado o feijoeiro-comum novamente (Kendrick & Snyder, 1942). Em 1987 e 1989 a presença da doença foi relatada no estado do Colorado (EUA) (Silbernagel & Schwartz, 1988; Schwartz et al., 1989).

No Brasil, o primeiro relato da doença foi realizado na região de Laranjal Paulista, no estado de São Paulo, no ano de 1966 (Cardoso et al., 1966). Em Minas Gerais, a doença foi inicialmente identificada no município de Mercês, na Zona de Mata, no ano de 1983. Nos municípios de Alto do Rio Doce, Viçosa e Coimbra, a doença também foi identificada, porém, não causou grandes perdas (Zambolim et al., 1987).

Os sintomas iniciais da murcha-de-fusarium são caracterizados pela perda de turgescência das plantas nas horas mais quentes do dia e reversão dos sintomas durante a noite. Posteriormente, com o desenvolvimento da doença, estes sintomas se tornam irreversíveis. Plantas jovens, quando infectadas por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, podem murchar e morrer após o aparecimento dos sintomas. Em plantas mais velhas ocorre o clareamento de nervuras e epinastia das folhas, muitas vezes seguido por nanismo, amarelecimento das folhas mais baixas, formação de raízes adventícias, murcha de folhas e caules jovens, desfolha, necrose marginal das folhas restantes e, finalmente, a morte de toda a planta (Cardoso et al., 1966; Bianchini et al., 1997; Agrios, 2004; Fernandes et al., 2010). Os sintomas geralmente são mais evidentes durante o período entre o florescimento e a maturação dos frutos (Jones & Miller., 1982; Smith & Seddon, 1998).

A disseminação de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* ocorre principalmente por sementes contaminadas, vento, água de irrigação e enxurradas e pelo solo aderido aos equipamentos agrícolas. Já a infecção das plantas ocorre na presença de ferimentos naturais ou artificiais. O aumento da doença nas áreas de produção com a disseminação do patógeno por meio das sementes contaminadas é agravado pela dificuldade de identificação dos sintomas no campo, uma vez que, podem ser confundidos no campo com a murcha-de-curtobacterium (Maringoni & Rosa, 1997a). Além disso, a transmissão do patógeno via sementes pode provocar redução, tanto na germinação quanto no vigor das

plântulas (Bianchini et al., 1997; Fernandes et al., 2010). Várias medidas de controle são recomendadas para manejo da doença, como a rotação de culturas, sendo aconselhável a utilização de cultivares resistentes, e uso de sementes sadias (Bianchini et al., 1997; Agrios, 2004).

Constantemente, sementes infectadas ou infestadas por patógenos originam focos primários de infecção, portanto o uso de sementes com excelente qualidade sanitária é uma das principais medidas de controle das doenças (Machado et al., 2001). Entretanto, o diagnóstico da doença e identificação do patógeno por métodos tradicionais, que envolvem o isolamento e caracterização do patógeno por meio de testes de inoculação é demorado, e exige trabalho intensivo. O problema é agravado pela ocorrência de *formae specialis* saprófitas de *F. oxysporum* sobre o feijoeiro-comum, que são morfologicamente idênticas ao *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* no entanto são invasores oportunistas não patogênicas. Métodos de diagnóstico baseados na amplificação de sequências de ácidos nucleicos específicos podem ser especialmente úteis neste caso, pois apresentam alta sensibilidade analítica de discriminar as diferentes *formae specialis* de *F. oxysporum* (Knoll et al., 2002; Angelloti et al., 2005).

2.4 PODRIDÃO-RADICULAR-SECA

A podridão-radicular-seca, causada por *Fusarium solani* foi descrita pela primeira vez em 1916 por Burkholder no oeste de Nova York, com registro de perdas que chegaram a 90%. Desde então, a ocorrência da podridão-radicular-seca tem sido relatada em diversos países, como, Brasil, Colômbia, Peru, Equador, Chile, Venezuela, Costa Rica e México (Abawi, 1989).

Os sintomas iniciais compreendem pequenas lesões avermelhadas no hipocótilo e raiz primária de plantas jovens. Com o desenvolvimento da doença, as lesões coalescem e gradualmente tornam-se marrons, sem margens definidas, surgindo fissuras longitudinais necróticas nas lesões mais velhas. As raízes secundárias são geralmente destruídas, podendo haver o desenvolvimento de raízes adventícias acima da área lesionada. Quando a planta consegue desenvolver novas raízes, a produtividade é pouco afetada. No entanto, quando o crescimento das raízes é limitado, o patógeno pode destruir todo o sistema radicular. O resultado é um estande irregular, formado por plantas subdesenvolvidas, com folhas prematuramente senescentes. Plantas severamente afetadas são facilmente retiradas do solo (Bianchini et al., 1997)

O fungo pode ser disseminado pelo vento, água e implementos agrícolas, transportando partículas de solo e restos de culturas infestados. Sementes contaminadas fazem a disseminação do patógeno a longas distâncias. As condições favoráveis para o seu desenvolvimento são temperaturas entre 22°C a 28°C e alta umidade, entretanto ocorrência de períodos de seca também prejudica a planta que está com o sistema radicular danificado, causando maior redução na produção (Bianchini et al., 1997)

As medidas iniciais de manejo devem-se basear na exclusão do patógeno, com a prevenção de sua entrada em áreas ainda não infestadas. A utilização de sementes de feijão isentas de *F. solani* é medida importante para evitar a entrada do patógeno na área de plantio. No entanto, essa medida não impede a infecção das plântulas pelo inóculo presente no solo. Por isso, em áreas infestadas as sementes devem receber tratamento químico de forma que as plântulas sejam protegidas pelo menos na fase inicial de desenvolvimento (Forsyth, 1990; Fravel, 2005).

2.5 MURCHA-DE-CURTOBACTERIUM

A murcha-de-curtobacterium, causada pela bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foi descrita pela primeira vez por Hedges (1922) no Estado de Dakota do Sul (EUA). Posteriormente, foi relatada nos Estados de Michigan, Virgínia, Maryland, Montana, no Distrito de Colúmbia, Connecticut, Iowa, Idaho, Montana, Nebraska, Ohio, Oregon e Wisconsin (Hedges, 1926). No Brasil, a murcha-de-curtobacterium foi relatada pela primeira vez em 1995 (Maringoni & Rosa, 1997b) durante a safra das águas, no Estado de São Paulo. Atualmente esta doença está presente em diferentes estados brasileiros: Paraná, Santa Catarina, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (Leite Jr. et al., 2002; Uesugi et al., 2003; Deuner et al., 2006; Theodoro et al., 2010).

Esse patógeno pertencente ao Filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales e família Microbacteriaceae. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* é uma bactéria aeróbica, gram positiva, que possui um ou mais flagelos polares ou subpolares. Suas células apresentam-se na forma de bastonetes retos ou levemente curvados, podendo eventualmente apresentar forma individual ou arranjada em forma de V, Y ou em paralelo. As colônias são brilhantes, circulares, de bordos lisos, sem viscosidade, semifluida. Podem apresentar coloração amarela, laranja ou rosa com

tamanhos de um a quatro mm de diâmetro, após 48 horas de cultivo em meio ágar-nutriente, e desenvolvem-se bem em temperaturas ótimas de 24 à 28°C (Bradbury, 1986).

A colonização de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no sistema vascular da planta promove falha no transporte de seiva, deixando o caule internamente escurecido, além de sintomas de amarelecimento e flacidez da área foliar, com posterior murcha. As folhas podem voltar à turgescência normal durante os períodos de alta umidade e baixa temperatura. Pode ocorrer também a redução do tamanho das plantas e consequente morte do feijoeiro, quando o nível de infecção da bactéria é elevado (Saettler, 1991; Wendland et al., 2012). Em sementes, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* fica alojada nas células paliçádicas e penetra no sistema vascular das sementes em desenvolvimento, através do hilo, e forma uma massa de células bacterianas no tegumento. Durante a germinação ocorre a infecção da plântula, por ferimentos da radícula gerados pelo atrito com o tegumento (Schuster & Smith, 1983; Chavarro et al., 1985).

A principal forma de transmissão da bactéria ocorre através de sementes contaminadas, as quais podem estar infectadas internamente ou apenas infestadas superficialmente, e, constituem fonte de inóculo primário, responsável pela introdução da doença em novas áreas de plantio. O controle desta fitobactéria está fundamentado no uso de cultivares resistentes, rotação de culturas e uso de sementes sadias (Maringoni & Camara, 2006; Alencar et al., 2008; Herbes et al., 2008) uma vez que o controle químico não é uma opção viável, pois não há produtos registrados para a bactéria.

2.6 IMPORTÂNCIA DA DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM SEMENTES

A semente é um dos principais insumos da agricultura moderna, sendo que cerca de 90% dos alimentos são produzidos por meio delas. Todas as espécies cultivadas propagadas por sementes apresentam doenças como um fator responsável pela redução no rendimento ou aumento do custo de produção. Estas podem ser evitadas ou minimizadas pela utilização de sementes sadias e/ou tratadas (Menten, 1991). No entanto, a simples indicação das porcentagens de pureza, germinação e vigor de um lote de sementes não são suficientes para caracterizar a sua verdadeira qualidade, sendo necessário, obrigatoriamente, levar em conta o somatório dos atributos físicos, genéticos, fisiológicos e sanitários (Goulart, 1997; Borém, 2005). Assim, é de

fundamental importância que os métodos empregados para avaliar lotes de sementes forneçam dados precisos e confiáveis, de modo que, os resultados obtidos sejam uniformes e comparáveis; considerando o aspecto sanitário, os testes podem ser considerados como uma medida preventiva, tanto nos programas de quarentena quanto no sistema de produção de sementes certificadas (Lima Junior, 2010).

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

Essas técnicas são utilizadas isoladas ou combinadas e variam quanto ao custo, tempo para a obtenção de resultados, espaço físico, equipamentos necessários, grau de sensibilidade, especificidade, precisão, robustez, interpretação de resultados e à possibilidade de serem utilizadas em testes de rotina. Não existe, portanto, um método padronizado e que atenda a diferentes necessidades. Portanto, a escolha do método depende de vários fatores e, basicamente, será necessário adaptá-lo para cada sistema biológico em estudo (Schaad et al., 2001).

2.7 DETECÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS EM SEMENTES

2.7.1 Testes convencionais de sanidade de sementes

Vários métodos de detecção podem ser utilizados para determinar o nível de sanidade em sementes de feijão-comum. Dentre estes métodos podem-se citar: inspeção visual da amostra de sementes; exame da suspensão de lavagem das sementes; incubação em substrato de papel ou método do papel de filtro (*blotter test*); plaqueamento em

meio ágar sólido; incubação em rolo de papel; incubação em meio seletivo e semi-seletivo ágar azul de bromofenol NEON - (BRASIL, 2009).

De todos os métodos de detecção citados, o mais aplicável para a maioria dos fungos é o *blotter test*, no qual sementes são dispostas individualmente sobre camada de papel de filtro umedecido e mantidas sob luz fluorescente branca com fotoperíodo de 12 horas por um período de sete/oito dias, à temperatura de 20 ± 2 °C. Após esse período, as sementes são examinadas individualmente com auxílio de um microscópio estereoscópico para a observação da ocorrência de frutificações típicas do crescimento de fungos. Conidióforos com conídios e corpos de frutificação (p.ex., picnídios, acérvulos, peritécios) formados nas sementes são características importantes para identificar espécies fúngicas. Observações de lâminas ao microscópio óptico são, algumas vezes, necessárias para confirmar a identidade dos fungos em nível de espécie (BRASIL, 2009).

Na inspeção visual direta das sementes secas, não incubadas considera-se o seu aspecto geral, com relação à ocorrência de deformações e descolorações (Vieira et al., 2006). As amostras de trabalho são examinadas a olho nu ou com um microscópio estereoscópico (lupa com 50-60 x aumento) para a detecção de material inerte ou sinais dos patógenos aderidos ou misturados às sementes (Vieira & Rava, 2000).

O isolamento em meio seletivo e semi-seletivo consiste em extrair a bactéria de sementes moídas e/ou inteiras, a partir da incubação em água esterilizada por períodos variáveis. Em seguida, aplicando-se a técnica da diluição e transferência da suspensão para placas com meios de cultura, obtêm-se as colônias individualizadas que serão purificadas e identificadas posteriormente. No entanto, a identificação positiva, geralmente, requer mais que uma subcultura no meio seletivo porque raramente apenas uma espécie de bactéria cresce no meio seletivo. (Valarini, 1991).

2.7.2 Métodos moleculares

As técnicas moleculares tem se tornado uma ferramenta importante na fitopatologia para detecção e identificação de patógenos, os quais são difíceis de serem detectados e identificados utilizando métodos tradicionais normalmente empregados. Além disso, os métodos moleculares baseados na PCR têm sido investigados visando à detecção de diferentes patógenos em sementes cujas características morfológicas apresentam

semelhanças. Estas técnicas apresentam alta sensibilidade, especificidade e rapidez, satisfazendo assim os principais requisitos para detecção, identificação e diferenciação de espécies e subespécies de patógenos de plantas. Esse método ainda permite detectar o agente causal da doença diretamente do tecido vegetal, além de permitir a análise de um grande número de amostras em pouco tempo, podendo ser utilizadas dentro de programas de certificação (Vieira, 2002).

2.7.3 Reação em cadeia da polimerase

Desenvolvida na década de 1980 por Mullis & Faloona (1987), a PCR foi considerada um grande marco da biologia molecular. Esta técnica expandiu as possibilidades da análise de DNA e fez com que a biologia molecular encontrasse novas aplicações até mesmo em áreas fora do seu campo tradicional, tais como, a agricultura e a biotecnologia. Em razão do alcance da popularidade da técnica, Kary B. Mullis recebeu o prêmio Nobel de Química em 1993. A alta sensibilidade, a especificidade, a facilidade de execução e análise de um grande número de amostras simultaneamente, fizeram desta técnica uma opção atrativa para estudos epidemiológicos e para caracterização de microrganismos causadores de doenças.

A PCR consiste na amplificação de fragmentos, *in vitro*, a partir de uma quantidade mínima de DNA alvo ou de RNA previamente convertido em cDNA (molde) utilizando variação de temperatura (Mullis & Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Os reagentes necessários para que a reação aconteça são basicamente os mesmos componentes do processo de replicação que ocorre nas células vivas, que incluem:

- a) Quatro tipos de nucleotídeos na forma trifosfatados (dNTPs: dATPs, dTTPs, dCTPs, dGTPs) matéria-prima necessária para a síntese das novas fitas de DNA.
- b) Enzima *Taq* DNA-polimerase, que é responsável pela síntese das novas fitas de DNA em solução tampão específica, cuja composição varia de acordo com o fabricante. Basicamente, estas soluções contêm íons diversos (Na^+ , Cl^- , K^+ , entre outros) que aperfeiçoam as condições de reação.
- c) Cloreto de magnésio, doador estável de íons Mg^{2+} , são cofatores indispensáveis para atividade da enzima *Taq* DNA polimerase, entretanto, sua presença em excesso, pode provocar reações inespecíficas.

d) Dois iniciadores ou *primers*, pequenos fragmentos de DNA (oligonucleotídeos), que delimitam e são complementares à região alvo de amplificação. Os dois iniciadores utilizados na PCR são designados *forward* e *reverse*.

A necessidade de um par de iniciadores da reação decorre de uma peculiaridade do próprio mecanismo de replicação do DNA *in vivo*. As polimerases que replicam o DNA são incapazes de iniciar a síntese de uma nova cadeia a partir da cadeia molde sem a presença destes iniciadores; só são capazes de alongar uma cadeia de ácido nucléico pré-existente, que lhe fornece uma extremidade 3' livre na qual serão adicionados os novos nucleotídeos trifosfatados.

O princípio da PCR envolve três etapas básicas de variação de temperatura por ciclo, cada ciclo está dividido em:

1º passo (94-96°C) - Desnaturação do DNA a alta temperatura, devido ao rompimento das ligações de hidrogênio que unem as duas fitas.

2º passo (30-60°C) - Anelamento dos primers em posições específicas (essa temperatura é definida em função da sequência nucleotídica dos primers).

3º passo (72-75°C) - Extensão da sequência a ser amplificada pela ação da Taq DNA polimerase.

Durante cada ciclo que é repetido geralmente de 25 a 40 vezes, as fitas complementares de DNA são copiadas pela extensão dos primers que se anelam em posições opostas. Desta forma, cada fita de DNA recém-amplificada é usada como molde no ciclo seguinte, resultando assim, no acúmulo exponencial do fragmento de DNA flanqueado pelos dois primers.

O problema inicial, encontrado por Mullis, foi a desnaturação seguida da catálise pela enzima DNA polimerase que, obtida de *Escherichia coli*, não suportava a temperatura para abertura das fitas de ácidos nucléicos, reduzindo a sua atividade a cada ciclo do processo. Assim, a cada ciclo, uma nova quantidade de enzima deveria ser adicionada. Contudo, Saiki et al. (1988) substituíram a polimerase de *E. coli* pela já conhecida Taq DNA-polimerase, uma enzima termoresistente obtida da bactéria *Thermus aquaticus*, encontrada em águas quentes e vulcões submersos, que possui atividade ótima de crescimento entre 70°C a 75°C, e que permanece estável até 94°C. Assim, essa substituição promoveu maior independência ao processo além de aumentar a confiabilidade por redução de riscos de contaminação (Saiki et al., 1988).

A PCR tem sido cada vez mais utilizada como rotina em laboratórios de diagnose, na detecção de muitos patógenos causadores de doenças em plantas (Schaad et al., 2001). A detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *F. solani* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* pode ser realizada empregando-se PCR, oferecendo vantagens em relação aos métodos tradicionais (Wang et al., 2008).

2.7.4 Multiplex-PCR

A multiplex-PCR (m-PCR) é uma variante da PCR, na qual foi desenvolvida com a finalidade de, em único ensaio altamente específico, promover a identificação simultânea entre várias espécies ou gêneros. Essa forma de PCR envolve a amplificação simultânea de mais de uma sequência-alvo na mesma reação, pela mistura de vários pares de iniciadores. Desde sua primeira descrição por Chamberlain et al. (1988), o método tem sido aplicado com sucesso em muitas áreas, incluindo análise de exclusões, mutações, polimorfismos, estudos forenses e identificação de patógenos (Edwards & Gibbs, 1994).

