

5.5.3 Localização de *X. vesicatoria* sobre a parte aérea das plântulas

A localização de *X. vesicatoria* sobre a parte aérea de plantas foi feita em amostras de hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas de plantas de tomate com 14 e 20 dias de idade, produzidas a partir de sementes que foram inoculadas com *X. vesicatoria* por infiltração a vácuo, seguido de semeio em bandejas de isopor contendo substrato comercial para mudas e conduzidas em condições de viveiro.

Os seguimentos do hipocótilo foram caracterizados por apresentar estômatos e tricomas. Os estômatos, definidos quanto a funcionalidade no item 5.3.2, apresentou-se com as células-guarda semi-túrgidas. Observou-se que a população de *X. vesicatoria* reduziu drasticamente, sendo difícil a sua localização sobre a superfície. Foi encontrada uma célula simples, compatível com *X. vesicatoria* próximo ao poro estomático (Figura 17F).

A base dos tricomas pode ser um sítio de exsudação. No entanto observaram-se poucos agregados próximos a esses apêndices (Figura 17 C). Foi localizado um tricoma quebrado (Figura 17D) com o interior oco, sendo esta uma via de entrada para patógenos.

No geral, observou-se que a epiderme dos seguimentos do hipocótilo apresentou baixa colonização de microrganismos.

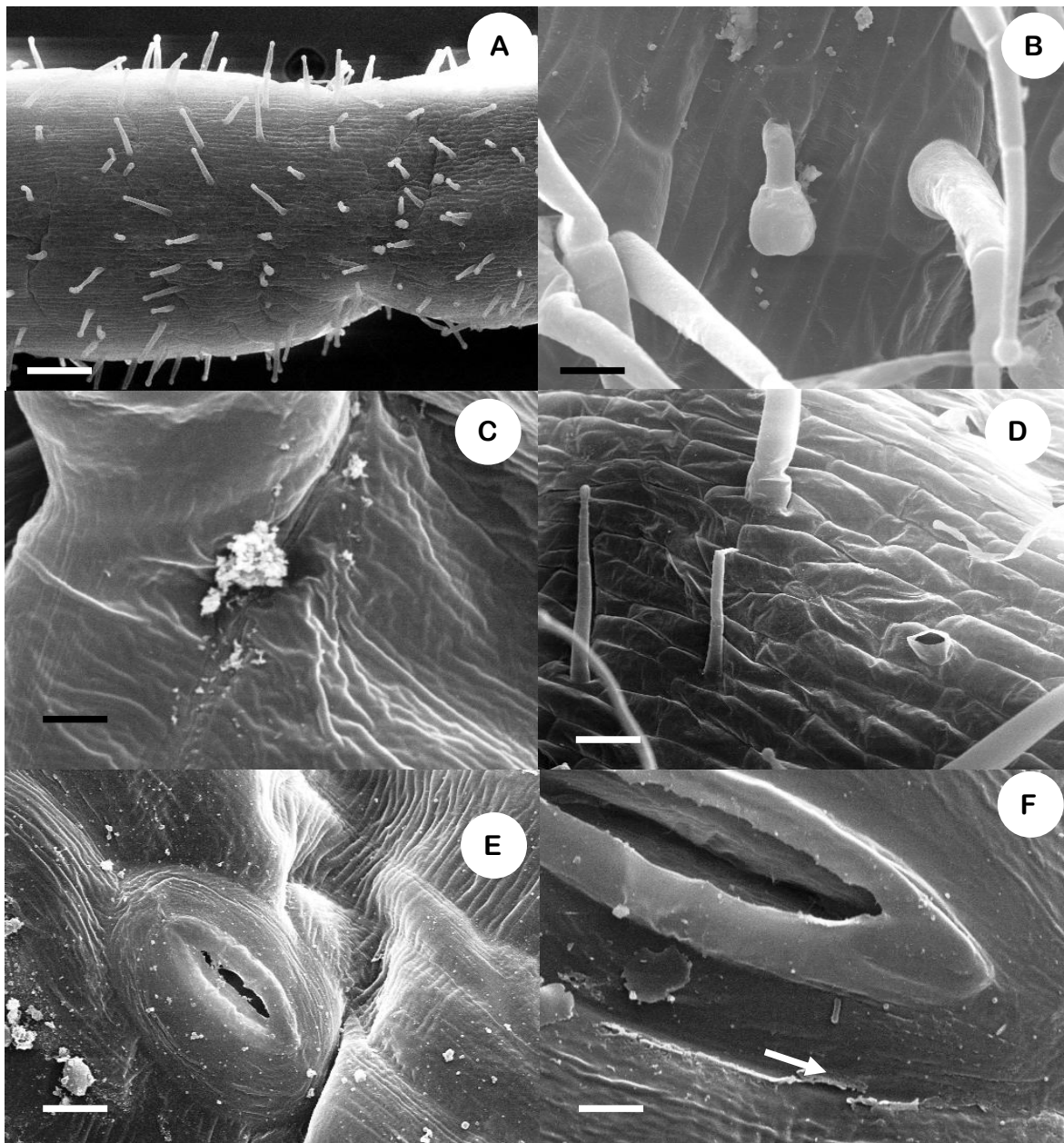


Figura 17 – Eletromicrografias de varredura (MEV) de seguimento do hypocótilo de plântulas de 15 e 20 dias, produzidas a partir de sementes foram inoculadas com *X. vesicatoria* por infiltração a vácuo, semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial para mudas e conduzidas em condição de viveiro. A – visão geral do hypocótilo aos 15 dias, evidenciando o tecido dérmico com seus apêndices (tricomas) (Barra = 133 μm); B – Detalhe dos tricomas. Note ao centro um tricoma glandular (Barra = 27,7 μm); C – microagregados na base dos tricomas (Barra = 2,7 μm); D – Epiderme de hypocótilo aos 20 dias, evidenciando um tricoma quebrado como provável sítio de infecção (Barra = 70 μm); E – Estômato semi-aberto sobre a epiderme (Barra = 7 μm); e F – Célula compatível com *X. vesicatoria* próximo a abertura do poro estomático (Barra = 2,7 μm).

As folhas cotiledonares (Figura 18) e o primeiro par de folhas definitivas (Figura 19) também apresentaram baixa densidade de microrganismos, sendo muito difícil de localizar células de *X. vesicatoria* aderidas na superfície dérmica. No entanto, isolamentos em laboratório, das partes mencionadas, revelaram a presença da fitobactéria em ambas as folhas. Isso leva a crer que a amostra pode não ter sido preparado adequadamente ou a população estar em baixa densidade, reduzindo a probabilidade de visualizar na amostra. KINKEL et al. (1995), relataram que bactérias no filoplano não ocorrem de forma uniforme ao longo da superfície. Os nutrientes da superfície da folha são mais limitados e espacialmente heterogêneos e na maioria das vezes exsudam do apoplasto através de aberturas naturais ou ferimentos (LINDOW e BRANDL, 2003). Desse modo uma estratégia para facilitar a localização de *X. vesicatoria* sobre o filoplano seria definir microsítios específicos da folha, os quais seriam investigados, como por exemplo, microsítios sobre a superfície abaxial (inferior) da folha. Essa face da folha está mais protegida da exposição dos raios UV, e provavelmente, células da fitobactéria teriam maior chance de sobreviver.

MONIER (2002) investigou *P. syringae* sobre o filoplano de feijoeiro e observou que embora a bactéria esteja associada a todas as estruturas anatômicas da folha, *P. syringae* preferencialmente formou agregados na base de tricomas glandulares e esses agregados foram significativamente maiores do que aqueles encontrados em outras partes das folhas (vasos, tricomas unculares ou fendas entre as células epidérmicas).