A m-PCR tem potencial para produzir considerável redução de tempo e de esforço dentro do laboratório sem comprometer a confiabilidade do teste. No campo das doenças fitopatogênicas, a técnica mostra ser um método valioso para a identificação de vírus, bactérias, fungos e outros fitopatógenos (Elnifro et al., 2000). Entretanto, estabelecer um protocolo de m-PCR não é uma tarefa fácil devido a algumas dificuldades como competição entre reagentes, baixa sensibilidade, especificidade e amplificação preferencial de alguns fragmentos. É fundamental realizar a escolha dos iniciadores com características desejáveis como: temperaturas de anelamento semelhantes, tamanho dos produtos amplificados para que não ocorra formação de dímeros (Henegariu et al., 1997; Markoulatos et al., 2002; Vieira, 2006).

Com o objetivo de garantir desempenho adequado, Henegariu et al. (1997) descreveram alguns critérios que devem ser considerados no desenvolvimento de uma m-PCR, devido ao fato de se usar mais de um par de iniciadores na mesma reação. Entre os fatores que podem influenciar os resultados de análises da m-PCR pode-se citar a concentração dos iniciadores e o perfil dos ciclos da reação (Henegariu et al., 1997). Esta técnica frequentemente requer otimização devido ao excesso de iniciadores induzirem a formação de dímeros (intra ou inter primers) e o aparecimento de produtos inespecíficos, os quais interferem na amplificação dos produtos desejados. Entretanto, a formação desses

dímeros pode ser evitada utilizando kits comerciais que possuem a HotStarTaq DNA polimerase, uma forma modificada da DNA polimerase recombinante, originalmente isolada de *T. aquaticus* e clonada em *Escherichia coli* (Qiagen, 1999).

Considerando que o gênero *Fusarium* compreende um grupo diversificado de fungos incluindo importantes patógenos causadores de doenças em plantas, e, várias espécies que produzem micotoxinas nos cereais e podem, por esta via, entrar na cadeia alimentar e afetar a saúde de pessoas e animais, verificou-se na literatura que diversos autores descreveram metodologias baseados em m-PCR, para detectar e diferenciar espécies do gênero *Fusarium*. Faria et al. (2012) desenvolveram m-PCR, para detectar simultaneamente o DNA genômico de *F. verticillioides* e *F. subglutinans*, responsáveis por causar diversas doenças como podridão radicular e podridão de espiga no milho e outros cereais, e ainda podem produzir quantidades significativas de micotoxinas nos grãos. Brandfass & Karlovsky (2005) descreveram m-PCR para a detecção simultânea de *F. graminearum* e *F. culmorum* agentes causais da podridão-radicular em trigo e cevada. O método desenvolvido no estudo permitiu a identificação simultânea dos respectivos patógenos, demonstrando ser adequado para estudos epidemiológicos, envolvendo grande número de amostras.

Não menos importante que o gênero *Fusarium*, a *murcha-de-curtobacterium* assume relevante importância, uma vez que, o principal meio de disseminação desse agente patogênico a longas distâncias é via sementes. Além disso, a bactéria sobrevive em restos culturais infectados, em plantas voluntárias no campo, em hospedeiros alternativos (outras leguminosas, como soja, ervilha e caupi) e em sementes. No entanto análises visuais das sementes são insuficientes para determinar a presença da bactéria. Deste modo, Silva et al., (2013) desenvolveram um método de m-PCR para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em extratos de sementes de feijão. O método descrito utilizando dois pares de primers específicos na reação multiplex permitiu confirmar a presença dos respectivos patógenos em 10 lotes comerciais de sementes analisados.

2.7.5 Amplificação isotérmica do DNA (LAMP)

As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos são cada vez mais utilizadas na identificação de agentes fitopatogênicos a partir de pequenas quantidades de DNA ou RNA (Gill & Ghaemi, 2008; Popovic et al., 2010). Embora estas técnicas sejam precisas

exigem-se instrumentos sofisticados e mão-de-obra qualificada. Para superar estas limitações Notomi et al. (2000) desenvolveram uma metodologia capaz de amplificar pequenas quantidades de DNA sob condições isotérmicas, ou seja, sem a utilização de termocicladores e infraestrutura de laboratório.

O método denominado amplificação isotérmica do DNA (*Loop mediated isothermal amplification* - LAMP), apresenta várias características que a tornam atraente para diagnóstico em ambientes desprovidos de materiais sofisticados: é rápida, apenas uma enzima é necessária para que a reação prossiga sob condições isotérmicas (necessitando apenas de um aquecedor), é robusta e não é afetada por inibidores que normalmente afetam negativamente a PCR, e gera um resultado que pode ser detectado a olho nu. A reação de amplificação requer quatro tipos de iniciadores que são concebidos para reconhecer de seis a oito regiões distintas do gene alvo. Estes iniciadores são desenhados, obedecendo a vários parâmetros entre os quais o conteúdo respectivo de guanina e citosina e a correspondente temperatura de cada região, assim como as distâncias entre os locais de hibridação (Figura 1) (Notomi et al., 2000; Gill & Ghaemi, 2008; Nimitphak, 2008).

A tecnologia LAMP utiliza uma DNA polimerase com atividade de deslocamento de cadeia (*strand displacement activity*), a *Bst* DNA Polymerase, Large Fragment, a qual é extraída de *Bacillus stearothermophilus*, possui a capacidade de amplificar fragmentos longos incorporando os nucleotídeos à fita filha. Esta enzima permite a amplificação isotérmica de sequências de DNA e RNA da ordem de 10^9 a 10^{10} , em tempos que variam entre 15 a 60 minutos (Notomi et al., 2000).

O método LAMP utiliza um sistema de dois iniciadores internos (FIP e BIP) e dois iniciadores externos (F3 e B3) (Figura 1), que reconhecem um total de seis regiões distintas do gene alvo. O par externo flanqueia a região alvo e é formado por iniciadores semelhantes aos usados numa PCR convencional. O par interno possui como alvo zonas internas à região flanqueada pelo par externo (Figura 1) (Gill & Ghaemi, 2008; Notomi et al., 2000).

Os quatro iniciadores são utilizados nos passos iniciais da reação de LAMP, mas quando o ciclo de reação é completado apenas os iniciadores internos são utilizados para a síntese DNA. Estes iniciadores internos são construídos tendo em conta a seguinte estrutura: metade do iniciador FIP (*forward inner primer*) é constituída pelas regiões F1c uma sequência espaçador contendo quatro timinas (TTTT) e F2. Os iniciadores BIP (*backward inner primer*) são compostos pelas regiões B1c uma sequência espaçador TTTT

e B2. Esta construção permite que a região F2 do iniciador FIP e a região B2 do iniciador BIP possam hibridizar com os seus locais complementares, F2c e B2c respectivamente, e mantenham as porções F1c e B1c livres para se ligarem às regiões F1 e B1, criando um *loop* (estrutura em forma de grampo, também chamada de halteres) na estrutura resultante (Figura 3.5) (Gill & Ghaemi, 2008; Nimitphak, 2008; Notomi et al., 2000). Além disso, a adição do conjunto das quatro timinas (TTTT) entre os iniciadores F1c + F2 e B1c + B2 dá uma maior flexibilidade aos iniciadores para reconhecer a fita do DNA e no momento da amplificação quando ele forma o *loop*. O processo de amplificação da técnica LAMP ocorre em duas etapas, conhecidas como não cíclica e cíclica. O *loop* é formado após oito passos de reação sucessiva da etapa não cíclica.

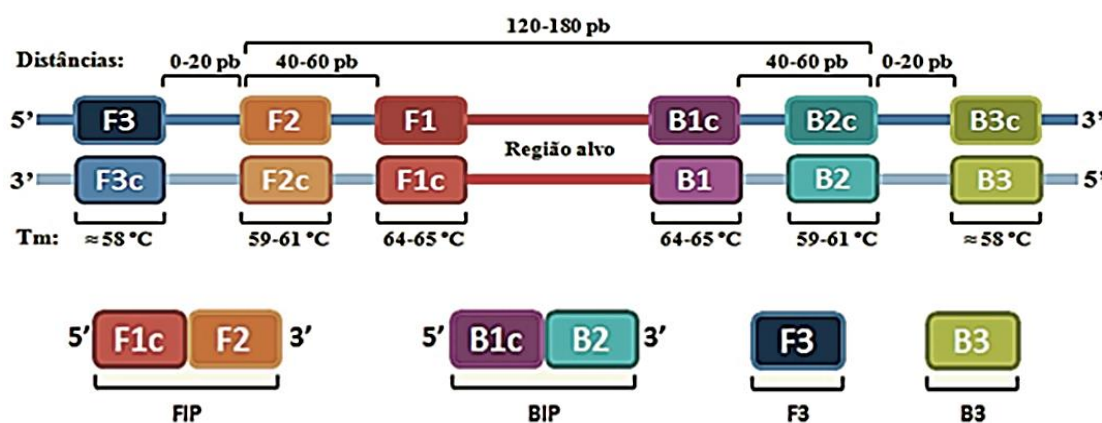


Figura 1. Representação esquemática e parâmetros a serem considerados no desenho dos quatro iniciadores (F3, FIP, B3 e BIP) para LAMP e suas respectivas regiões de anelamento. Note que: FIP é constituído por dois iniciadores, F1C e F2, separados por quatro timinas; BIP é constituído por dois iniciadores B1C e B2, separados por quatro timinas (Eiken Chemical, 2000)

2.7.5.1 Etapa não-cíclica

Ao contrário da PCR, não há necessidade de desnaturação da dupla fita de DNA em fita simples no método LAMP, devido ao uso da *Bst DNA polimerase*, com atividade de deslocamento de fita e atividade helicase. A amplificação é iniciada no sentido de 5'-3', por meio da hibridização do iniciador FIP com a região complementar alvo, F2c (Figuras 2, item 1 e 2). A cadeia formada é removida quando o iniciador externo correspondente (F3) hibridizar à sua região alvo (F3c) (Figura 2, item 3). A *Bst DNA polimerase* abre a cadeia dupla, liberando a cadeia simples de DNA formada (Figura 2, item 4), que adquire um *loop* na extremidade 5' devido a complementariedade existente (Figura 2, item 5). A esta molécula de DNA em cadeia simples (extremidade 3'), liga-se o

outro iniciador interno (BIP) que se anela na fita de DNA ocorrendo então a síntese da fita complementar do DNA. Em seguida, o iniciador B3 se anela na região exterior do BIP e por meio da *Bst* DNA polimerase ocorre deslocamento e liberação da fita contendo o BIP complementar (Figura 2, item 6). Com a liberação desta fita de DNA é formada uma nova estrutura em forma de *loop*. Assim, uma estrutura parecida com um halter com dois laços nas duas extremidades é formada, e a partir desta estrutura básica se inicia a fase cíclica da técnica (Figura 2, item 7).

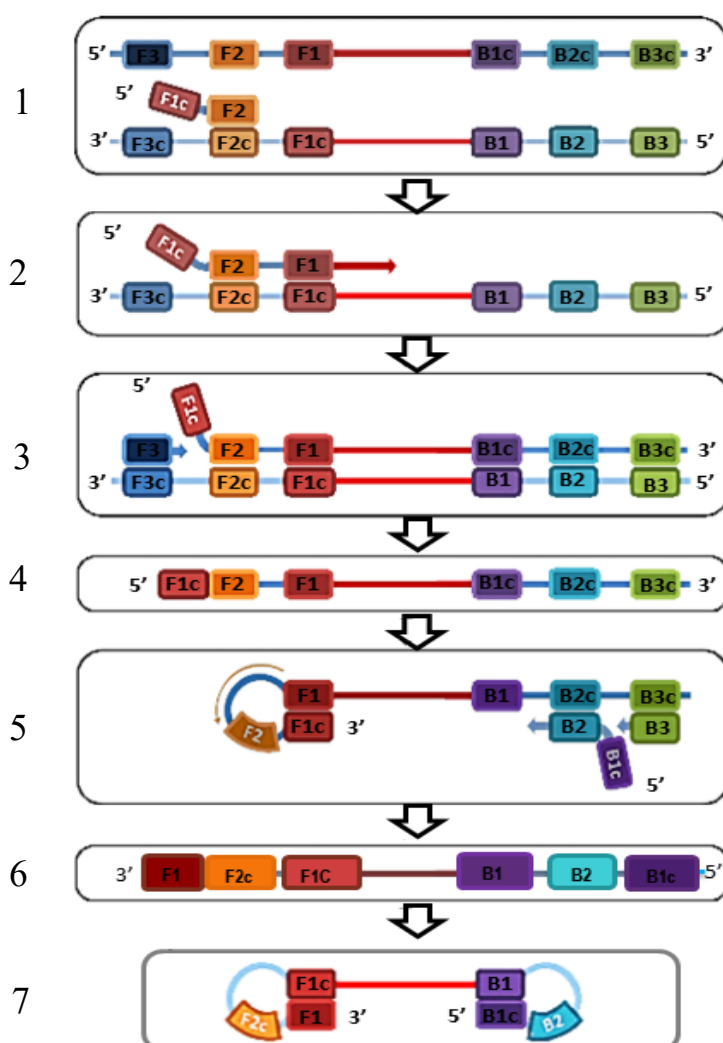


Figura 2. Representação esquemática da etapa não cíclica da amplificação por LAMP (passo de 1 a 7) com a geração da estrutura básica em forma de halteres (Eiken Chemical, 2000)

2.7.5.2 Etapa cíclica

Na etapa cíclica os iniciadores se hibridizam na estrutura básica e se inicia a síntese do DNA por deslocamento, originando a partir do halter original uma nova fita de

DNA a cada novo ciclo (Figura 3, item 8). Em resumo, o iniciador FIP se anela na região de fita simples de DNA do halter e se inicia a síntese do DNA por deslocamento liberando uma fita filha. Esta fita simples de DNA forma apenas um lado do halter na extremidade 3' por causa do B1c e da região B1. Em seguida, a partir da extremidade 3' da região B1, a síntese do DNA começa usando sua própria estrutura como modelo e liberando a fita FIP da cadeia complementar. Esta fita, logo após, forma a estrutura do halter com ambas as extremidades F1-F1c e B1c-B1. Concomitante o iniciador BIP se anela na região B2c e a síntese do DNA ocorre descolando a fita e liberando-a (Nagamine et al., 2002) (Figura 3, item 9).

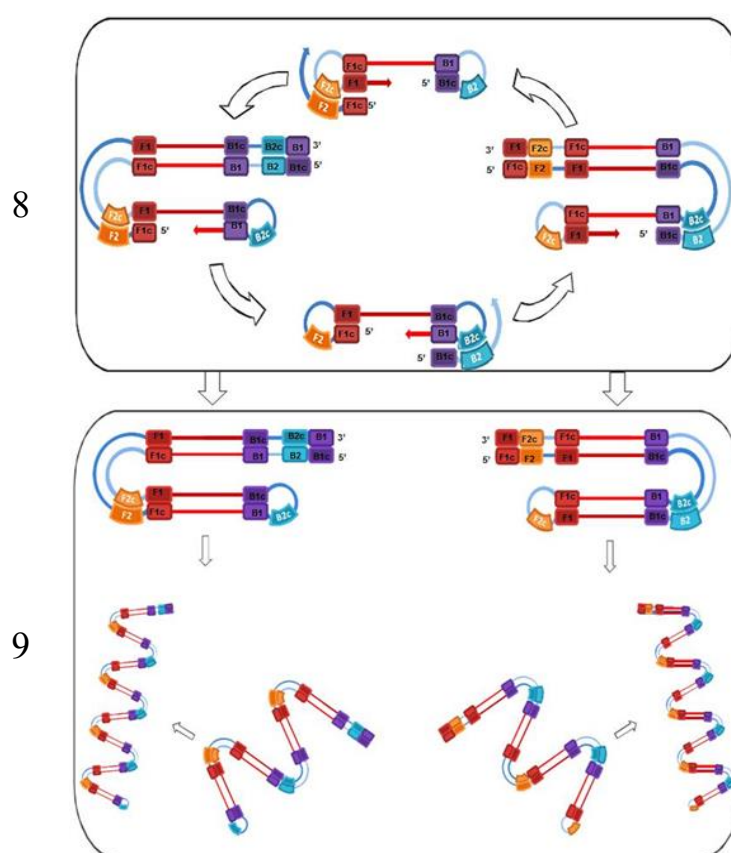


Figura 3. Representação esquemática da etapa cíclica da amplificação por LAMP (passos de 8 a 9). Amplificação exponencial da estrutura básica do LAMP (Eiken Chemical, 2000)

A amplificação dos produtos resultantes do método LAMP pode ser detectada pela observação visual da turvação ou por fluorescência. A turbidez é resultado da quantidade de DNA amplificado, por conseguinte, uma grande quantidade de subproduto da amplificação é produzida, obtendo-se um precipitado branco de pirofosfato de magnésio na mistura de reação. O aumento da turbidez da reação se correlaciona com a quantidade

de DNA sintetizado. A fluorescência é obtida com a adição de corantes intercalantes do DNA, incluindo o brometo de etídeo, SYBR Green I e iodeto de propídio após o término da reação, no entanto, estes corantes são cancerígenos e o manuseio deve ser realizado em ambiente com segurança, e descarte segregado. Por outro lado, os indicadores metálicos, tais como calceína, GeneFinderTM e azul hidroxinaftol adicionados antes da reação, são alternativas viáveis para ensaios realizados em laboratórios onde poucos recursos técnicos são disponibilizados (Almasi et al., 2013).

Além das vantagens descritas como rapidez; baixo custo; alta especificidade; observação visual do resultado, a técnica LAMP também apresenta outras vantagens como: a amostra a ser analisada não necessita de purificação do DNA, desnaturação prévia do DNA, o que facilita sua adoção para diagnósticos, e também dispensa a visualização dos produtos em gel de agarose. Por outro lado, este método também apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade de projetar iniciadores viáveis e resultados falso-negativos causados por contaminantes ambientais o que desencoraja seu uso prático (Uemura et al., 2008; Sun et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

A relação dos isolados fúngicos e bacterianos utilizados no desenvolvimento deste estudo estão descritos na Tabela 1. Estes isolados foram coletados em regiões produtoras de feijão do Brasil e pertencem à Coleção de Microrganismos e Fungos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão. Os isolados de *Fusarium* foram confirmados como pertencentes à espécie *F. solani* utilizando o fragmento do gene fator de alongação 1- α utilizando os iniciadores (Ef1-Ef2) (O'Donnel et al., 1998; Silva, 2015).