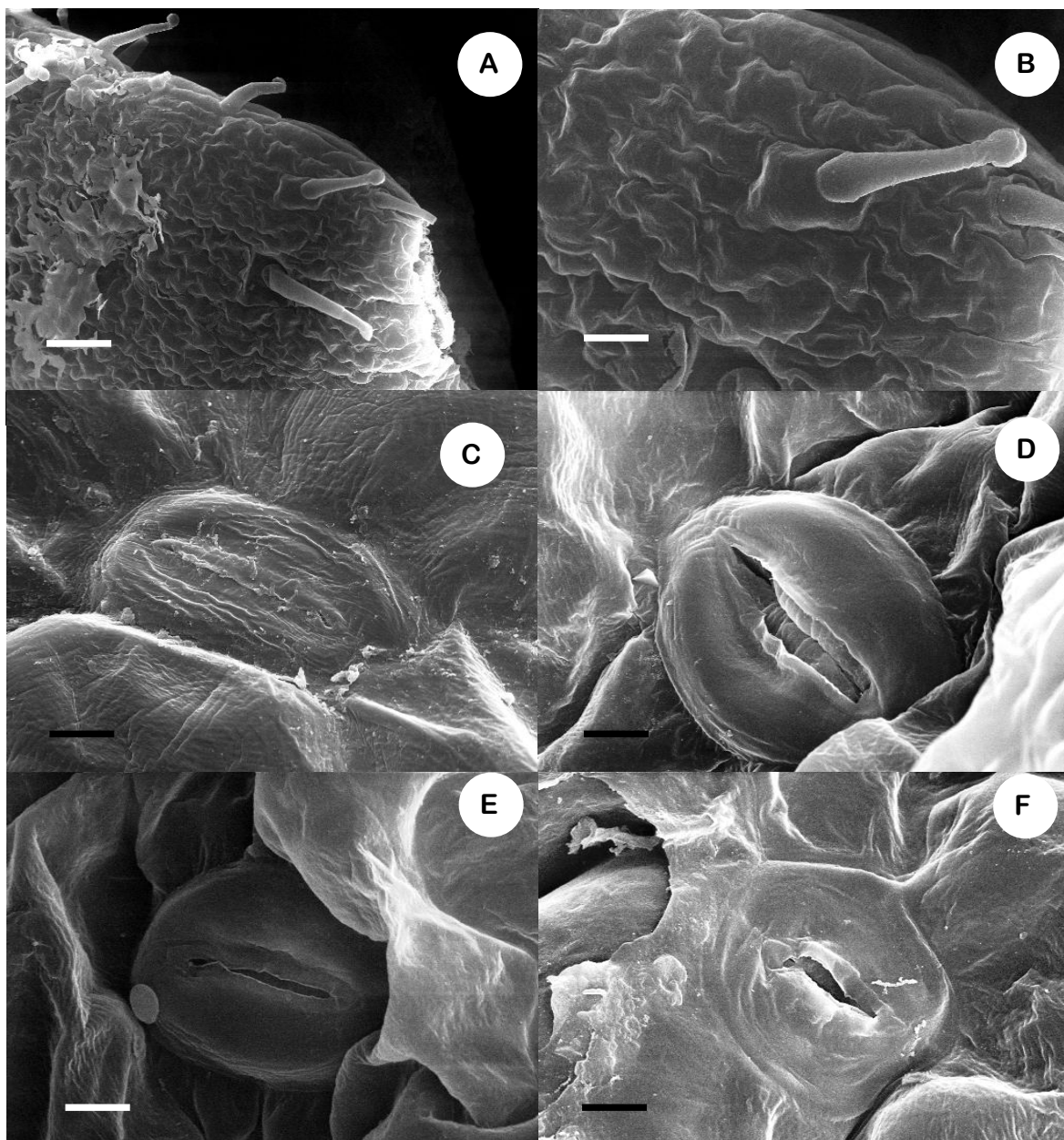


Figura 18 - Eletromicrografias de varredura (MEV) da folha cotiledonar de uma plântula de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, com 20 dias de idade, produzidas a partir de sementes comerciais inoculadas com *X. vesicatoria* (ENA 4483) por infiltração à vácuo e após semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial e cultivadas em casa-de-vegetação. A – Visão geral de um seguimento de folha cotiledonar (Barra = 70 µm); B – Detalhe de um tricoma (Barra = 27,7 µm); C, D, E e F – Estômatos da folha cotiledonar com diferentes aberturas estomáticas (Barras = 7; 4,5; 4,5; 4,5 e 4,5 µm).