Tabela 1. Relação de isolados utilizados no estudo para o desenvolvimento da multiplex-PCR e amplificação isotérmica do DNA (LAMP)

Isolados	Localidade	Gênero/Espécie	Código coleção
CNPAF-FOP-46*	Recife – PE	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	BRM-14991
CNPAF-FOP-122	Santo Antônio de Goiás – Go	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	BRM 28155
CNPAF-CFF-25*	Wenceslau Braz – PR	<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	BRM-19993
CNPAF- XAP19*	Ponta Grossa – PR	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	BRM-25302
CNPAF-FUS-0326	Guarda Mor	<i>F. solani</i>	BRM-32935
CNPAF-FUS-0546	Fernandes Pinheiro	<i>F. solani</i>	BRM-31661
CNPAF-FUS-0554	Fernandes Pinheiro	<i>F. solani</i>	BRM-31669
CNPAF-FUS-0810	Rio Verde – GO	<i>F. solani</i>	BRM-32936
CNPAF-FUS-0832	Buri – SP	<i>F. solani</i>	BRM-32937

*Controles positivos e ou negativos, quando necessários

Os isolados preservados em papel filtro foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura BDA (200 g de batata descascadas, 20 g de dextrose, 15 g de ágar, 1 L de água destilada) e incubados à 25°C durante oito dias. Segmentos de papel-filtro dos isolados bacterianos foram transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura ágar-nutriente (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 20 g de ágar, 2,5 g de glicose e 1 L de água destilada) e incubados a 28°C durante três dias. Após o período de incubação realizou-se a extração de DNA de ambos os isolados.

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

3.2.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Fusarium solani*

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de Dellaporta et al. (1983), com modificações. O micélio cultivado em meio de cultura foi removido e transferido para microtubos. Ao micélio obtido, foram adicionados 500 µL de tampão de extração Dellaporta (1,57g Tris-HCL 100 mM; 1,86g EDTA 50 mM; 2,92g NaCl 500 mM; 100 mL de H₂O ultra-pura; pH corrigido para 8,0 ao final do preparo da solução). Em seguida as amostras foram agitadas em vortéx por 2 minutos. Posteriormente foram adicionados 40 µL de dodecil sulafato de sódio (SDS) 20%, seguido de incubação por 30 minutos em banho-maria a 65°C, com agitação periódica a cada 10 minutos por 30 segundos.

Logo após, foram adicionados 160 µL de acetato de potássio 5M, seguido por agitação em vortéx por 2 minutos e centrifugação a 14.000 rpm, a 25°C, por 10 minutos. O procedimento de filtragem, recomendado no protocolo original, foi suprido para dinamizar a metodologia. Assim, aproximadamente 400 µL do sobrenadante foram transferidos para novo microtubo com capacidade de 1,5 mL, acrescentando-se aproximadamente 400 µL de isopropanol gelado. Os microtubos foram invertidos suavemente 50 vezes, sendo que a incubação de uma hora a -20°C não foi necessária e não interferiu na qualidade e/ou na quantidade de DNA. Para a obtenção do pellet, foi realizada a centrifugação das amostras a 14.000 rpm, a 25°C, por 10 minutos, descartando o sobrenadante, e, o precipitado foi lavado com 500 µL de álcool 70% por 2 vezes consecutivas intercaladas por centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos entre as lavagens.

Ao final da extração foram adicionados 250 µL de álcool absoluto seguido da centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm. Secou-se o precipitado em câmara de fluxo laminar, diluindo-o a seguir em 50 µL de tampão TE pH 8.0. O DNA obtido foi analisado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), utilizando os comprimentos de onda de 260 nm para quantificação de ácidos nucléicos, e de 230 nm e 280 nm para determinação das impurezas. Ao final, o DNA obtido foi diluído para concentração final de 25 ng/µL e armazenado a -20°C. A extração foi realizada em triplicata, para garantir a quantidade necessária para a realização dos ensaios futuros.

3.2.2 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

A técnica utilizada na extração do DNA genômico do isolado bacteriano foi descrita por Li & Boer (1995). Após o crescimento da cultura as placas foram lavadas com um volume aproximado de 4 mL de água destilada estéril. Dois mL da suspensão obtida foram transferidos para microtubos de 2 mL, seguido por centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante de cada amostra e procedeu-se a lavagem do pellet com adição de 1 mL de água destilada estéril, seguidos de centrifugação (13.000 rpm por 5 minutos). Este procedimento foi repetido duas vezes. O pellet foi mantido em freezer por 1 hora a -20°C. Após o descongelamento em temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de acetona (-20°C) com as amostras homogeneizadas em vortéx e mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos.

Em seguida as amostras foram ressuspensas em 500 µL de tampão de extração TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0) + 50 µL de 500 mM EDTA pH 8,0 + 50 µL de SDS a 14% + 10 µL de proteinase K (0,1%), seguidos de homogeneização e incubação por 1 hora a 55 °C. Adicionou-se igual volume de acetato de amônio (7,5 M), seguidos de homogeneização e centrifugação por 20 minutos a 13.000 rpm. Foram retirados 900 µL do sobrenadante de cada amostra e transferidos para um novo microtubo, adicionando 540 µL de isopropanol, seguido de homogeneização e precipitação a -20 °C por 1 hora. As amostras foram centrifugadas (13.000 rpm/30 minutos) a 4°C. O pellet foi lavado com etanol 70% (-20°C), centrifugado por 13.000 rpm durante 5 minutos e seco à temperatura ambiente. O DNA obtido foi analisado em espectrofotômetro (NanoDrop), utilizando os comprimentos de onda de 260 nm para quantificação de ácidos nucleicos e, de 230 nm e 280 nm para determinação das impurezas. Ao final o DNA obtido foi diluído para concentração final de 25 ng/µL e armazenado a -20°C. A extração foi realizada em triplicata.

3.3 DETECÇÃO MOLECULAR DE *Fusarium solani*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

3.3.1 Especificidade dos iniciadores de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Para identificação molecular de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foram utilizados os iniciadores A280 e B310, CffFOR2 e CffREV4 (Tabela 2) (Alves-Santos et al., 2002; Tegli & Surico, 2002). Para definir as condições da reação de PCR e verificar a especificidade dos iniciadores, cada par de iniciadores foi testado separadamente usando material genético de isolados padrão de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (CNPAF-FOP-46) e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (CNPAF-CFF-25) extraídos dos materiais de referência (itens 3.2.1 e 3.2.2).

Tabela 2. Iniciadores utilizados para realização da PCR e multiplex-PCR de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Espécime	Iniciadores	Sequencia dos iniciadores 5'-3'	Peso Molecular (pb*)	Referências
<i>Fop</i>	A280	ATACCGGACGGGCGTAGTGACGATGG	609	Alves Santos, 2002
	B310	CAGCCATTCATGGATGACATAACGAATTC		
<i>Cff</i>	CffFOR2	GTTATGACTGAACTTCACTCC	306	Tegli et al., 2002
	CffREV4	GATGTTCCCGGTGTTTCAG		

*pb: pares de bases

Para cada par de iniciadores foi verificado apenas o produto da PCR de tamanho esperado de 609 pb e 306 pb, confirmando a especificidade de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, respectivamente. Em todos os ensaios realizados utilizou-se kit Qiagen PCR Multiplex, que é composto de uma mistura de enzima, tampão e desoxirribonucleotídeos trifosfato (HotStarTaq DNA Polymerase), Multiplex PCR Buffer com 6mM de MgCl₂ e dNTP Mix (QIAGEN). Todas as reações foram conduzidas em um termociclador (Swift™ MaxPro, Esco). O protocolo inicial da PCR convencional para a detecção dos respectivos patógenos e que foi utilizada como “molde” para padronizar a concentração final ótima dos iniciadores estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Componentes da reação utilizada para determinar especificidade dos iniciadores de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (volume final da reação 10 µL)

Reagentes	Concentração Final	Volume final de cada reagente
Master Mix 2x	1X	5 µL
Q-Solution 5x	0.5X	1,0 µL
Iniciador 1 (10 µM)	1 µM	1,0 µL
Iniciador 2 (10 µM)	1 µM	1,0 µL
DNA	25 ng/µL	1,0 µL
Água	-	1,0 µL

Em todas as reações de amplificação foi incluído um controle negativo, *F. solani* (CNPAF-FUS-0326) nas reações de amplificação para *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (CNPAF- XAP19) nas reações para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Para a amplificação de *F.oxysporum* f. sp. *phaseoli* utilizou-se as seguintes condições: ciclo inicial de desnaturação à 95°C por 15 minutos 40 ciclos constituídos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 2 minutos, com um ciclo final de extensão à 72°C por 10 minutos. O ciclo térmico para detecção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* consistiu em um ciclo inicial de desnaturação à 95°C por 15 minutos, 30 ciclos constituídos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão à 72°C por 1 minuto, extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.3.2 Padronização da concentração dos iniciadores para detecção de *F.oxysporum* f. sp. *phaseoli* ou *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por PCR

Para a PCR ser eficaz na detecção do patógeno, um dos passos mais importantes é a escolha e concentração dos iniciadores. No Para tal, foi necessária a realização de diluição seriada dos iniciadores para determinar a melhor concentração para a realização das amplificações. Todas as concentrações de iniciadores testadas estão descritas na Tabela 4. Como controle positivo foram utilizados os mesmos isolados referência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Tabela 4. Componentes e respectivas concentrações avaliados para determinar a concentração ótima de cada conjunto de iniciadores para detecção isolada *F.oxysporum* f. sp. *phaseoli* ou *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (volume final da reação 10 µL)

Reagentes	Concentrações/Volume				
	0,2 µM	0,4 µM	0,6 µM	0,8 µM	1,0 µM
Master Mix 2x	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Q-Solution 5x	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
Iniciador 1 (10 µM)	0,2 µL	0,4 µL	0,6 µL	0,8 µL	1,0 µL
Iniciador 2 (10 µM)	0,2 µL	0,4 µL	0,6 µL	0,8 µL	1,0 µL
DNA (25 ng/µL)	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
Água	2,6 µL	2,2 µL	1,8 µL	1,4 µL	1,0 µL

Após a determinação da menor concentração dos iniciadores capazes de amplificar as regiões genômicas esperadas, procedeu-se a padronização da PCR multiplex. Em todas as reações de amplificação foi incluído controle negativo, *F. solani* nas reações de amplificação para *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *X. axonopodis* f. sp. *phaseoli* nas reações para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. O ciclo térmico para amplificação do DNA de *F.oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foram as mesmas condições descritas no item 3.3.1.

3.3.3 Desenho dos iniciadores e especificidade dos iniciadores para detecção de *F. solani*

De acordo com a análise de sequências do rDNA, três iniciadores foram desenhados a partir do alinhamento da região intergênica (IGS). A região foi obtida na base de dados NCBI-GenBank. Três conjuntos de iniciadores (Tabela 5) foram projetados utilizando software Primer3 e sintetizados pela empresa Sigma-Aldrich. Verificou-se as semelhanças para os iniciadores com outras sequências disponíveis na base de dados do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizando o algoritmo BlastN.

Tabela 5. Iniciadores projetados para detecção de *F. solani* por PCR e PCR multiplex

Espécime	Iniciadores	Sequência dos iniciadores 5'-3'	Peso Molecular (Pares de base)
<i>F. solani</i>	IGS1-Forward	GCGCAACTGTGTGATTTGGT	143
	IGS1-Reverse	AGGAGAGGCGATTTGTGGG	
<i>F. solani</i>	IGS3-Forward	GCGCAACTGTGTGATTTGGT	544
	IGS3-Reverse	AGGAGAGGCGATTTGTGGG	
<i>F. solani</i>	IGS4-Forward	GCGCAACTGTGTGATTTGGT	549
	IGS4-Reverse	AGGAGAGGCGATTTGTGGG	

Cinco isolados de *F. solani* (CNPAF-FUS-0326, CNPAF-FUS-0546, CNPAF-FUS-0554, CNPAF-FUS-0810 e CNPAF-FUS-0832) foram utilizados para avaliar a especificidade dos iniciadores e o isolado referência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* foi incluído como controle negativo. As condições de amplificação para os oligonucleotídeos de *F. solani* estão descritas na Tabela 6. Para a amplificação de *F. solani* utilizou-se as seguintes condições: ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, extensão final a 72 C por 5 minutos.

Tabela 6. Componentes da reação utilizada para verificar a especificidade de cada conjunto de iniciadores para detecção de *F. solani* (volume final da reação 10 µL)

Reagentes	Concentração final	Volume
Master Mix 2x	1X	5 µL
Q-Solution 5x	0.5X	1,0 µL
Iniciador 1 (10 µM)	1 µM	0,6 µL
Iniciador 2 (10 µM)	1 µM	0,6 µL
DNA	25ng/ µL	1,0 µL
Água	-	1,8 µL

3.4 MULTIPLEX-PCR

3.4.1 Determinação da temperatura ótima de anelamento

De acordo com Tegli & Surico (2002) a temperatura de anelamento utilizada para os iniciadores CffFOR2/CffREV4 para detecção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* é de 60°C, enquanto que, os iniciadores empregados na detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* A280/B310, Alves-Santos et al. (2002) utilizaram a temperatura de anelamento à 65°C. Portanto, fez-se necessário padronizar a temperatura de anelamento para detecção simultânea de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. As condições de amplificação deste ensaio estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Componentes da reação utilizada para determinar a temperatura de anelamento dos iniciadores para detecção simultânea de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (volume final da reação 10 µL)

Reagentes	Volume / reação
Master Mix 2x	5 µL
Q-Solution 5x	1 µL
CffFOR2 (400 µM)	0,1 µL
CffREV4 (400 µM)	0,1 µL
A280 (400 µM)	0,1 µL
B310 (400 µM)	0,1 µL
DNA (25 ng/µL)	2 µL (1 µL de cada amostra)
Água	1,6 µL

As reações foram conduzidas em termociclador com gradiente de temperatura com as seguintes condições: desnaturação inicial por 15 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto. A temperatura de anelamento dos iniciadores foi determinada após a amplificação a 55,0°C, 56,5°C, 57,6°C e 60,7°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão de 5 minutos a 72°C.

Determinada a temperatura de anelamento, foram realizados testes para determinar a concentração ótima dos iniciadores.

3.4.2 Padronização da concentração dos iniciadores para detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por Multiplex-PCR

A padronização da concentração ótima dos iniciadores foi necessária para definir a menor concentração capaz de produzir o melhor produto de amplificação. Cinco concentrações dos iniciadores foram testadas. As concentrações e os volumes dos reagentes estão descritos na (Tabela 8).

Tabela 8. Componentes da reação utilizada para determinar a concentração final de cada conjunto de iniciadores para detecção simultânea de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (volume final da reação 10 µL)

Reagentes	Concentrações/Volume/reação				
	0,2 µM	0,4 µM	0,6 µM	0,8 µM	1,0 µM
Master Mix	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Q-Solution 5x	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
CffFOR2 (100 µM)	0,02 µL	0,04 µL	0,06 µL	0,08 µL	0,1 µL
CffREV4 (100 µM)	0,02 µL	0,04 µL	0,06 µL	0,08 µL	0,1 µL
A280 (100 µM)	0,02 µL	0,04 µL	0,06 µL	0,08 µL	0,1 µL
B310 (100 µM)	0,02 µL	0,04 µL	0,06 µL	0,08 µL	0,1 µL
DNA (25 ng/µL)	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL
Água	1,92 µL	1,84 µL	1,76 µL	1,68 µL	1,6 µL

Após a padronização das concentrações dos oligonucleotídeos para detecção simultânea de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, foi adicionado à reação os iniciadores para detecção de *F. solani* na concentração de 0,6 µM. Em todas as reações de m-PCR foi incluído *F. solani* (CNPAF-FUS-0326) e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (CNPAF-XAP19) como controles negativos. Todas as reações foram conduzidas em termociclador (Swift™ MaxPro, Esco), com as seguintes condições: desnaturação inicial por 15 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo final de extensão de 5 minutos a 72°C.

3.4.3 Multiplex-PCR direto das sementes

Foram utilizados trinta amostras de sementes de feijoeiro-comum (Tabela 9), sendo que 25 amostras foram submetidas à incubação em substrato de papel (“blotter test”), (BRASIL, 2009), para confirmar a presença dos respectivos patógenos nas sementes. As demais amostras foram coletadas na Fazenda Capivara, em uma área infestada de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e compuseram os controles positivos da reação.

Tabela 9. Amostras de sementes de feijão-comum utilizadas para testes de sanidade e extração do DNA total das sementes.

Cultivar	Número de amostras	Ano
BRS Estilo	16	2013
BRS MG Realce	1	2013
BRS Esplendor	1	2013
BRS Requite	1	2013
BRS Notável	1	2013
BRS Executivo	2	2013
CNFC 11984	1	2013
CNFC 10467	1	2013
Pérola	1	2013
BRS Cometa	1	2014
Vermelho	1	2014
Feijão	3	2014

Para obtenção do DNA total das sementes, utilizou-se o método de lise alcalina do DNA descrito por Wang et al. (1993) e adaptado por Wei Wei et al. (2012). Aproximadamente trinta sementes de cada uma das trinta amostras foram trituradas em liquidificador. Em 100 mg do pó obtido adicionou-se 400 µL de solução lise (NaOH 0,5 M) e deixadas sob agitação por 2 minutos, seguido de centrifugação à 14.000 rpm / 5 minutos. Posteriormente 10 µL do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para um novo microtubo para diluição com 490 µL de solução neutralizante (100 mM Tris-Cl, pH 8,0). O extrato bruto de DNA obtido das sementes foi utilizado para multiplex-PCR. As reações foram preparadas de acordo com o protocolo previamente otimizado para m-PCR.

3.5 AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA DO DNA PARA DETECÇÃO DE *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

3.5.1 Desenho de iniciadores para LAMP

Foram desenhados vinte conjuntos de iniciadores para LAMP, com alvos complementares no gene *Fusarium oxysporum* zinc finger transcription factor 1 (*ftf1*), que

contém um aglomerado Zn (II) 2-Cys6 binuclear ligado ao DNA que está relacionado com um fator de virulência do patógeno (Figura 4) (Alves-Santos et al., 2002).

```
Fusarium oxysporum zinc finger transcription factor 1 (tf1) gene, complete cds
GenBank: DQ280313.1
>gi|83033875|gb|DQ280313.1| Fusarium oxysporum zinc finger transcription
factor 1 (tf1) gene, complete cds
CAGCCATTTCATGGATGACATAACGAATTCAGTAGTGTACACCGCTACCCATTTCTGAGAAACAATCAAGAAGGGACAGTGCATTGATGTG
GATTACCCCTGCTTATTAGAGGTGAAAAGGCTGGTATCCCTGTGATTTCATGGTATTACTGCAGCTGTAAACCCCGACCATGCTTTTGGCCCG
ATGCTCATCTACATGTAGGGAAGTGGTGAAGGCAGCAGGATGTTTATAGCCCATCATATAATTGCAATCAGACTCGTAAATCGTACGGTA
GAGTCTCTAGTCTCAGGCTTGGTAACTATAGTACAGTCTGTTTTCGGTGATGTGCGATGTGCGGCGCAGACTGTCCCAGCCCGAGTGGC
GGGAGCCACTGACTACCTGTTGCTGCTTCTCTATAAATCCCAGACGGCTTCGGGTGCGCTCAACCTCAACCTCAACGCTCTTGGATGC
AACTTTTAAATGCACAAACAGCTGTTCCAGCCCAACCCCTTATAAAGACTTTGTTGSCCTAGTGGGACTGCGTTCGACGACCAAAACCCCG
TGCGTAACTGAGTGCCTTCGCTCCGCTATCGTCACTACGCGCGTCCGGTATATTGTTTCAATCGCGGATTCTCGGCTCGGGTGGCCCG
GTGCTAACTTGTCTCTGGCAGAGCCATGTCCGGCCATGCGGTTTTTGAACCTCAACATGCCAATAGTCTCTGATTCCGGTCCCAACTG
TATCGCGAGCTTCCGTAATTCAGCTGTGCTTCTCCCTCTCACAGCGCTTAAATGGATTTCACACACTTCGACGATGTTGGTGTTCGCTA
CTATGTTCTTCTGACAGTCTTCTCTGTTTCCCTACTAGATCACACCCACAGTTCGAATCTCCACTCGGTTTCCCAGCACAGGCGCA
TGTCTGGCTTGCACATAGCGCTTACCGTTTGGCACTTTCGCTACGGGCAACCGCAGCCAGAGTATGGAAGGCTCCAAAGGCCCGCTGAT
CGGACATCTCCGCTATCCAGCGCTTCGAAAACCCGACTACCGATGAGTTTGGTTTGGCTTCTGTAAACCTGAGATGGCAGAGATCTAGG
CGGTAAAGCTAAGGAGGATAAAGCCGCTGCCACACCTGCTGGAGTGGACTTAAGACAAAGGCTGGCAAGGAAAGAAAGCCCTCCGCTCG
CTTGATTCATGCGCGCCGAAAGAGTCCGTTGTTTCAAGCGGAAACCCGCTGCAAGCACTGCTACACTCACATATCCATGTGTCTAC
AAAGTTACACTCGAAGGCTGCGCTCGCAAAATACATGGTTATGCTCGATAGCGCAAGGATGCATGGAAGAACCGCATCATCAAGCC
CATACCAAGTCCGATCAGGAAGTCCGCTCATCTGTAATCGCCGCTGGTCAACCGCTGATCCAGAGCTGTACTTCCATTAAGCCAA
CCAGGAAGCGCGCGCGAGGAAGCAATTCGGGCTGATGTTGGAGCTTGGGCGAAGCGCTTCAAGCCAAAGTATGAGGCGATGATAGG
CCCAGCAGCTTCAAGCCCGAGGAAGGGAGGGAATAGCTGCAACATGAAGCAAGCAAGCACTCCCTCCGAGGAGATACAGGAGCATCT
CGCAGAGTGTGTTTTCACACATCTATGGTCAATCTTACACTCTTTTACACAAAGCAAGCTATCTGCAAGAACTTAAAGTATGTTTGT
GGTTGAATCTCTGATCTTCTGCTGACTGTCAACAGAAATGGCACACTACCTCCGGTGTCTGTTCTCAGCTGTGGCTGTAGCTGCTGCTT
TACTTCAACCCCTAGTAAGTTCTTCAGGCTTGAATTTCTAGCGCTGAAGAAATGGGCATCACAGCTTCGACGATGTTGACGACCAAT
ACGATGGCCAGCTCAACCTCTGACATGCTTCTCATTTTGGGCTTCTGAATTTGGGAGCTGCTAAGGCGCGCGCTGCGGCTTCAAGC
AGTGGGCAAGCTATCCGATGCTTCCGCTCTCCAGTTCATATAAGACTTGGGATACGATTCCTCCGCGCTAATGGCGCCAAAGCCAGCT
CAACTCTCAATGATGAGAAATCGCGACACATCTGTTGGGCTGCTTCCCTTGGAGCGCTCAACTCTCTCTGGGAGCAAGATTCGACCC
ATGCTTCAACAGGAGGATCAATCAAAATCTCTCCGCTTAAAGGAAAGTACTTCTCAATTCGATCATGCTCCGCGCGACGCGCTG
TTGAGGATCAAGTACCTCATCCGCTCCGCGCAAGCAGCACAATCCGCTGATGTCAGAGAGAACATGGGATGTCGGGCTTCCGATGTCG
AGCCATGCTTATGGGAAGGATCATCACTACCTGAGCCAGGCTGTAAGGATCTAGACCCCAATCTATTGCGGAAGGAAGAACTCACT
ACATAAAGCATCTCAATGATGCTGTAAGCTTGAAGCTTCTGCTTGTCTCACTCACTACTCTGAGAGAACTCTGAGGTCCACAGACA
GAGACCGCGGCAAGCCAAATTTCTTTCATGCAATCTGCTGCGACATACATCTTCTGAGTTCGAGCGCATGTCAGGCGGAAAGCA
GCAGGCTGCTTCTGTTTCCGACGCTTCCGCTGATCTGCGGCTTTTCCCTCGGCAACAGTTCACATCTTGGGATTTATCTCTTGCATCCA
TCCATGAAGCCCAAGCGCGAGGCGCAATTTGAACCAATGTCAAAGTACCTTCAACAAAATGGAAGAGTATTTGGGATTTGTTTCACT
TGGATGGGGGAGAACGTTTCCGCTCAGTATGTAATGTCTTGCACGCTATGAGAGCTGCTGGAATGTGGAAGAACGAGGCGACAGCTAT
CCTTCTCTCAATAGGAGACTGGTATAACGCTTACCTTCGGGCTTCTGACGCTGAGTTTATGGAGCTGCTGCTCAACAAGCGAAAGGAT
TCAGGAGCAGAGCGGCTTCTGGAAGCGAAGCGGAACTGCGATCAGTGGAGGAACTCTCAAGCTTCAACACCGCAAGGCTCGAAGTAA
GGATACTTCCGCGCAGCAGCGCGGAAACGAAAGCAAGCGCCAGGATTTTGCAGACTGGTCTATGCGACCAACCTGGCCAAAGCATCTC
GATTCTGTTGAGACTACAGATGCGGAGCGAGTCTTCCAGAAACGCAAGTCTCGGCTGGTTTGGGATTCGAAATACAGGTGCGAGCAGG
TTCACCCCTCTCTCAGCATCAAAACAGCAGAAACCGGATTTTCAGCACCAACATGTCACTTACAGGCGCGGCGCAACATGACTCCATTTCTCA
CTACGCAACACAGCCACCTTTTCCACCGGAGCTGCTCTCAATAGACTTTGGGCGAGGCTCGAATGGAAGCAATTCACCGGCTTGTATGCT
AGCTTATCTATGGGATACCTCAATGGATGCTAGTACGCTGCTGTGTTGGGCGAGGATGATGAGCGGCTTGGTTGGGATACCGTCTGCT
TCAGGCGCTCAGGCGAGCGGATGCTTCAAGGTTCGGCGCGCAATGTCAAGGCGAGGATGATGAGGCAAGTGCAGGTATGGCTGATGGGCG
AGGATTAAGCGGAACGGAAGCATCATCCGATGCTTCTGCGCTTCAACATGAGGCTCCAGATATGGATCAAAATCCCGGCTTCAACATGG
CGGATTTGATCCGTTACGCGAGTCTTGGCGAGGAGGAGTGGTTTGGCAAGCGCAAGTGGCTAGTGGGCTCAGGCAACAGGCTCAT
TAGGAGGCTGTCGGAACCGGTTAACCAGTAAGCAACATGTTCTCGGAAGCGCAAGGCGGTAAGCCGAGGCTTCTTAAATATTTCTT
TTTTGGTGGTTCTACTTTTGGCTTGGGAAACTGTACAGAGTTCGGGTTGGATATTTGGGCAAAAGGCTTATGGAAGTTTTCAGGCA
AACATTAAGGAATGTATATGACATTCGTAAACCCATAGTTGGATCTTGAAGCAAAAGTCTTCAAGCAGCTTCCCTGCCATCAATAA
GACTACCGGAAAGGCAAGAGGTCGAGGAATTTGGATCTCATACAGATTACGAGTACTAGTCAATTCAGCGGCTGATGAGCTTCCGCGGT
AGTCTTCAATCCCTTCTCTATCTATATGCAATAGCTAACAGGCGCGCAAGGCTTATGATTCCGCGCCATATAAGGACGATAAGGTC
GCCAATTTGGGAGAGTGTCTGAGGATATAAAGAGATGATGAAGATGGATGTTTGTCTCTCTGAGAGATGTCTTACTGTTTCCC
AGGAAGTCTGCTTCTGCTTATTTGGCGAGCTTGTCACTTGTGCTTCCAGTGGATGATGACGATGATGACGATCACTACTAGTCTCTC
CGTCTACACCTCACAAGTTGCTCTTAACTCCGAGAGAGATTGCTTTGCGATATTTCAAGGCGGATTTCAAGCTGTTTGTAGGCT
CTTCCGCTATGACCATGCGCAGGAACCTAAGGCGCGCATTCACCTACGCGCAAGCAATTTACTGATATGTTATGAGAACTACCTCAGCG
TATTACTACGAGAGGCTGAATGATGAGGCTGCTATAGGTTATTTGGATCAGGAGAGGCTTCAAACTATGCTCCGCTGAGTAGACATAACCG
ATTGATTTGTCTGTAAGCAGATAACAAAGTATGATATGTTTATGTTCTTCCCAATGAAGACCTAGTATTCGAGGCTGCGGCACTCA
TCCATACCCAGAGTATCTTTGGAATATACCCACAGGATAGTTTCAAGGCACTACTTCTCCCTAGTATGCGCGCGCAAGTATGTTGA
AAATCCGGAATCCCTTCTTTCAGGATTCAGACTGTATAGGCTGAAAGTCTAGATTCAAGGTTCAAGTGTGCTAGGTTCAAGTCACTAGAC
ATATAAACCAGAGGAACTTATCTCAATAAGTAACTCAAGTTTCATAAAATACATTTTCAACCGACTGATGCGCAATATAACAA
CAGGACAGGGGGTAGATGACCAATTTGGGCTCATGAGATTATATAAGAAAGTGAAGGTGATTGAC
```

Figura 4. Sequência ilustrativa da região alvo do gene *Fusarium oxysporum* zinc finger transcription factor 1 (*ftf1*) com o número de acesso DQ280313 na base de dados NCBI-GenBank

O desenho dos quatro iniciadores (FIP, F3, BIP e B3) com base nas seis regiões distintas da sequência alvo: F3c, F2c e F1c presentes na extremidade 3', e B1, B2 e B3 na extremidade 5', foram realizados utilizando software Primer ExplorerV3 (<http://primerexplorer.jp/elamp3.0.0/index.html>), seguindo as instruções descritas por Notomi et al. (2000) e no *LoopAmp Eiken Genome website* (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/index.html>). Verificou-se as semelhanças para os iniciadores do LAMP com outras sequências disponíveis na base de dados do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), utilizando o algoritmo BlastN. Os iniciadores

foram sintetizados pela empresa Sigma-Aldrich e suas sequências estão listadas na Tabela 10.

Tabela 10. Conjuntos de iniciadores utilizados para LAMP baseado no gene *ftf1*

Conjunto	Nome	Sequência dos iniciadores 5'-3'
1	LAMP1 F3	CCCCCTGCGTAACTGAGT
	LAMP1 B3	AGAGGGAGAAGGCACAGC
	LAMP1 FIP	GGCCGAGAATCCGGCGATTGTTTCGCTCCGCCATCGTCACTACG
	LAMP1 BIP	CCGGCCATGCCGTTTTTGAACTTTGAACGTCGCGATACAGTTGG
2	LAMP2 F3	CCCCCTGCGTAACTGAGT
	LAMP2 B3	TGAGAGGGAGAAGGCACAG
	LAMP2 FIP	GGCCGAGAATCCGGCGATTGTTTCGCTCCGCCATCGTCACTACG
	LAMP2 BIP	CCGGCCATGCCGTTTTTGAACTTTGAACGTCGCGATACAGTTGG
3	LAMP3 F3	CCCCCTGCGTAACTGAGT
	LAMP3 B3	GCGCTGTGAGAGGGAGAA
	LAMP3 FIP	GGCCGAGAATCCGGCGATTGTTTCGCTCCGCCATCGTCACTACG
	LAMP3BIP	CCGGCCATGCCGTTTTTGAATTTTGAACGTCGCGATACAGTTGG
4	LAMP4 F3	CCCCCTGCGTAACTGAGT
	LAMP4 B3	GCGCTGTGAGAGGGAGAA
	LAMP4 FIP	GGCCGAGAATCCGGCGATTGTTTCGCTCCGCCATCGTCACTACG
	LAMP4 BIP	CCGGCCATGCCGTTTTTGAACTTTGAACGTCGCGATACAGTTGG
5	LAMP5 F3	CCCTAAGTGGGCAAGCTATC
	LAMP5 B3	CCATGGGTGCAATCTTGTC
	LAMP5 FIP	GCGTTTTGGCCCAATTACGG-GAATGGCTTCGCTCTCCAG
	LAMP5 BIP	GATCGAGAACTCCGCCACACA-AGGAGGAGTTGAAGCGGTC
6	LAMP6 F3	CAGCAGGGTGTTCATGATGA
	LAMP6 B3	GGCTTCATGGATGGATTGCA
	LAMP6 FIP	TGGGCTCACAAGGAATTCAG-CTGAAGCGAGTCACAGGAC
	LAMP6 BIP	AGTCGCGGTGCTTTGTTTCGG-TGTGAACGTTGCGGAGGA
7	LAMP7 F3	CTTGACGCTATGAGAGCT
	LAMP7 B3	CTCCACTGATCGCAGTTCCG
	LAMP7 FIP	CCGCGAGGGTAACGGTTATACC-GAAGAACGAGCCACACAGC
	LAMP7 BIP	TCTGACGCTGAGTTTCATGGACC-CTTCGCTTCGAGAACGCC
8	LAMP8 F3	CGAAAGCAAAGCGCCAAG
	LAMP8 B3	CGGGTTCGTGGTTTGATG
	LAMP8 FIP	GGCATCTGGTAGTCTGCAACGA-TGCAGACTGGTCATGCCA
	LAMP8 BIP	GACGCACTCTCCAGAAACGC-TGAGAGAGGGTTGAAGCCTG
9	LAMP9 F3	GGTCATGCCAGCACAAAC
	LAMP9 B3	GTAGGTGACATGGTGGTGC
	LAMP9 FIP	GCGTTTCTGGGAAGACTCGGT-TGGCCAAGCATCTCGATTG
	LAMP9 BIP	TCTCGGGTGGTTTGGGATTGC-CGGGTTCTGCTGGTTTGATG
10	LAMP10 F3	GGTCATGCCAGCACAAAC
	LAMP10 B3	GGCTCGTAGGTGACATGGT
	LAMP10 FIP	CCGAGAATTCGCTTCTCGGA-GCCAAGCATCTCGATTGCT
	LAMP10 BIP	TACAGGTGCAGCAGGCTTCAA-GGTGCTGAAATCCGGGTTTC
11	LAMP11 F3	GCAGACTACCAGATGCCG
	LAMP11 B3	ATTGAGAGCAGCTCGGGT
	LAMP11 FIP	GTTGAAGCTGCTGCACCTGTA-AGTCTTCCAGAAACGCAAG
	LAMP11 BIP	AGCACCACTATGTCACCTACG-AAAAAGGTGGGCGTGTGT
12	LAMP12 F3	CACCACCATGTACCTACG
	LAMP12 B3	GCCGCTCATCATCTCTGG
	LAMP12 FIP	AGCTCGGGTGGGAAAAGGTG-CGGCCAACATGACTCCAT
	LAMP12 BIP	ACATTGACCCGCTTGATCGTCA-AGACCGGTACTAGCATCCAT
13	LAMP13 F3	CGCTCTTGCGATGCAACTT
	LAMP13 B3	GCTCTGCCAGAGACAAAGT
	LAMP13 FIP	TGCGAAGCAGCTCCGACTAG-ACTGCACAACAGCTGTTCC
	LAMP13 BIP	TGCGTAAGTACTGAGTTCGCTTCGC-CCGAGAATCCGGCGATTG
14	LAMP14 F3	TCGAAAACCGACTACCGAT
	LAMP14 B3	GTGAGTGTAGGCAGTGCTTG
	LAMP14 FIP	GGCACCGGCTTTATCTCTCTTA-TTGGCTTCTGTAAACCGTG
	LAMP14 BIP	GCTGGAAGGAAAGAAAACGCC-TTCTCGCCTGAACAACGG
15	LAMP15 F3	CACCACCATGTACCTACG
	LAMP15 B3	CTGCTTCTCCGCCAAGCAC
	LAMP15 FIP	CTATTGAGAGCAGCTCGGGTG-CGGCCAACATGACTCCAT
	LAMP15 BIP	TATCTATGGCGATACCTAATG-CCAAGGCCGCTCATCATA
16	LAMP16 F3	CACCACCATGTACCTACG
	LAMP16 B3	ACAGTTTTCCCAAGCCAAAAGT
	LAMP16 FIP	CGACGGTATCCCAACCAAGGCCGCT-GGCGGATCAATGGATGCT
	LAMP16 BIP	CAAGGCAGGCATGCATGGGCAAGT-CATGCGGATGATGCTTCCGGT
17	LAMP17 F3	CACCACCATGTACCTACG
	LAMP17 B3	GGATTTTGATCCATATCTGGAG
	LAMP17 FIP	GTATCCGCCATAGATAAGCTG-GAGCTGCTCTCAATAGAC
	LAMP17 BIP	TCAGCCAGACGGATGCTTGC-GATCAGCCATACCTGCACCTTG
18	LAMP18 F3	CACCACCATGTACCTACG
	LAMP18 B3	CAGCCATACCTGCACTTTGCC
	LAMP18 FIP	CGCCATAGATAAGCTGACGATCAAG-GAGCTGCTCTCAATAGA
	LAMP18 BIP	GATGCTAGTACCGGTCTGTGT-GCGCCTGAAGCGACGGTATCC
19	LAMP19 F3	TGTATCGCGACGTTCTTGAA
	LAMP19 B3	CAAAAGTGCCGAACGGTAGAC
	LAMP19 FIP	GCAAACGCAACATCGTCGAAG TTTT GCTGTGCTTCTCCCTCT
	LAMP19 BIP	ACCCACAGTTTCCAATCTCCC TTTT GTGCAAGGCCAGACATG
20	LAMP 20 F3	TGTATCGCGACGTTCTTGAA
	LAMP 20 B3	CAAAAGTGCCGAACGGTAGAC
	LAMP20 FIP	GCAAACGCAACATCGTCGAAG TTTT GCTGTGCTTCTCCCTCT
	LAMP20 BIP	ACACCCACAGTTCCAATCTCCC TTTT GTGCAAGGCCAGACATG

3.5.2 Especificidade dos iniciadores externos F3/B3 por meio da PCR convencional

Um ensaio de PCR foi desenvolvido para confirmar a especificidade dos iniciadores externos F3/B3. A amplificação foi realizada num volume de 25 µl contendo 1X PCR tampão (10 mM Tris-HCL, pH 8,3 e KCl 50 mM), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada um dos iniciadores F3 e B3, 1 U de Taq DNA polimerase (Promega) e 2 µL de DNA do isolado referência BRM 14991 (25 ng/µL), além disso o isolado BRM 28155 foi utilizado para confirmar a especificidade. A PCR foi realizada em termociclador (Swift™ MaxPro, Esco). A amplificação para verificar se os fragmentos gerados apresentaram os tamanhos esperados (153 à 215pb) foi realizada com o seguinte perfil de PCR: desnaturação inicial por 3 minutos a 94°C, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 35 segundos, extensão a 72°C por 55 segundos e um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos das amplificações das reações foram visualizados tal como descrito em 3.6.4.