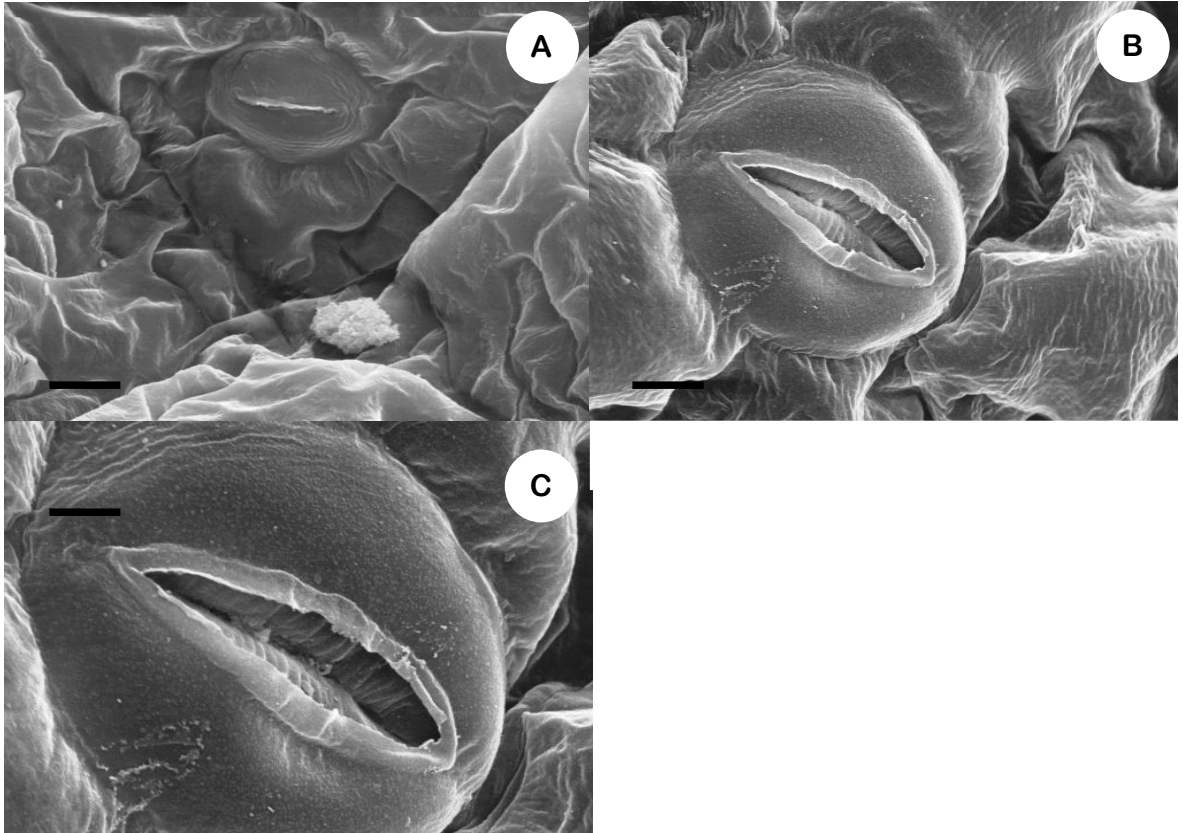


Figura 19 – Eletromicrografias de varredura (FEMV) de uma folha definitiva aos 20 dias de idade, proveniente de planta produzida a partir de sementes inoculadas com *X. vesicatoria* por infiltração a vácuo, semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial e conduzidas em casa-de-vegetação. A – Agregados bacterianos na epiderme do filoplano (Barra = 7 μm); B e C – Estômatos fechados (Barra = 4,5; 2,7 μm).

5.5.4 Ocorrência natural de uma bactéria associada a sementes de tomate

Ao longo de vários ensaios de detecção e quantificação de *X. vesicatoria* em sementes e plântulas observou-se o crescimento freqüente de outros microrganismos, com destaque para *Acinetobacter* sp.

A primeira observação desta bactéria associada às sementes foi feita quando, em experimentos preliminares, testaram-se a eficiência de dois métodos de inoculação (imersão e vácuo) de *X. vesicatoria* em sementes extraídas de frutos frescos não inoculados (Capítulo II). Após essas inoculações, foram montados testes para estudar o comportamento de *X. vesicatoria* nas sementes ao longo de 168 horas. Durante as avaliações, observou-se, em várias amostras, a presença de bactérias endofíticas, que formavam colônias ao redor das sementes, poucas horas após o semeio em meio de cultura NA. O crescimento rápido dessa bactéria, interferiu negativamente no desenvolvimento e na recuperação de *X. vesicatoria*. Com um intuito de eliminar a flora bacteriana das sementes, aplicaram-se diferentes concentrações de NaClO (0; 0,5; 1,25; e 2,4%) antes da inoculação da fitobactéria. Observou-se que apenas a concentração mais alta foi capaz de eliminar essa flora bacteriana. No entanto, o resíduo de hipoclorito também interferiu no desenvolvimento de *X. vesicatoria*.

Esta bactéria foi identificada como *Acinetobacter* sp., por meio de sequenciamento da sub-unidade 16S de RNA ribossomal (Anexo).

Acinetobacter sp. esteve presente durante as avaliações da transmissão de *X. vesicatoria* da plântula para a semente e da semente para a plântula (Capítulos I e II, respectivamente) utilizando sementes extraídas de frutos inoculados com *X. vesicatoria* ainda verdes, produzidos no setor de Horticultura da UFRRJ.

Durante a seleção de amostras para observações em MEV, foram separadas sementes que haviam evidenciado crescimento apenas de *X. vesicatoria*, sementes com crescimento apenas de *Acinetobacter* sp. e crescimento das duas juntas em uma mesma semente.

Observou-se em tegumento com tricomas dispostos em duas posições, deitados e em pé, a presença de *Acinetobacter* sp., tanto na base quanto na extremidade dos tricomas. As células de *Acinetobacter* sp aderidas em fixação apolar distribuídas em monocamada, isoladas ou formando agregados que possuem formato helicoidal (Figura 20F). Misturadas às células de *Acinetobacter*, foram observadas células de *X. vesicatoria* sp., no entanto, em baixa concentração.

Aparentemente, *Acinetobacter* sp. compartilha os mesmos nichos de colonização com *X. vesicatoria*, podendo indicar o fenômeno de exclusão de nicho. Provavelmente, elas competem pelo mesmo sítio. Foi observada pela análise dos resultados de MEV baixa integração física das colônias das duas espécies sobre a superfície dos tegumentos e das radículas recém emergidas. As eletromicrografias de varredura mostram a camada limite entre o tegumento e a radícula (Figura 21A). Na região de fronteira entre tegumento e radícula, observou-se uma imensidão de células de *Acinetobacter* sp. saindo de dentro da semente (Figuras 21 F).

Como foi dito anteriormente, a radícula apresenta sítios de exsudação de metabólitos que provavelmente são utilizadas por microrganismos que habitam a espermosfera e rizosfera. O primeiro deles localiza-se próximo a região de emergência da radícula (Figura 21A). A figura 21E mostra esta região repleta de agregados de *Acinetobacter* sp. Outro local de exsudação de metabólitos é a região próxima da base dos pelos radiculares. A eletromicrografia mostra aumento da concentração de células bacterianas próximos a esta área (Figura 21C). Foram observados também estômatos fechados com células de *Acinetobacter* sp. sobre a superfície (Figuras 21D).