3.5.3 Otimização das reações de LAMP

A eficiência dos iniciadores foi avaliada para a amplificação isotérmica dos ácidos nucléicos, utilizando o protocolo padronizado para volume final de 25 µL proposto por Notomi et al. (2000): 1,6 mM de uma mistura de dNTP a 25mM (Sigma-Aldrich), 0,8 M de Betaína (Sigma-Aldrich), 1,6 µM dos iniciadores internos (FIP e BIP), 0,2 µM dos iniciadores externos (F3 e B3), 8 U de *Bst* DNA Polymerase (New England BioLabs) e 1× do tampão respectivo (*ThermoPol Reaction Buffer*: 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, pH 8,8) (New England BioLabs). As reações foram preparadas para obtenção de um total de 15 µL, incluindo 1 µL da amostra de DNA a 25 ng/µL.

Com base nas condições iniciais da reação LAMP adotado de Notomi et al., 2000, preparou-se uma reação comparando dois conjuntos (13 e 15) de iniciadores utilizando a concentração de 2,4 µM para os iniciadores internos e adicionando às reações MgCl₂ na concentração de 4 mM. Além disso, para checar a eficiência dos iniciadores, utilizou-se nas reações o material genético sem a amplificação, e também 1 µL do produto da PCR sem quantificar obtido da amplificação realizada com os iniciadores externos

(F3/B3). Tal como referido para as reações de PCR convencional, cada reação de amplificação LAMP incluiu também controle positivo (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*) e controle negativo (*Fusarium* sp.). As reações foram realizadas em termociclador (Swift™ MaxPro, Esco), com temperatura constante de 65°C durante 90 minutos, com passo final a 80°C por 2 minutos para inativação da polimerase. Os produtos de amplificação das reações de LAMP foram visualizados tal como descrito a seguir, em 3.6.4.

3.5.4 Visualização dos produtos de amplificação de PCR convencional, Multiplex-PCR e LAMP

Os produtos de amplificação da PCR convencional e de LAMP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) por 90 minutos a 90 V/cm em tampão TBE 1,0X (10,8 g de tris base, 5,5 g de ácido bórico, 0,87 g de EDTA, 1000 mL de água destilada). No momento de aplicar no gel as amostras foram ressuspensas em tampão “blue juice” (3 mL de glicerol, 25 mg de azul de bromofenol e 10 mL de água destilada). A corrida foi conduzida em cuba eletroforética (Bioneer – Agaro – Power TM) e fonte PWSys – PW300 a uma tensão de 90 V por 90 minutos. O tampão utilizado para a corrida foi o mesmo utilizado no preparo do gel. O marcador de peso molecular (MM) de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) foi empregado para comparação com os pesos moleculares das amostras amplificadas (Figura 5).

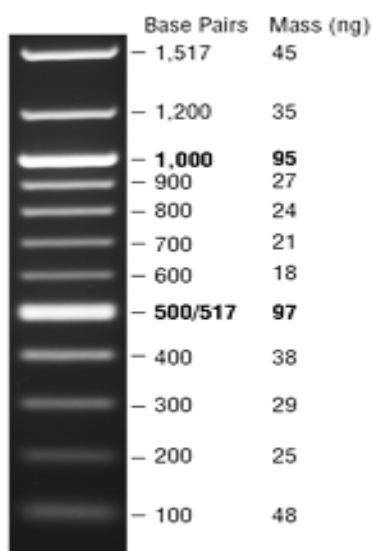


Figura 5. Padrão de peso molecular 100 bp DNA Ladder visualizado por coloração com brometo de etídeo em gel de agarose 1,5% TBE. Os valores de massa são para 0,5 ng/linha

O gel de agarose foi corado com brometo de etídeo para análise dos produtos amplificados. Após a corrida o gel foi visualizado em transiluminador UV (Gel Doc – Bio Rad), com análise dos produtos amplificados pelo programa Quantity One (4.6.3).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO DO DNA

A quantidade e a qualidade do DNA genômico obtidos de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium* spp. e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foram avaliados de acordo com análises da densidade óptica (OD) em espectrofotometria no equipamento NanoDrop. A relação entre a absorbância (A) do DNA (A260 nm) e de proteína (A280nm) ou de polissacarídeos (230nm) foi usada para avaliar a qualidade do DNA. Assim, fazendo as razões da A260/280 e A260/230 pode-se verificar a pureza da amostra. Considerou-se de baixa qualidade do DNA quando o índice A260/280 era menor que 1,6 e ótimo quando maior que 1,8. Para o índice A260/230 considerou-se de baixa qualidade quando menor que 1,6 e ótima quando acima de 1,9 (Nanodrop, 2007).

Os métodos empregados para extração de DNA dos isolados fúngicos e bacterianos permitiram obter uma quantidade de DNA para realização dos ensaios (PCR, padronização da multiplex-PCR e desenvolvimento da técnica LAMP). A concentração média obtida de DNA foi de 230 ng/μL, porém a qualidade do DNA resultante da aplicação dos métodos não foi satisfatória, uma vez que os valores das razões (A260/280) e (A260/230) obtiveram-se média de 1,5 e 0,6, respectivamente. No entanto, a pureza do DNA não interferiu na qualidade dos resultados.

4.2 DETECÇÃO MOLECULAR DE *Fusarium solani*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

4.2.1 Especificidade dos iniciadores de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Na amplificação dos produtos de PCR, foi observado que os dois isolados referência dos respectivos patógenos produziram fragmentos de 609 pb (Figura 6A) e 306

pb (Figura 6B), respectivamente. Não houve amplificação dos controles negativos, confirmando a especificidade dos iniciadores e os resultados obtidos por Alves-Santos et al. (2002) e Tegli & Surico (2002), garantindo sua adoção para todos os patógenos avaliados no presente trabalho.

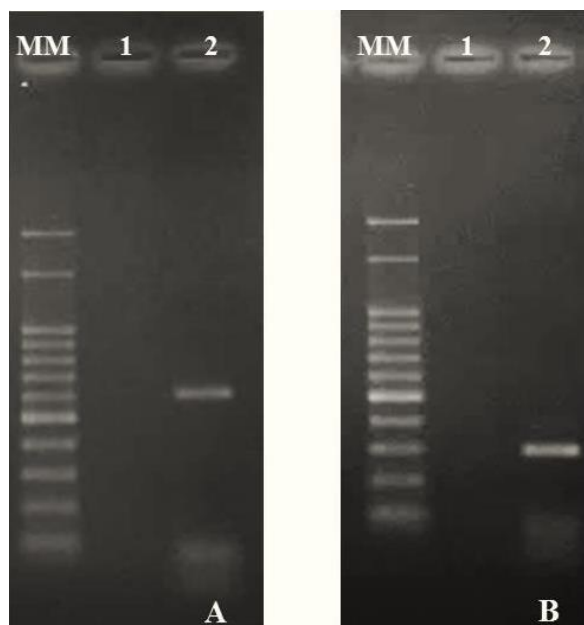


Figura 6. Produtos da PCR visualizados em gel de agarose 1,5%, TBE 1,0X corado com brometo de etídeo, sob luz UV. (A) PCR de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Colunas: 1 - controle negativo e 2 - isolado referência (BRM14991) e (B) PCR de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Colunas: 1 - controle negativo e 2 - isolado referência (BRM14946)

Tegli et al. (2002), ao realizarem testes para confiabilidade dos iniciadores CffFOR2/CffREV4, utilizaram amostras de outras espécies, não obtendo amplificação do DNA, demonstrando alta especificidade destes iniciadores para detecção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Resultados idênticos foram obtidos por Silva et al., (2014), ao avaliarem a especificidade dos iniciadores A280/B310 para diferenciar isolados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* de outras espécies de *Fusarium* e *formae specialis* de *F. oxysporum*.

4.2.2 Padronização da concentração dos iniciadores para detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por PCR convencional

Uma alta concentração de iniciadores aumenta a probabilidade de anelamento espúrio (fragmentos múltiplos), gerando produtos não específicos e dímeros, mas, no entanto, a falta deste componente interfere na amplificação. Desta forma, a concentração dos iniciadores deve estar usualmente em torno de 0,1-1,0 μ M de reação (Scheinert et al., 2003).

Dentre as concentrações dos iniciadores avaliadas para aperfeiçoar o protocolo de amplificação dos produtos da PCR e reduzir os custos dos reagentes, verificou-se que todas as concentrações de iniciadores testados para detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Figura 7A) e *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Figura 7B) geraram resultados satisfatórios.

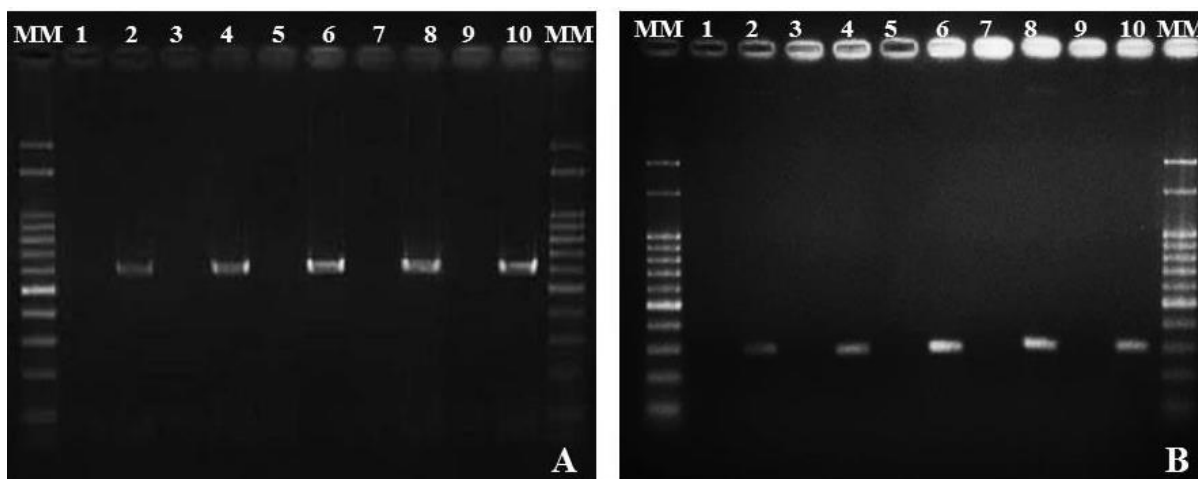


Figura 7. Produtos da PCR visualizados em gel de agarose 1,5%, TBE 1,0X corado com brometo de etídeo, sob luz UV. A) PCR de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* com os iniciadores A280/B310. Colunas: 1, 3, 5, 7, 9 - controles negativos e 2, 4, 6, 8, 10 - isolado referência (BRM14991) (609 pb). B) PCR de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* com os iniciadores FOR2/REV4. Colunas: 1, 3, 5, 7, 9 - controles negativos e 2, 4, 6, 8, 10 - isolado referência *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (BRM14946) (306 pb)

Os resultados demonstraram que desde a concentração de iniciadores mais baixa até a mais alta foram capazes de amplificar fragmentos de tamanho esperado de 609 pb e 306 pb, sem que bandas inespecíficas fossem visualizadas. No entanto, a concentração de 0,6 μ M foi estabelecida como ótima para a detecção dos respectivos patógenos, o que resultou em uma economia de 50% dos volumes utilizados em uma reação.

4.2.3 Desenho dos iniciadores e especificidade dos iniciadores para detecção de *F. solani*

Os conjuntos de iniciadores (IGS1 For/IGS1Rev, IGS3For /IGS3Rev e IGS4For/IGS4Rev) avaliados para amplificar a região IGS de *F. solani* amplificaram dois isolados (CNPAF-FUS-0810 e CNPAF-FUS-0832), dos cinco utilizados no ensaio, confirmando a especificidade dos iniciadores para detecção específica do agente causador da podridão radicular na cultura do feijoeiro. Fragmentos de aproximadamente 143 pb, 544 pb e 549 pb (Figura 8) foram visualizados. Três isolados (CNPAF-FUS-0326, CNPAF-FUS-0546, CNPAF-FUS-0554) não amplificaram com estes iniciadores, no entanto, quando utilizados o gene fator de elongação, foram confirmados como sendo *F. solani*. Diante do exposto, pode-se afirmar que estes iniciadores são específicos para *F. solani* f. sp. *phaseoli*.

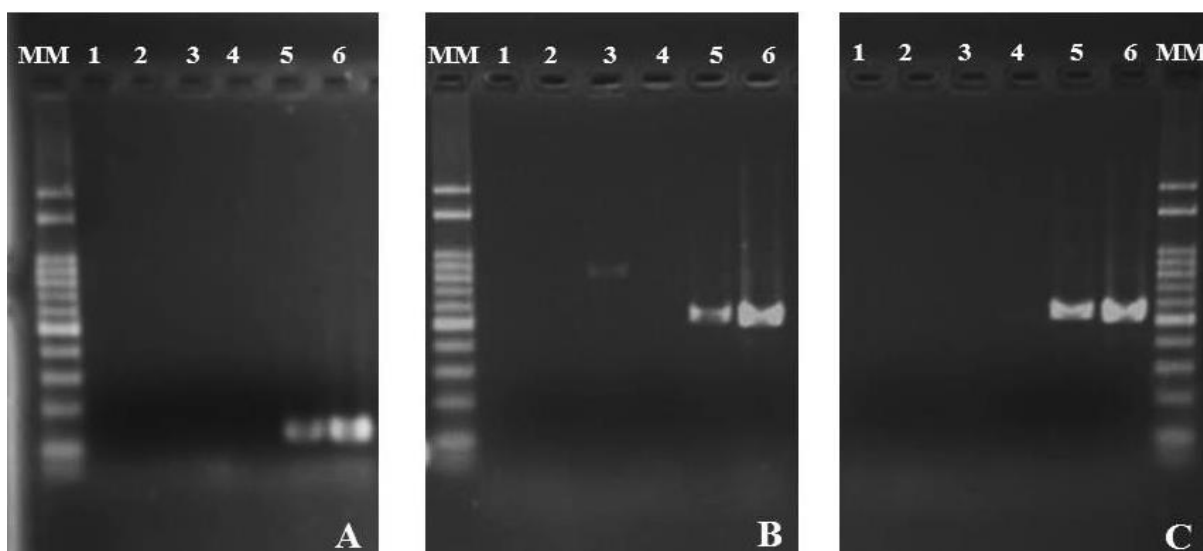


Figura 8. Produtos da PCR para verificar a especificidade dos iniciadores de *F. solani* visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídeo, sob luz UV. A) IGS1, B) IGS3 e C) IGS4. Colunas: 1 - *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (controle negativo), 2 - *F. solani*., 3 - *F. solani*., 4 - *F. solani*, 5 - *F. solani* f. sp. *phaseoli* e 6 - *F. solani* f. sp. *phaseoli*

Os conjuntos IGS1 For/IGS1Rev e IGS3For/IGS3Rev apresentaram melhores resultados não apresentando nenhuma banda inespecífica em comparação com o conjunto IGS2 que apresentou uma banda inespecífica no isolado de *Fusarium* sp. (Figura 8B, coluna 3) com fragmento de aproximadamente 800pb. Assim, os conjuntos IGS1 e IGS3 demonstraram ser específicos para detecção de *F. solani* e foram utilizados para o desenvolvimento do multiplex de detecção dos três patógenos de feijão simultaneamente.

4.3 MULTIPLEX-PCR

4.3.1 Determinação da temperatura ótima de anelamento

De acordo com a Figura 9, as melhores opções para amplificar os fragmentos de *F. solani*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* ocorreram com as temperaturas de anelamento 55°C, 56,5°C (Figura 9A) e 57,6°C (Figura 9B) gerando fragmentos de tamanho esperado. Apenas a temperatura de 60°C não possibilitou a amplificação do DNA de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, quando o DNA dos três patógenos estava na mesma reação e em nenhuma das temperaturas testadas foi observado bandas inespecíficas. Com base nos resultados obtidos a partir do gradiente de temperatura para os três conjuntos de iniciadores, a temperatura de anelamento foi ajustada para 57 °C.

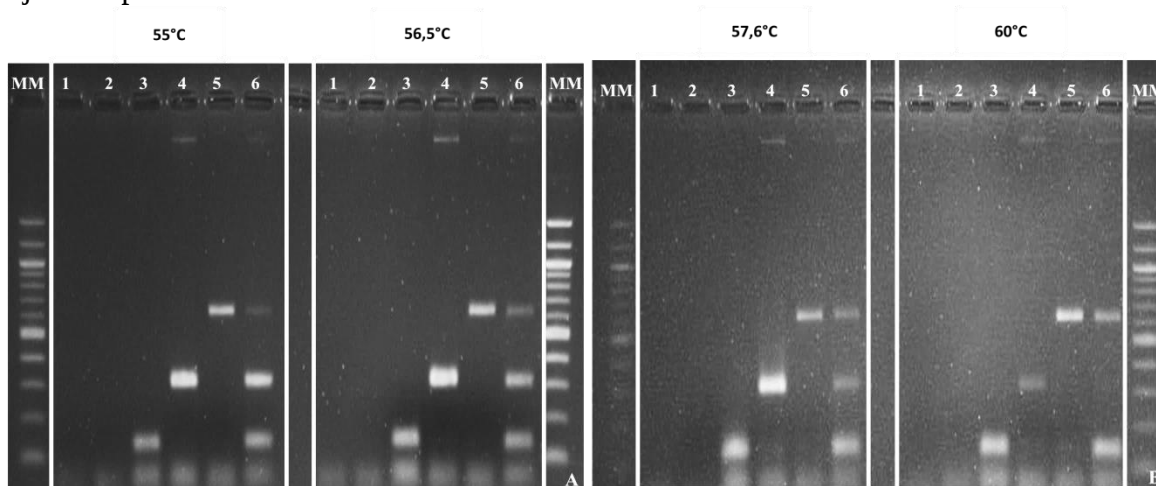


Figura 9. Produtos da m-PCR obtidos com os iniciadores FOR2/REV4 para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (306 pb) e A280/B310 para *F. oxysporum* pv. *phaseoli* (609 pb), visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, sob luz UV. A - Colunas: 1 - controle da reação (água); 2 - controle negativo (*Fusarium* spp.) 3 - *Fus*, *Cff*; 4 - *Cff*, 5 - *Fop*; 6 - *Fus/Cff/Fop* (temperaturas de anelamento 55°C e 56,5°C, respectivamente). B - Colunas: 1 - controle da reação (água); 2 - controle negativo (*Fusarium* spp.) 3 - *Fus*, *Cff*; 4 - *Cff*, 5 - *Fop*; 6 - *Fus/Cff/Fop* (temperaturas de anelamento 57,6°C e 60°C, respectivamente)

A possibilidade de realizar PCR com diferentes conjuntos de iniciadores utilizando o mesmo protocolo gera uma economia de tempo e reagentes, no entanto a especificidade da amplificação depende principalmente das condições empregadas na etapa de anelamento. Como esta etapa envolve hibridação de oligonucleotídeos, a otimização desta temperatura representa um fator essencial para o sucesso do processo. Baixas temperaturas de anelamento aumentam a probabilidade de ocorrência de hibridizações

inespecíficas, resultando na amplificação de diferentes regiões do DNA. Por outro lado, embora temperaturas muito altas propiciem um grande aumento na especificidade, ocorre um sensível decréscimo do rendimento. Portanto, a temperatura ótima de anelamento localiza-se em um ponto intermediário, onde há maximização de especificidade e rendimento. A temperatura de anelamento é especialmente crítica na amplificação de fragmentos longos de DNA ou, ainda, quando o DNA genômico é utilizado como substrato da reação (Rychlik et al., 1990; Kean et al., 2010).

4.3.2 Padronização da concentração dos iniciadores para detecção de *F. solani*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* por Multiplex-PCR

Os pares de oligonucleotídeos, quando empregados nas diferentes concentrações para detecção de *F. solani*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* simultaneamente foram eficientes não ocorrendo amplificação inespecífica quando o DNA de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *Fusarium* spp. foram adicionados à reação (Figura 10).

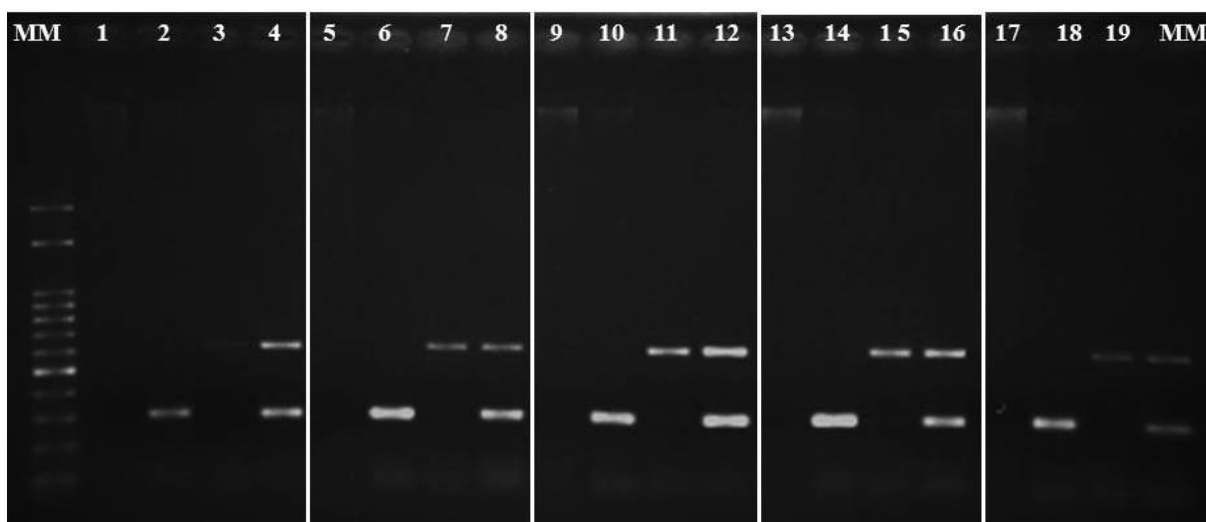


Figura 10. Produtos da multiplex-PCR obtidos com os iniciadores FOR2/REV4 para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (306 pb) e A280/B310 para *F. oxysporum* pv. *phaseoli* (609 pb), visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, sob luz UV. Colunas: 1 - controle negativo; 2 - *Cff*; 3 - *Fop*; 4 - *Cff/Fop* (concentração 0,2 μ M); 5 - controle negativo; 6 - *Cff*; 7 - *Fop*; 8 - *Cff/Fop* (concentração 0,4 μ M); 9 - controle negativo; 10 - *Cff*; 11 - *Fop*; 12 - *Cff/Fop* (concentração 0,6 μ M); 13 - controle negativo; 14 - *Cff*; 15 - *Fop*; 16 - *Cff/Fop* (concentração 0,8 μ M); 17 - controle negativo; 18 - *Cff*; 19 - *Fop*; 20 - *Cff/Fop* (concentração 1,0 μ M)

A m-PCR para diferenciar *F. solani*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* foi realizada com base no protocolo otimizado para m-PCR, adicionando os iniciadores específicos para *F. solani*. Não foi necessário alterar a temperatura de anelamento e a quantidade de ciclos da reação foi mantida, uma vez que os iniciadores amplificaram fragmentos de tamanho esperado (143pb) nessas condições. A análise dos fragmentos amplificados utilizando o conjunto IGS1For/IGS1Rev na multiplex-PCR ocorreu sem problemas de sobreposição dos fragmentos (Figura 11).

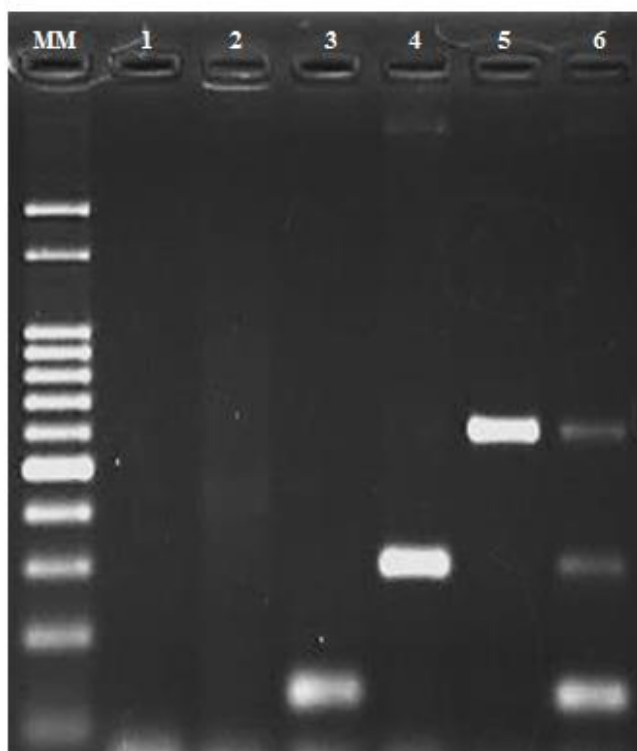


Figura 11. Produtos da m-PCR obtidos com os iniciadores FOR2/REV4 para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (306 pares de base), A280/B310 para *F. oxysporum* pv. *phaseoli* (609 pb) e IG1For/IGS1Rev para *Fusarium solani* (143 pb) visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, sob luz UV. Colunas: 1 – *Fusarium solani*; 2 - *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, 3 - *F. oxysporum* pv. *phaseoli*, 4 - *F. oxysporum* pv. *phaseoli*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *Fusarium solani*, respectivamente e 5 – Controle negativo

4.3.3 Multiplex-PCR direto das sementes

No presente estudo, foi observada a incidência de *Fusarium* spp. em todas as cultivares analisadas (Tabela 11), sendo que as cultivares BRS Estilo, BRS Esplendor, BRSMG Realce, BRS Executivo, Pérola e linhagens CNFC 10467 e CNFC 11984

apresentaram índices de infecção superiores a 5%. Trata-se de uma comprovação preocupante, pois este fungo tem a capacidade de sobreviver no solo, na forma de clamidósporos, e é disseminado por sementes contaminadas e/ou infectadas. No entanto, os resultados obtidos a partir da análise das sementes (Tabela 11) diferiram dos resultados da m-PCR desenvolvida para detecção de *F. solani*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas amostras de sementes a partir do DNA total das sementes.

Tabela 11. Resultados das análises de sanidade de sementes de feijoeiro-comum com os testes blotter e rolo de papel, mostrando a porcentagem (%) de sementes com *Fusarium* spp.

Amostra	Mês/Ano	Cultivar	Método de análise		
			Blotter teste (%)	Rolo de papel (%)	Multiplex-PCR
1	nov/13	BRS Estilo	17,5	33,0	-
2	nov/13	BRS Estilo	10,0	36,0	-
3	nov/13	BRS Estilo	9,5	47,0	-
4	nov/13	BRS Estilo	9,0	57,5	-
5	nov/13	BRS Estilo	10,5	45,0	-
6	nov/13	BRS MG Realce	13,0	4,0	-
7	nov/13	BRS Esplendor	5,5	8,5	-
8	nov/13	BRS Estilo	4,5	19,5	-
9	nov/13	BRS Estilo	3,0	10,0	-
10	nov/13	BRS Requite	4,0	2,5	-
11	nov/13	BRS Notável	7,5	8,0	-
12	nov/13	BRS Executivo	9,0	3,0	-
13	nov/13	CNFC 11984	6,5	1,0	-
14	nov/13	BRS Executivo	6,0	0,5	-
15	nov/13	CNFC 10467	10,0	13,5	-
16	nov/13	Pérola	8,0	2,5	-
17	dez/13	BRS Estilo	8,5	57,5	-
18	dez/13	BRS Estilo	7,5	48,5	-
19	dez/13	BRS Estilo	7,0	57,5	-
20	dez/13	BRS Estilo	10,0	40,0	-
21	dez/13	BRS Estilo	8,5	43,5	-
22	dez/13	BRS Estilo	3,5	20,0	-
23	dez/13	BRS Estilo	8,0	52,5	-
24	dez/13	BRS Estilo	10,0	0,0	-
25	dez/13	BRS Estilo	7,5	46,5	-
26	jul/14	BRS Cometa	Controle positivo	Controle positivo	+
27	jul/14	Vermelho	Controle positivo	Controle positivo	+
28	jul/14	Feijão	Controle positivo	Controle positivo	+
29	jul/14	Feijão	Controle positivo	Controle positivo	+
30	jul/14	Feijão	Controle positivo	Controle positivo	+

(-) Ausência do patógeno

(+) Presença do patógeno

A metodologia empregada para extração do DNA total, além de liberar o DNA, possui a capacidade de inativar nucleases durante o processo de extração (Wang et al.

(1993). Le et al. (2010) também utilizaram o método de extração do DNA total por lise alcalina de sementes para detecção de nove vírus por RT-LAMP que acometem a cultura do arroz. Wei Wei et al. (2012) obtiveram sucesso ao realizar a extração alcalina para obter o extrato bruto das sementes para detecção do vírus do mosqueado (*Bean pod mottle virus*) em sementes de soja.

As amostras quando submetidas a m-PCR apresentaram resultados negativos para os respectivos patógenos. Entretanto, as amostras tidas como controles positivos coletadas em campos experimentais da Embrapa Arroz e feijão apresentaram fragmentos de 609 pb na m-PCR, confirmando a presença de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* nas sementes (Figura 12). Esse resultado sugere que as amostras submetidas aos testes convencionais apresentaram outras espécies de *Fusarium* que não a patogênica, evidenciando a importância da disponibilização de um método rápido como a m-PCR, que consiga detectar qual a espécie do patógeno que está presente num lote de sementes, permitindo a tomada de decisão mais apropriada quanto ao seu destino e quanto ao melhor tratamento químico ou manejo e controle de doenças na cultura. Além disso, a m-PCR desenvolvida propicia redução de custo e tempo de realização do diagnóstico de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em comparação a métodos rotineiros, como teste blotter e meios de cultura, de 10 dias para 3 horas.

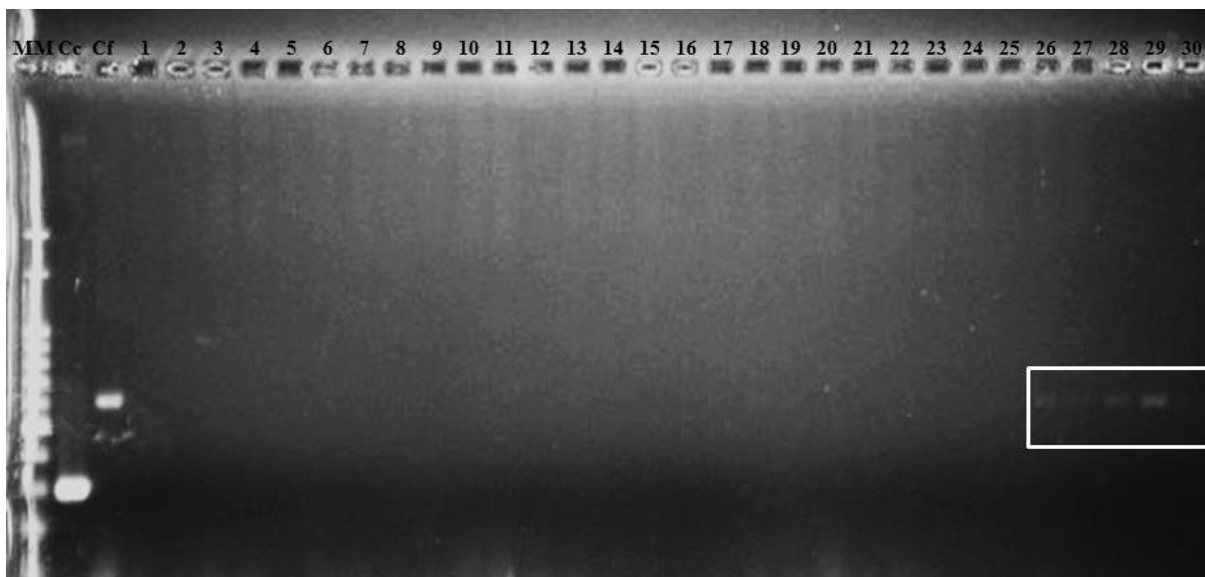


Figura 12. Produtos da m-PCR utilizando extrato bruto das sementes obtidos pelo método extração alcalina. Colunas: C - controle positivo *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; 2 - controle positivo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Linhas 1 a 30 amostras de sementes, respectivamente

Sousa et al. (2014) desenvolveram um protocolo utilizando PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijão. O fator de virulência *ftf1* foi utilizado para desenho dos iniciadores. Lotes de sementes de feijão com incidência de infecção variando de 0,25-20% foram preparados por mistura de quantidades conhecidas de sementes infectadas e livres do patógeno. Os iniciadores produziram um produto de amplificação de 63 pares de bases para isolados altamente virulentos de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Em sementes, o ensaio de qPCR foi capaz de detectar sementes infectadas no nível mais baixo de infecção testada (0,25%). Entretanto, os métodos de extração avaliados neste estudo demandam muito tempo o que inviabiliza o diagnóstico rápido do patógeno.

No teste de sanidade de sementes não foram encontradas bactérias, o que foi confirmado quando as amostras foram submetidas a m-PCR utilizando o DNA total das sementes. Silva et al. (2013) também não obtiveram resultados satisfatórios ao utilizar extrato bruto de sementes para detectar simultaneamente a presença de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Estes resultados podem estar relacionados, possivelmente pela presença de inibidores de PCR.

4.4 LAMP – LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION PARA DETECÇÃO DE *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*

4.4.1 Especificidade dos iniciadores externos F3/B por PCR convencional

A amplificação dos iniciadores externos ocorreu em 17 dos 20 pares de primers obtidos (LAMP1, LAMP2, LAMP3, LAMP4, LAMP6, LAMP7, LAMP8, LAMP9, LAMP10, LAMP12, LAMP13, LAMP14, LAMP15, LAMP16, LAMP17, LAMP18 e LAMP19), em que fragmentos de 200 pb a 690 pb foram visualizados (Figura 13). Os dois isolados utilizados (CNPAF-FOP-46 e CNPAF-FOP-122) não apresentaram diferenças quanto ao tamanho dos fragmentos amplificados. No entanto, cada par de iniciadores amplificou fragmentos de tamanhos distintos, pois foram desenhados a partir de diferentes regiões dentro do mesmo gene. Almasi et al. (2013) também utilizaram a PCR convencional para confirmar a especificidade dos iniciadores externos utilizados para detecção de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* empregando a técnica de LAMP, em que,

fragmentos de 153 pb foram visualizados quando os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídeo.