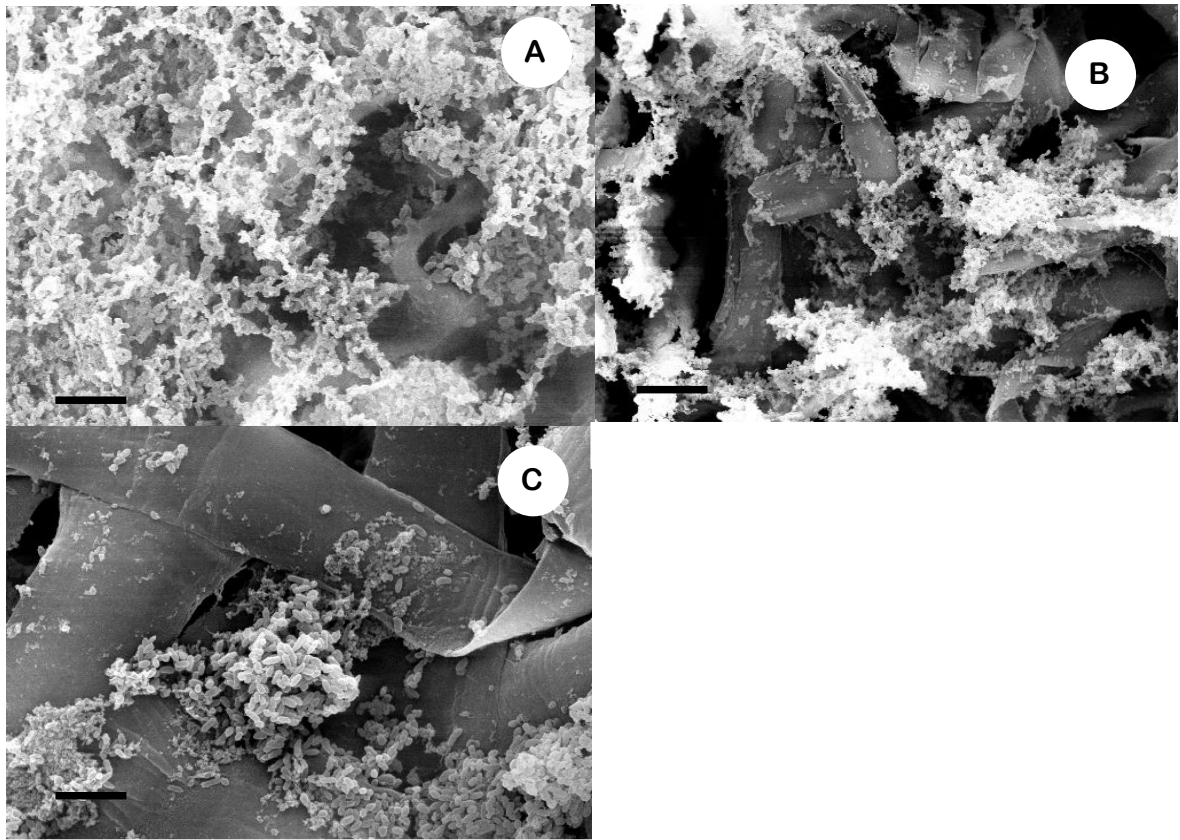


Figura 20 -Eletromicrografiaas de varredura (MEV) da superfície da semente de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, extraída de fruto não inoculado lavada em água destilada estéril e depois inoculada à vácuo com *X. vesicatoria*. Superfície dos tricomas com agregados de *Acinetobacter* sp. A – Intensa colonização de *Acinetobacter* sp. aderidos à base dos tricomas (Barra = 7 μm); B – Tricomas deitados com intensa colonização de *Acinetobacter* sp.sobre a superfície das sementes (Barras = 14); C – Mistura de agregados de *X. vesicatoria* com agregados de *Acinetobacter* sp.(2,7 μm).