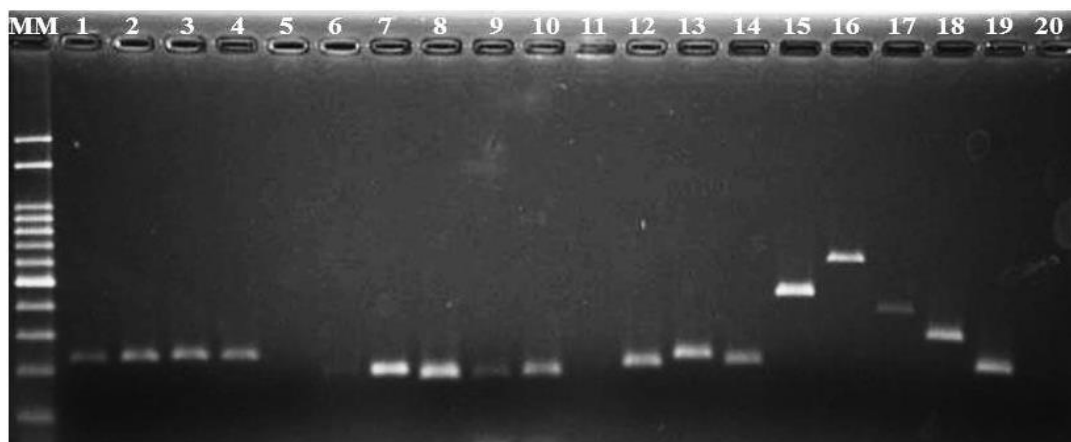


Figura 13. Produtos da PCR obtidos com os iniciadores externos F3/B3, visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, sob luz UV. Colunas: 1 - LAMP1, 2 - LAMP2, 3 - LAMP3, 4 - LAMP4, 5 - LAMP5, 6 - LAMP6, 7 - LAMP7, 8 - LAMP8, 9 - LAMP9, 10 - LAMP10, 11 - LAMP11, 12 - LAMP12, 13 - LAMP13, 14 - LAMP14, 15 - LAMP15, 16 - LAMP16, 17 - LAMP17, 18 - LAMP18, 19 - LAMP19 e 20 controle negativo, respectivamente

4.4.2 Otimização das reações de LAMP

As condições iniciais utilizado para otimizar o sistema LAMP foi proposta por Notomi et al. (2000) mas, no entanto, estas condições não permitiram detectar o gene *ftf1* de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Figura 14).

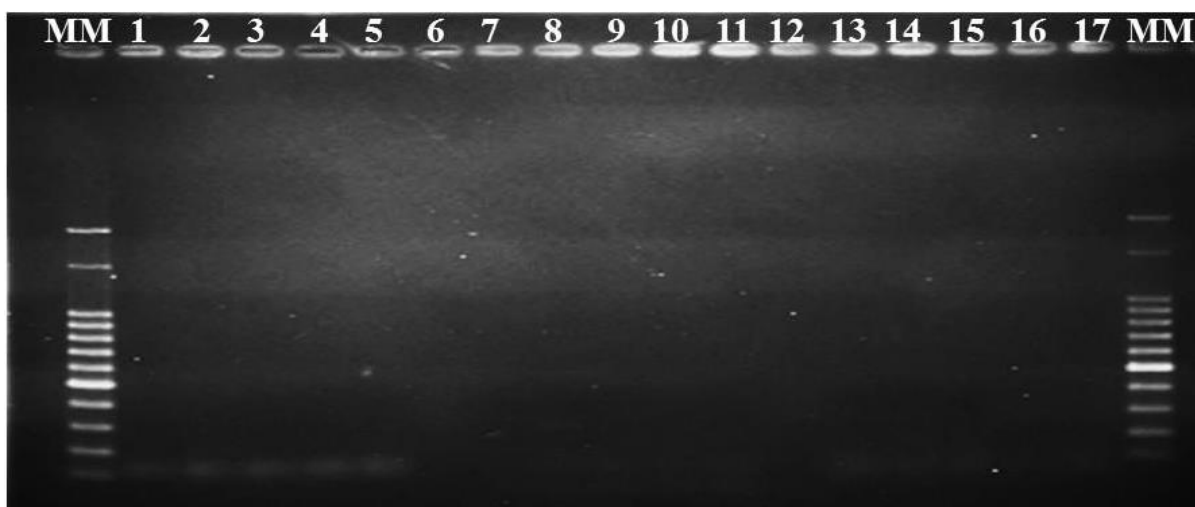


Figura 14. Produtos de LAMP obtidos correspondentes a reações LAMP utilizando 17 conjuntos de iniciadores LAMP, nas condições propostas por Notomi (2000). Colunas 1 - LAMP1, 2 - LAMP2, 3 - LAMP3, 4 - LAMP4, 5 - LAMP6, 6 -

LAMP7, 7 - LAMP8, 8 - LAMP9, 9 - LAMP10, 10 - LAMP11, 11 - LAMP13, 12 - LAMP14, 13 - LAMP15, 14 - LAMP16, 15 - LAMP17, 16 - LAMP18, 17 - LAMP19 e 18 - controle negativo

Conforme demonstrado nas Figuras 15A e 15B os iniciadores revelaram-se funcionais apenas para a amplificação com grandes quantidades de DNA alvo, sobretudo proveniente de alíquotas de produtos de PCR do gene *ftf1*, previamente amplificado a partir de uma amostra controle positivo com os respectivos iniciadores externos (F3/B3). Santos (2011) também relatou a necessidade de utilizar alíquotas de DNA previamente amplificado com os iniciadores externos, uma vez que os iniciadores projetados para amplificar o gene *Tams1* apresentaram-se pouco eficazes, com um limite de detecção bastante deficiente. Quando comparamos os produtos gerados utilizando os iniciadores nas concentrações de 1,6 e 2,4 μM , é possível visualizar bandas mais intensas semelhantes a uma escada, quando os iniciadores internos foram empregados na concentração de 2,4 μM (Figura 15B).

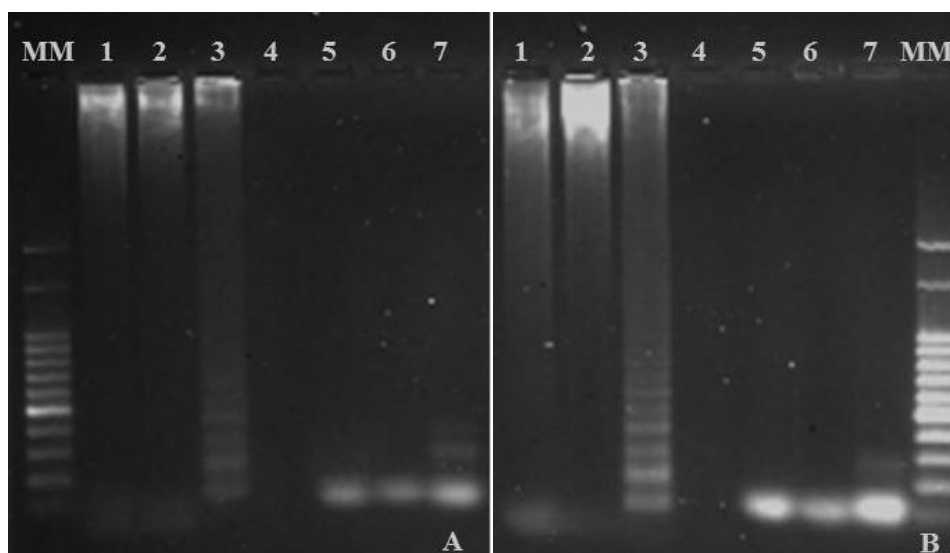


Figura 15. Detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* por LAMP baseados nas diferentes concentrações de iniciadores internos e MgCl_2 . A) Conjunto de iniciadores nº 13 descrito na Tabela 10, colunas: 1 - controle negativo; 2 - LAMP e 3 - LAMP com produtos de PCR amplificados com os iniciadores internos na concentração de 1,6 μM com MgCl_2 nas reações. Colunas: 5 - Controle negativo; 6 - LAMP e 7 - LAMP com produtos amplificados com os iniciadores externos, na concentração de 1,6 μM sem MgCl_2 nas reações. B) Conjunto nº 15, colunas: 1 - controle negativo; 2 - LAMP e 3 - LAMP com produtos de PCR amplificados com os iniciadores internos na concentração de 2,4 μM com MgCl_2 nas reações. Colunas: 5 - Controle negativo; 6 - LAMP e 7 - LAMP com produtos amplificados com os iniciadores externos na concentração de 2,4 μM sem MgCl_2 nas reações

Os resultados demonstraram ainda que o MgCl_2 é um fator que possui grande influência nas amplificações, uma vez que, a disponibilidade de Mg^{2+} afeta a hibridação do iniciador ao DNA e consequentemente a atividade da DNA polimerase. Zhang et al. (2013) também relataram a importância do MgCl_2 nas reações após a realização de ensaios testando diferentes concentrações de MgCl_2 (2 a 12 mM). Os autores verificaram que nenhum produto foi amplificado quando a concentração de Mg^{2+} era inferior a 4 mM, enquanto que os máximos de produtos apareceram quando a concentração de Mg^{2+} era de 8 mM. Wei Wei et al. (2012), também relataram a necessidade de ajustar a concentração de MgCl_2 nas reações de RT-LAMP para detecção de *Bean pod mottle virus* em sementes de soja.

Mori et al. (2001) também ressaltaram a importância do MgCl_2 nas reações de LAMP, uma vez que, a reação de amplificação do DNA libera íons pirofosfato a partir da ligação de dNTPs, sendo que esses íons reagem com os íons Mg^{2+} formando pirofosfato de magnésio, o qual é um subproduto da reação insolúvel. Este subproduto da reação gera um precipitado (o qual não é formado nas reações de PCR convencional) que possibilita verificar o resultado da reação LAMP sem a necessidade de eletroforese. A partir deste subproduto, é possível diferenciar as reações positivas em relação às negativas, através da turbidez, ao olho nu ou utilizando um espectrofotômetro, de forma que os resultados positivos apresentam uma solução turva em relação aos negativos, ou centrifugando os tubos e observando a presença (positivos) ou não do acúmulo de precipitado em cada tubo. Ainda de acordo com os mesmos autores, quando o MgCl_2 foi adicionado as reações de LAMP na concentração de 4 mM houve um aumento na produção do precipitado (turbidez).

Após a padronização das concentrações dos iniciadores e verificar a relevância do MgCl_2 nas reações de LAMP, o mesmo protocolo foi aplicado nas reações de LAMP para todos os conjuntos de iniciadores utilizando apenas o DNA na concentração de 25 ng/ μL . Entretanto, mesmo após a padronização das reações, nenhum iniciador foi capaz de amplificar o DNA na concentração de 25 ng/ μL (Figura 16).

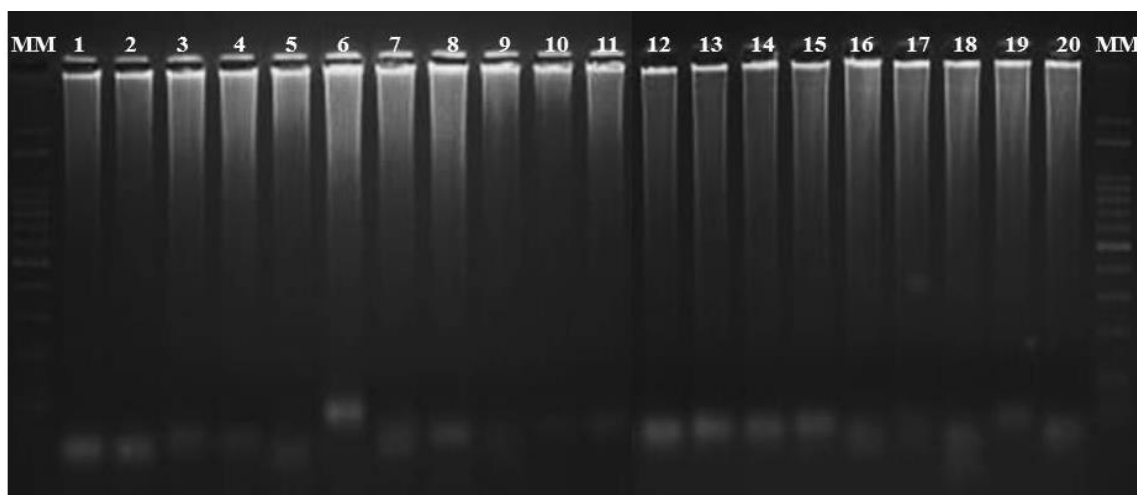


Figura 16. Produtos de LAMP utilizando o conjunto de iniciadores LAMP 13 e 15. Colunas: 1, 2 - controles negativos; 3 - LAMP1, 4 - LAMP2, 5 - LAMP3, 6 - LAMP4, 7 - LAMP6, 8 - LAMP7, 9 - LAMP8, 10 - LAMP9, 11 - LAMP10, 12 - LAMP11, 13 - LAMP13, 14 - LAMP14, 15 - LAMP15, 16 - LAMP16, 17 - LAMP17, 18 - LAMP18, 19 - LAMP19, 20 - LAMP 20

A técnica (LAMP) vem sendo recentemente descrita como uma técnica de amplificação de ácido nucleico, rápida, fácil com alta sensibilidade para detecção de fungos, vírus, bactérias e organismos geneticamente modificados. Em nosso estudo, para aperfeiçoar a técnica LAMP para detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* a técnica de LAMP não demonstrou a sensibilidade descrita por Niessen & Vogel (2010), eles utilizaram esse método para a identificação *F. graminearum* em sementes de trigo e cevada, com a utilização de seis pares de primers para a amplificação do gene *goaA*, o qual proporcionou resultado específico e sensível com um limite de detecção de 2 ng/ μ L em menos de 30 minutos.

Contudo, não existem relatos na literatura sobre a aplicação da técnica de LAMP para identificação de espécies de *Fusarium* que infectam o feijoeiro-comum, o que ressalta a importância do nosso estudo, mostrando que a técnica LAMP pode ser utilizada como uma ferramenta rápida, específica e sensível, para a identificação de espécies de *Fusarium* que causam doenças nesta cultura. Entretanto, nesse estudo não foi possível estabelecer um protocolo otimizado para detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Apesar disso, a combinação de tecnologias isotérmicas de amplificação de DNA como o LAMP para detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* ainda carece de ajustes. Em futuro próximo, este método poderá ser uma alternativa adequada para a detecção rápida dos

microrganismos fitopatogênicos que acometem a cultura do feijoeiro, dispensando o uso de termocicladores e géis de agarose.

5 CONCLUSÕES

- A m-PCR apresentada neste estudo permite a detecção específica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *Fusarium solani* simultaneamente;
- A m-PCR desenvolvida propicia redução de custo e tempo de realização do diagnóstico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* de 10 dias para 3 horas;
- A m-PCR mostra-se mais rápido, sensível e específico para a detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. solani* em comparação com os métodos convencionais de Blotter teste e rolo de papel;
- A combinação da m-PCR e a extração rápida do DNA utilizando lise alcalina permite a detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *F. solani* em sementes de feijão;
- Foi possível gerar primers específicos para LAMP; no entanto, o uso da técnica LAMP não permite a detecção de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*;

REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S. Root rots. In: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. (Ed.). **Bean productions problems in the tropics**. 2 ed. Cali: Press Run, 1989. p. 105-158.
- ABREU, Â. D. F. B. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Arroz e Feijão. **Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na região sul de Minas Gerais**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. 3 p. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoPrimSegSafrasSulMG/psementes.htm>. Acesso em: 28 out. 2014.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. New York: Elsevier, 2004, 948 p.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 1996, 885 p.
- ALENCAR, N. E.; WENDLAND, A.; MELO, L. C.; COSTA, J. G. C.; DEL PELOSO, M. J.; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; CÔRTEZ, M. V. C. B. Avaliação fenotípica de genótipos de feijoeiro comum a isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico. p. 957-960
- ALMASI, M. A.; DEHABADI, S. M. H.; MORADI, A.; EFTEKHARI, Z.; OJAGHKANDI, M. A.; AGHAEI, S. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal Plant Pathology & Microbiology**, Chandigarh, v. 4, n. 5, p. 1-7, 2013.
- ALVES-SANTOS, F. M.; RAMOS, B.; GARCÍA-SANCHEZ, M. A.; ESLAVA, A. P.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J. M. A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Epidemiology**, Baltimore, v. 92, n. 3, p. 237-244, 2002.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do Feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. REZENDE, A. J. A. M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, v. 2, 1997. p. 373-375.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006, 374 p.
- BORÉM, A. Biotecnologia e sementes. In: Zambolim, L. (Ed). **Sementes: qualidade sanitária**. Viçosa: UFV, p.1-34, 2005
- BRADBBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. London: Farhan House C.A.B.

International, 1986, 332 p.

BRANDFASS, C.; KARLOVSKY, P. Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. **BMC Microbiology**, Londres, v. 6, n. 4, p. 1-10, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília, p. 399, 2009.

CARDOSO, C. O. N.; KIMATE, H.; FERNANDES, N. G. **Nota sobre a ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, v. 23, p. 273-276, 1966.

CARNEIRO, J. E.; PAULA JUNIOR, T. J. D.; BORÉM, A. **Feijão do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2015.

CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; NGUYEN, P. N.; CASKEY, C. T. Detection screening of the duchene muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, n. 23, p. 11141-11156, 1988.

CHAVARRO, C. A.; LOPEZ, G. C. A.; LENNE, J. M. Características y pathogenicidad de *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dows. agente causal del marchitamiento bacteriano de *Zornia* spp. y su efecto em el rendimiento de *Z. glaba*. CIAT 7847 y *Phaseolus vulgaris*. **Acta Agronomica**, Palmira, v. 35, n. 2, p. 64-79, 1985.

COLLINS, M. D.; JONES, D. Reclassification of *Corynebacterium flaccum faciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsttia* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov. **Journal of General Microbiology**, Spencers Wood, v. 129, n. 11, p. 3545-3548, 1983.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento Janeiro/2015**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_09_09_00_21_boletim_graos_janeiro_2015.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2015.

COSTA, H.; FERRÃO, M. A. G.; VENTURA, J. A.; LIBERATO, J. R.; PACOVA, B. E. V. **Murcha de fusarium do feijoeiro**. Vitória: EMCAPA, 1993.

DEBOUCK, D. Common beans - research for crop improvement. In: SCHOONHOVEN, A. V.; VOYSESR, O. (Ed.). **Systematics and morphology**. Cali: CAB International, 1993. p. 55-118.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: versão II. **Molecular Biology Reporter**, Atenas, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.

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

DESJARDINS, A. E.; MANANDHAR, G.; PLATTNER, R. D.; MARAGOS, C. M.; SHRESTHA, K.; MCCORMICK. Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n.4, p. 1377-1383, 2000.

DEUNER, C. C.; BARBOSA, J. F.; SOUZA, R. M.; MACHADO, J. C. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro no estado de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1., S194, 2006.

DEUNER, C. C.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B.; FIGUEIRA, A. R.; CAMERA, N. 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**, Botucatu, v. 38, n. 1, p. 48-53, 2012.

DUAN, Y.; ZHANG, X.; GE, C.; WANG, Y.; CAO, J.; JIA, X.; WANG, J.; ZHOU, M. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. **Scientific Reports**, London, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2014.

DUGGAL, A.; DUMAS, M. T.; JENG, R. S.; HUBBES, M. Ribosomal variation in six species of *Fusarium*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 140, n. 1, p. 35-49, 1997.

EDWARDS, M. C.; GIBBS, R. A. Multiplex PCR: Advantages, development and applications. **Genome Research**, New York, v. 3, n. 4, p. 65-75, 1994.

ELNIFRO, E. M.; ASHSHI, A. M.; COOPER, R. J.; KLAPPER, P. E. Multiplex PCR: optimization and applications in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 4, p. 559-570, 2000.

DOWNES, F. P.; ITO, H. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. In: FARBER, J. M.; GENDEL, S. M.; TYLER, K. D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W. L.; FRITSCHER, S. J.; BARRETT, T. J. **Molecular typing and differentiation**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 127-158.

EIKEN CHEMICAL COMERCIAL LTDA. **The principle of LAMP method**. Shanghai, 2000. Disponível em: <<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>>. Acesso em: 08 jul. 2014.

FARIA, C. B.; LUMI ABE, C. A.; SILVA, C. N. D.; TESSMANN, D. J.; BARBOSA-TESSMANN, I. P. New PCR assay form the identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinas*, and other species of the *Gibberella fujikuroi* complex **International Journal of Molecular Sciences**, Basileia, v. 13, n. 1, p. 115-132, 2012.

FERNANDES, E. C.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. Podridões radiculares e murcha de fusarium. In: DALLA PRIA, M. S., O. C (Ed.). **Doenças do feijão: doenças e controle**. 1. ed. Ponta Grossa UEPG, 2010. p. 107-116.

FORSYTH, S. F. Regulatory issues and approaches for plant disease biocontrol. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 12, n. 3, p. 318-321, 1990.

FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 43, n. 1, p. 337-359, 2005.

GANDRA, E. A. **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. 2006. 82 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial)–Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2006.

GEISER, D. M.; JIMÉNEZ-GASCO, M. D. M.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'Donnell, K. Fusarium-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 1, p. 473-479, 2004.

GILL, P.; GHAEMI, A. Nucleic acid isothermal amplification technologies - A review. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, New York, v. 27, n. 3, p. 224-243, 2008.

GODOY, P.; COLOMBO, A. L. Biologia e relevância clínica das espécies do gênero *Fusarium*. **Prática Hospitalar**, São Paulo, v. 6, n. 34, p. 136-140, 2004.

GOULART, A. C. Fungos em sementes de soja: detecção e importância. Dourados: Embrapa-CPAO, p. 58, 1997.

HARTER, L. L. A *Fusarium* diseases of beans. **Phytopathology**, Saint Paul, Minn, v. 19, n. 99, p. 84, 1929.

HEDGES, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* Nov. Sp. **Science**, Washington, v. 55, n. 1425, p. 433-434, 1922.

HEDGES, F. Bacterial wilt of beans (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges) including comparisons with *Bacterium phaseoli*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 16, n. 1, p. 1-22, 1926.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; DLOUHY, S. R.; VANCE, G. H.; VOGT, P. H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Research Reports**, Natick, v. 23, n. 3, p. 504-511, 1997.

HERBES, D. H.; THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C.; DAL PIVA, C. A.; ABREU, L. Detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro produzidas em Santa Catarina. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 153-156, 2008.

HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S.; ITANO, E. N.; HOMECHIN, M.; KAWAMURA, O.; GARCIA, G. T.; BERND, L. P.; SILVA, M.; FUJII, S.; MASSARO JÚNIOR, A. L.; SCHIABEL, V. C.; MORENO, E. C.; FIGUEIRA, E. L. Z.; FUNGARO, M. H.; ONO, M. A.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; GERAGE, A. C., Micotoxinas em grãos armazenados: Monitoramento e controle na perda de qualidade pós-colheita. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 40,2007, Maringá. **Resumos...** Maringá: SBFITO, 2007. p. 34-36.

JONES, J. P.; MILLER., W. Fusarium wilt in tomato. **Plant Pathology Circular**, Loughborough, n. 237, 1982.

JURADO, M.; VÁSQUEZ, C.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; GONZÁLEZ-JAÉN, M. T. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. **Sistematic and Applied Microbiology**, New York, v. 29, n. 8, p. 681-689, 2006.

KEAN, O. W. Using the gradient technology of the Mastercycler pro to generate a single universal PCR protocol for multiple primer sets. **Eppendorf**, Malasya, v. 220, p. 2010.

KENDRICK, J. B.; SNYDER, W. C. *Fusarium* yellows of beans. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 32, n. 11, p. 1010-1014, 1942.

KISTLER, H. C. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 4, p. 479-479, 1997.

LE, D. T.; NETSU, O.; UEHARA-ICHIKI, T.; SHIMIZU, T.; CHOI, I.; OMURA, T.; SASAYA, T. Molecular detection of nine rice viruses by a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. **Journal of Virology Methods**, New York, v. 170, n. 1-2, p. 90-93, 2010.

LEAL, P. D. C.; CANTANHEDE, K. D. L.; SILVA, L. M.; BEZERRA, G. F. D. B.; VIANA, G. M. D. C.; NASCIMENTO, M. D. D. S. B. **Micotoxinas do *Fusarium* e seu potencial carcinogênico**. 70. ed. São Paulo, 2005.

LEITE JR., R. P.; MENEGUIM, L.; BEHLAU, F.; RODRIGUES, S. R.; BINCHINI, A. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 26, n. 1, p. 303, 2002.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. 5. ed. Oxford: Blackwell, 2006, 387 p.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Inglaterra, v. 59, n. 3, p. 107-117, 2001b.

LI, B.; DU, J.; LAN, C. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, n. 4, p. 903-911, 2013.

LI, X.; BOER, S. H. D. Stection of Polimerase Chain Reaction primers from an RNA intergenic spacer region specif detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. **Disease Detection and Losses**, Saint Paul, v. 85, n. 8, p. 837-842, 1995.

LIMA JUNIOR, M. J.V. **Manual de Procedimentos para Análise de Sementes Florestais**. - Manaus: UFAM, 2010, 146p.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 85-101, 2001.

MARINGONI, A. C.; CAMARA, R. C. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* detection in bean seeds using a semi-selective culture medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 451-455, 2006.

MARINGONI, A. C.; CAMARA, R. C.; SOUZA, V. L. Semi-selective culture medium for *Curtobacterium flaccumfaciens* isolation from bean seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 34, n. 1, p. 117-124, 2006.

MARINGONI, A. C.; ROSA, E. F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 160-162, 1997a.

MARINGONI, A. C.; ROSA, E. F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 160-162, 1997b.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex Polymerase Chain Reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 16, n. 47, 2002.

MENEZES, M.; MACHADO, A. L. M.; SILVEIRA, M. C. V.; SILVA, R. L. X. Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* com espécies de *Trichoderma* aplicadas no tratamento de sementes de feijão e no solo. **Anais... Recife: Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, 2004. p. 133-140.

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

MOSS, M. O. Mycotoxin review – 2. Fusarium. **Mycologist**, Cambridge, v. 16, n. 4, p. 158-161, 2002.

MULLIS, K. B.; FALOONA, A. F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, New York, v. 115, n. 1, p. 335-349, 1987.

NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Molecular and Cellular Probes**, Londres, v. 16, n. 3, p. 223-229, 2002.

NANODROP TECHNOLOGIES, INC. ND-1000 Spectrophotometer V3.5. **User's Manual**. Wilmington, USA, 2007. 61p.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 7, n. 4, p. 233-252, 1994.

NIESSEN, L.; VOGEL, R. F. Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 2-3, p. 183-191, 2010.

NIMITPHAK, T. **The Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification with Lateral-Flow Dipsticks (LAMP-LFD) to detect infection of hepatopancreatic parvovirus (HPV)**. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Biotecnologia)– Faculdade de Ciências, Tailândia, 2008.

NOTOMI, T.; MORI, Y.; TOMITA, N.; KANDA, H. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) principles, features, and future prospects. **Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 1, p. 1-5, 2015.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 63-68, 2000.

O'DONNELL, K.; CORBY KISTLER, H.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 8, n. 5, p. 709-716, 1995.

PAN, W.; WANG, J.-Y.; SHEN, H.-Y.; ZHAO, M.-Q.; JU, C.-M.; DONG, X.-Y.; YI, L.; CHEN, J.-D. Development and application of the novel visual loop-mediated isothermal amplification of omp25 sequence for rapid detection of *Brucella* sp. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, , v. 10, n. 16, p. 2120-2126, 2011.

PARIDA, M.; POSADAS, G.; INOUE, S.; HASEBE, F.; MORITA, K. Real-Time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 1, p. 257-263, 2004.

PENG, J.; ZHAN, Y.; ZENG, F.; LONG, H.; PEI, Y.; GUO, J. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soil. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 349, n. 2, p. 127-134, 2013.

POPOVIC, T.; BALAZ, J.; NIKOLI, Z.; STAROVI, M.; GAVRILOVI, V.; ALEKSI, G.; VASI, M.; ŽIVKOVI, S. Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. **African Journal of Agricultural Research**, Pretoria, v. 2, n. 19, p. 2730-2736, 2010.

PUHALLA, J. E. *Fusarium*: diseases, biology and taxonomy. In: NELSON, P. E. (Ed.). **Genetic considerations of the genus *Fusarium*** Pennsylvania State 1981. p. 291-305.

RADFORD, S. A.; JOHNSON, E. M.; LEEMING, J. P.; MILLAR, M. R.; CORNISH, J. M.; FOOT, A. B. M.; WARNOCK, D. W. Molecular epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* in a bone marrow transplantation unit by PCR amplification of Ribosomal Intergenic Spacer Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 5, p. 1294-1299, 1998.

RAMOS, B.; ALVES-SANTOS, F. M.; GARCÁ-SÁNCHEZ, M. A.; MARTÍN-RODRIGUES, N.; ESLAVA, A. P.; DÍAZ-MÍNGUEZ. The gene for a new transcription factor (*ftf1*) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* is only expressed during infection of common bean. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, n. 9, p. 864-876, 2007.

RAVA, C.; AIDAR, H.; COSTA, J. G. C.; KLUTHCOUSKI, J. Sementes Infectadas: sustentabilidade das lavouras questionada! **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 115, p. 5-7, 2006.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A.; COSTA, J. G. C. Reação de genótipos de feijão comum ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 296-300, 1996.

RIBEIRO, C. A. G.; FERRAZ, S. Resistência varietal do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, n. 1, p. 37-44, 1984.

RODRIGUES NETO, J. Detecção e identificação de fitobactérias em sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES. Lavras. **Anais...** Fundação Cargill. p. 123-139, 1998.

ROE, B. A.; CRABTREE, J. S.; KHAN, S. A. **DNA isolation and sequencing**. 1 ed. New York: Wiley-Blackwell, 1996, 176 p.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 5, n. 2, 1985.

RYCHLIK, W.; SPENCER, W. J.; RHOADS, R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 21, p. 6409-6412, 1990.

SAETTLER, A. W. Diseases caused by bacteria. In: SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R.; HALL, R.; FORSTER, R. L. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 1991. p. 109.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Toyohashi, v. 239, p. 487-491, 1988.

SANABRIA, N. D. A.; GUADARRAMA, A.; ROMERO, H. Caracterización de especies de *Fusarium* mediante patrones electroforéticos de proteínas. **Revista de la Facultad de Agronomía**, La Plata, v. 28, n.2, p. 161-173, 2002.

SANTOS, M. A. F. **Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de *Theileria annulata***. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina)–Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

SARTORATO, A., Desafios no controle de doenças na cultura do feijoeiro na região Centro-Oeste. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS, DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS DO FEIJOEIRO, 6., 2006, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Agrônômico, 2006. p. 15-17.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. (Ed.) **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3. ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2001. 373p.

SCHEINERT, P.; BEHRENS, B.; KAHLE, D. Optimizing DNA Amplification protocols using the Eppendorf® Mastercycler®. Eppendorf North America, 8 Apr. 2003. Disponível em: <http://www.eppendorfna.com/applications/PCR_appl_protocolsMC.asp> acesso em: 3 Nov. 2005.

SCHUSTER, M. L.; SMITH, M. L. Seed transmission and pathology of *Corynebacterium flaccumfaciens* in *Phaseolus vulgaris*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 26, n. 3, p. 37-38, 1983.

SCHWARTZ, H. F.; SILBERNAGEL, M. G.; MCMILLAN, M. S. Occurrence of *Fusarium* wilt of beans in Colorado. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 73, n. 518, 1989.

SILBERNAGEL, M. J.; SCHWARTZ, H. F. Preliminary report of *Fusarium* wilt of beans in Colorado in 1987. **Annual Report Bean genetics Improvement. Cooperative**, Michigan, v. 31, n.1, p. 60-61, 1988.

SILVA-ABUD, L. L. **Diversidade de *Fusarium* spp. causadores de podridão radicular do feijoeiro comum**. 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2015.

SILVA, F. P. D.; VECHIATO, M. H.; RICARDO, H. EF-1 α gene and IGS rDNA sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* reveals polyphyletic origin of strains. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n.1, p. 64-73, 2014.

SILVA, F.C.; SOUZA, R.M.; ZACARONI, A.B.; LELIS, F.M.V.; FIGUEIRA, A.R. Otimização da técnica de PCR para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.1, p.45-50, 2013.

SMITH, T. K.; SEDDON, I. R. Synergism demonstrated between *Fusarium* mycotoxins. **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 70, n. 25, p. 12-17, 1998.

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. Species concept, genetics, and pathogenicity in *Hypomyces solani*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 44, n. 1, p. 338-342, 1953.

SOUSA, M. V. de.; MACHADO, J. D. C.; SIMMONS, H. E.; MUNKVOLD, G. P. Real-time quantitative PCR assays for the rapid detection and quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* (common bean) seeds. **Plant Pathology**, Brasília, v. 64, n. 2, p. 478-488, 2014.

SUN, J.; NAJAFZADEH, M. J.; VICENTE, V.; XI, L. D.; G.S., H. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 19-24, 2010.

TATIBANA, B. T.; SANO, A.; UNO, J.; KAMEI, K.; IGARASHI, T.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; ITANO, E. N. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 Gene in Sputa by Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. **Journal of clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 23, n. 2, p. 139-143, 2009.

TEGLI, S.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. Washington, v. 35, n. 4, p. 331-337, 2002.

TEMPLE, N. T.; JOHNSON, K. B. Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 4, p. 423-430, 2011.

THEODORO, G. D. F.; MARINGONI, A. C.; CHUMPATI, A. A.; CORREIA, H. C.; THEODORO, J. V. C.; NOGUEIRA, R. J. First report of bacterial wilt of common bean caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in Mato Grosso do Sul. **Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 92, n. 4, p. 107, 2010.

UEMURA, N.; MAKIMURA, K.; ONOZAKI, M.; OTSUKA, Y.; SHIBUYA, Y.; YAZAKI, H. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. **Journal Medical Microbiology**, New York, v. 50, n. 7, p. 50-57, 2008.

UESUGI, C. H.; FREITAS, M. A.; MENEZES, J. R. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro, em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 324, 2003.

VALARINI, P. J. Detecção do agente causal do cretamento bacteriano comum em sementes de feijão. In: MENTEN, J. O. **Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico**. Piracicaba: Esalq, 1991. 321 p.

VIEIRA, A. A. S. **Padronização e aplicação da PCR multiplex na tipificação de *Clostridium perfringens* isolados de suínos diarreicos**. 2006. 34 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

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

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

WANG, H.; QI, M.; CULTER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 17, p. 4153-4154, 1993.

WEI WEI, Q.; YU, C.; ZHANG, S. Y.; MIRIAM, K.; ZHANG, W.; DOU, D.; TAO, X. One-step detection of *Bean pod mottle virus* in soybean seeds by the reverse-transcription loop-mediated isotherma amplification. **Virology**, Washington, v. 7, n. 9, 2012.

WENDLAND, A., MODA-CIRINO, V. DEL PELOSO, M. J., COSTA, J. G. C. OLIVEIRA, M. I. S., LIMA, S. C. D. V., ARAÚJO, L. G. Murcha-de-curtobacterium In: **Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 2012. p. 111-126.

WHITE, J. W. 25 - **Implications of carbon isotope discrimination studies for breeding common bean under water deficits**, In: Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations. 1 ed. San Diego: Academic Press, Inc., 1993.

YOKOYAMA, L. P. **Cultivo do Feijoeiro Comum: Importância econômica**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. 2 p. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/importancia.htm>. Acesso em: 28 ago. 2014

YOKOYAMA, L. P.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. O. (Ed.). **Cultura do Feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996. p. 1-20.

ZAMBOLIM, L.; VIEIRA, C.; ARAUJO, G. A. A. D.; CHAGAS, J. M.; SILVA, C. C. Ocorrencia de murcha-de-fusarium em feijoeiros na Zona da Mata de Minas Gerais **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 3, p. 287-288, 1987.

ZEMANKOVA, M.; LEBEDA, A. *Fusarium* species, their taxonomy, variability and significance in plant pathology. **Plant Protection Science**, Slezská, v. 37, n. 42, p. 25-42, 2001.

ZHANG, X.; ZHANG, H.; PU, J.; QI, Y.; YU, Q.; XIE, Y.; PENG, J. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 In soil. **Plosone**, New York, v. 8, n. 12, 2013.