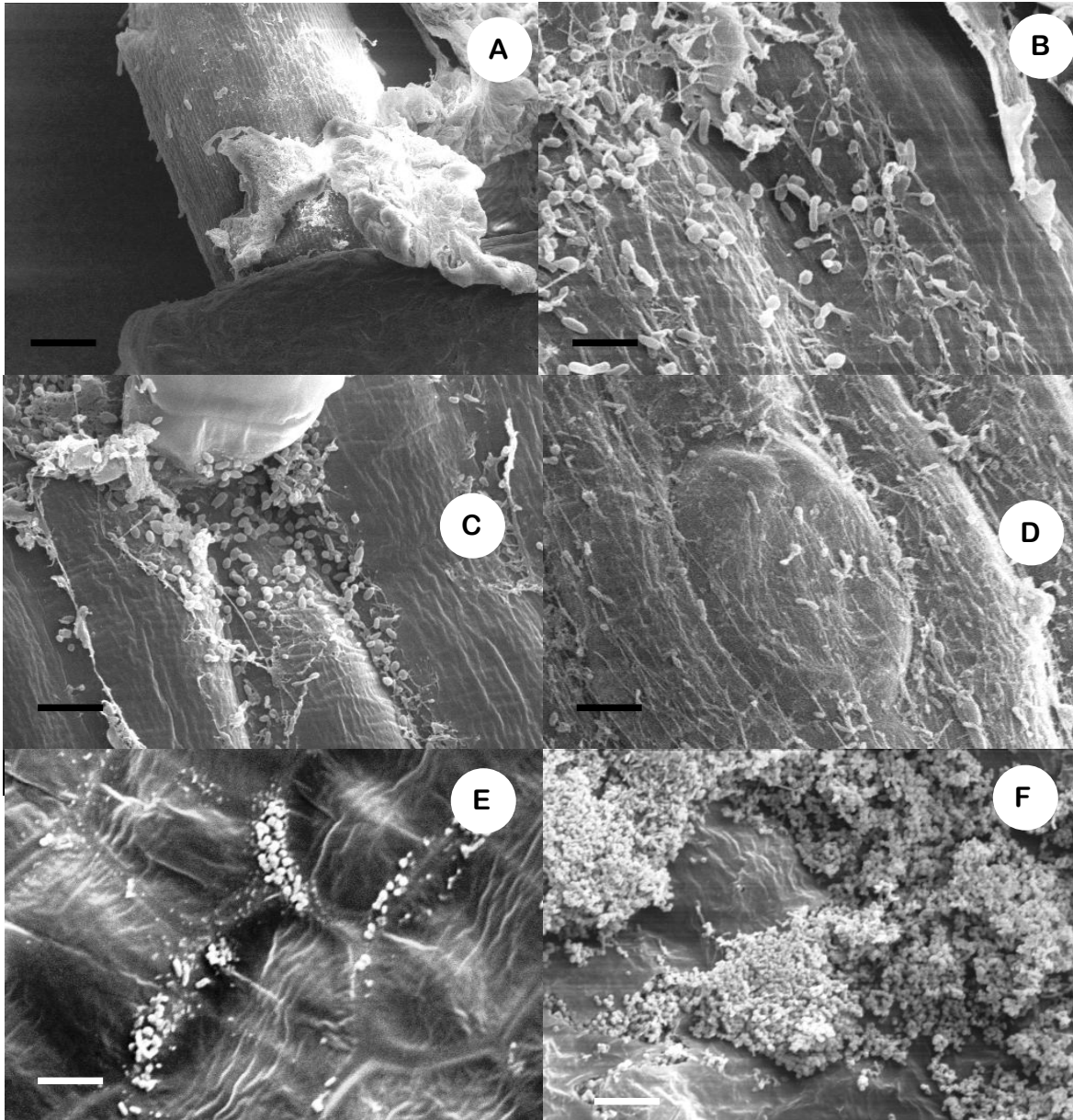


Figura 21 – Eletromicrografias eletrônicas de varredura (FMEV) da semente de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, extraída de um fruto inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por infiltração na placenta. A – Visão geral da semente mostrando a camada limite entre a radícula recém emergida e o tegumento (Barra = 150 μm); B – Superfície da radícula apresentando agregados de *Acinetobacter* sp. com caráter endofítico, por ter as células emergindo junto com a raiz (Barra = 2,6 μm); C Pelo radicular com células de *Acinetobacter* concentradas próximo a base (Barra = 4,5 μm); D- Estômato fechado na radícula colonizado por *Acinetobacter* sp. (Barra = 4,5 μm); E - Radícula do fruto recém emergida apresentando agregados de *Acinetobacter* sp. sobre a superfície (Barras = 4,5 μm); eF – Intensa colonização de *Acinetobacter* sp. sobre a radícula (Barra = 7,0 μm).

A partir da identificação de *Acinetobacter* sp., por sequenciamento da sub-unidade 16S de RNA ribossomal (Anexo 1), investigou-se na literatura, relatos sobre essa bactéria e suas possíveis interações com plantas de tomateiro. SILVA et al. (2008), estudaram 53 estirpes de bactérias endógenas, extraídas de folhas e caules de tomateiro no controle da pinta bacteriana causada por *Pseudomonas syringae*. Observaram que as plantas inoculadas com *Acinetobacter johnsonii* aumentaram seu crescimento em 9,5%, além de reduzir a severidade da pinta bacteriana. NOEMANDER e PROSSER (2000) relataram que dentre as bactérias que colonizavam sementes de cevada durante o estágio inicial de germinação foram identificadas espécies de *Acinetobacter*.

Acinetobacter johnsonii utilizada por SILVA et al (2008), foi obtida por meio da extração em folhas e caules de tomateiro e plantas de pimentão, para serem inoculadas em sementes de tomateiro. No presente trabalho, *Acinetobacter* sp. foi encontrada como endógena em sementes de tomateiro e aparentemente competindo pelo mesmo sítio de *X. vesicatoria*. A localização e a descoberta desse gênero endofítico nas sementes pode ser importante para o avanço do controle biológico de bactérias fitopatogênicas.

Ensaíos preliminares realizados por Olivares (comunicação pessoal) demonstraram que plantas de tomate inoculadas com *Acinetobacter* sp, isolada das amostras usadas nesta pesquisa, se destacaram com relação ao controle não inoculado, o que ratifica seu potencial como promotora de crescimento em tomate.

Nos experimentos preliminares observou-se que, quando as sementes eram lavadas em água estéril antes de serem semeadas (testemunha da inoculação com *X. vesicatoria* a vácuo ou imersão), havia crescimento de *Acinetobacter* muito mais rápido do que as sementes que eram colocadas para germinar com teor de umidade próximo de 9%. Como as eletromicrografias de varredura mostraram *Acinetobacter* com caráter endofítico, concluiu-se que a invasão das células de *Acinetobacter* sobre o tegumento ocorre no momento da ruptura do tegumento com o intumescimento da semente.

5.6 CONCLUSÕES

Com base nas eletromicrografias de varredura de sementes em diferentes fases do processo de germinação e partes de plântulas e mudas de tomate pode-se concluir que:

- (1) O grande volume de tricomas sobre as sementes pode favorecer o estabelecimento e a sobrevivência de patógenos pela redução da eficiência da aplicação de tratamentos de erradicação como a aplicação de químicos ou calor por meio da termoterapia;
- (2) A formação de biofilmes de *Xanthomonas vesicatoria* sobre os tricomas fornece proteção às células a ação de antibióticos, favorecendo o desenvolvimento de variantes resistentes, além de reduzir a remoção por lavagem;
- (3) Radículas de plântulas com cinco e sete e 20 dias, foi observada a presença de estômatos e estes são colonizados por *X. vesicatoria*;
- (4) A presença de estômatos sobre as radículas das plântulas de tomate pode servir de via de entrada para vários patógenos, inclusive os que colonizam o sistema vascular;
- (5) Sementes de tomate podem apresentar colonização endofítica de *Acinetobacter* sp. que por sua vez interfere no desenvolvimento e colonização da semente por *X. vesicatoria*.

5.7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELTRATI, C. M.; PAOLI, A. A. S. **Semente**. In: APPEZZATO – DA- GLÓRIA, B; CARMELL – GUERREIRO, S. M. ed Anatomia Vegetal. Viçosa, UFV. 399-424p, 2003.
- CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. **Biofilms**. New York: Wiley, 1990.
- CHRISTODOULAKIS, N. S.; MENTI, J.; GALATIS, B. Struture and development of stomata on the rimary root of *Ceratonia siliqua* L. **Annual of Botany**, v. 89, p. 23-29, 2002.
- COSTERTON, J. W; LEWANDOWSKI, Z; CALDWELL, D. E; KORBER, D. R.; LAPPINSCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review. Microbiology**, 49:711–45 p, 1995.
- DAVEY, M. E; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Molecular Biology Review**, 64:847– 67 p, 2000.
- ESAÚ, K. **Plant Anatomy**. New York, Londo: Jonh Wiley e Sons Inc. 1965
- FAHN, A. **Plant Anatomy**. Oxford, New York: Pergamon Press. 1982.
- JONES, J. B.; STALL, R.E.; BOUZAR,H. Diversity among xanthomonads patogenic on pepper and tomato. **Annual Review of Phytopathology**, v 36, p 41-58, 1998.
- KIMURA, O. Enfermidades bacterianas do pimentão. **Informe Agropecuário**, n. 10, p. 39-41. 1984.
- KINKEL, L.L.; WILSON, M.; LINDOW, S.E.Effect of sampling scale on the assessment of epiphytic bacterial populations. **Microbiological Ecology**, n. 29, p. 283-297, 1995.
- LEFEBVRE, D.D. Stomata on the primary root of *Pisum sativum* L. **Annals of Botany**, v.55, n. 3, p. 337-341, 1985.
- LIGHTHART, B. The ecology of bactéria in the alfresco atmosphere. **Microbiology Ecology**, v. 23, p. 263–74, 1997.
- LINDOW, S. E; BRANDL, M. T. Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, Apr., p. 1875–1883, 2003.
- MENTEN, J.O.M; BUENO, J.T. Transmissão de doenças pelas sementes. **In**: SOAVE, J. e WETZEL, M.M.V.S. (ed) **Patologia de sementes**. Campinas:Fundação Cargill.1987. p. 164-191.
- MCINNES, T. B.; GITATIS, R. D.; MCCARTER, S. M.; JAWORSKI, C. A.; PHATAK, S.C. Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. **Plant Disease**, v.72, 575– 79 p, 1988.

MONIER, J.M. Biological significance of bacterial aggregation of leaf surfaces: The social life of epiphytic bacteria. **In: Environmental Science, Policy and Management**. Berkeley: University California, 176 p. 2002.

NELSON, E.B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual. Review Phytopathology**, n. 42, p. 271-309, 2004.

NORMANDER, B.; PROSSER, J.I. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.4372-4377, 2000.

OLIVARES, F.L.; SILVA, L.G.; SILVA, R. A.; BORGES, L.E.; MIGUENS, F.C.; JAMES, E.K. . Abordagens estruturais e implicações fisiológicas da adesão bacteriana a parede celular dos vegetais. **In: I Simpósio Brasileiro de Biologia Celular Vegetal**, v. 1. p. 1-5, 2005.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. 2007. *Biologia Vegetal*. 6ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 2007, 906p.

ROVIRA, A. D.; CAMPBELL, R. Scanning electron microscopy of micro-organisms on the roots of wheat. **Microbiological Ecology**, v.1, 15–23 p, 1974.

SCHAAD, N. W.; STALL, R. E. *Xanthomonas*: In: SCHAAD, N. W., ed. Laboratory guide for identification of plant pathogens bacteria. St. Paul, APS Press. n. 2 p. 81-94. 1988.

SCHAAD, N. W.; FORSTER, R. A semmi-seletive medium agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seed. **Seed science and Technology**, n. 8, p. 383-391. 1982.

SHARON, E.; BASHAN, Y.; DENIS, Y. Detached leaf enrichment: a method for detecting small numbers of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in seed and symptom less leaves of tomato and pepper. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 53, p. 371-377, 1982.

SHEKHAWAT, P. S.; CHAKHAVARTI, B.P. Comparison of agar-plate and cotyledon method for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in chilli seeds. **Phytopathology**, v. 94, p. 80-83, 1979.

SILVA, J.R.C.; SOUZA, R.M; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciências Agronômicas**, v. 32, n.4, p. 1062-1072, jul/ago, 2008.

SILVA, A. M. S.; CARMO, M. G. F.; OLIVARES, F. O.; PEREIRA, A. J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, n. 27, n. 6 p.587-593, 2002.

TARKOWSKA, J. A.; WAKOWSKA, M. The significance of stomato on seedling root **Annals of Botany**, v. 61, p.305-310, 1988.

VALTERIN, L; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWING, J. Reclassification of *Xanthomonas*.
International Journal of Systematic Bacteriology, n. 45, p. 472-489, 1995.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* das plantas para as sementes de tomate pode ocorrer via infecção de flores e de frutos verdes ou maduros. A inoculação de frutos verdes por meio de injeção de suspensão de células diretamente na região da placenta resulta em maior porcentagem de sementes infectadas. O processo de transmissão da fitobactéria das sementes para as plântulas ocorre, inicialmente, com a multiplicação da fitobactéria no tegumento durante o processo de embebição das sementes com rápida colonização do mesmo seguido de multiplicação e colonização dos órgãos emitidos ao longo do processo de germinação, radícula, hipocótilo, folhas cotiledonares, epicótilo e folhas definitivas. A população da fitobactéria no tegumento atinge o seu pico cerca de 48 horas após o semeio e pode ser facilmente isoladas da radícula, hipocótilo e folhas cotiledonares a partir de 96 horas do semeio. A sobrevivência e estabelecimento da fitobactéria nas sementes é favorecido pelo grande volume de tricomas sobre as sementes e pela formação de biofilmes sobre tricomas. A infecção das plântulas pode ser favorecida pela presença de estômatos nas radículas. As sementes de tomate podem apresentar colonização endofítica de *Acinetobacter* sp. que por sua vez interfere no desenvolvimento e colonização da semente por *X. vesicatoria*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em experimentos preliminares, nos quais sementes inoculadas por infiltração a vácuo foram desinfestadas e após seccionadas ao meio, colocadas com a parte interna contra o meio de cultura NA, não foi detectada a fitobactéria. Neste trabalho sugere-se que as células de *X. vesicatoria* associadas às sementes aderem por fixação apolar, formam agregados, de biofilme ou não, em microsítios próximo aos tricomas, ancoram nessa região, se nutrem dos exsudados liberados pela base dos tricomas e permanecem como epífitas. Com o término da germinação (protusão da radícula) as células em biofilmes chegam à parte aérea, havendo para isso duas hipóteses. A primeira seria por via externa. Com o desenvolvimento da plântula, as folhas cotiledonares saem do tegumento e em algum momento recebem células da fitobactéria vindas do tegumento, as quais formam biofilmes e ficam aguardando serem “decoladas” pelo vento ou vento associado com gotas de chuva ou irrigação, para chegarem até as folhas definitivas. Por essa hipótese, em um sistema de sementeira a disseminação entre plantas seria bem facilitada, pela elevada densidade de mudas, sendo este um ambiente de alta umidade. A segunda hipótese seria via estômatos encontrados na raiz principal das plântulas de tomate. Durante a execução de vários experimentos, nos quais sementes inoculadas com *X. vesicatoria* foram postas para germinar em caixas Gerbox acondicionadas em câmara de crescimento, observou-se que ao longo de até 14 dias foi possível detectar a fitobactéria sobre as raízes. Em sementes que germinaram sobre o meio NA, observou-se que a fitobactéria acompanhou o crescimento da radícula, havendo crescimento de colônias ao longo de todo o seu comprimento. Mais tarde, foi feito um experimento em condições de casa-de-vegetação, no qual as sementes inoculadas foram semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial para mudas. Nesse experimento, foram feitos isolamentos das partes das plântulas ao longo de 20 dias. Durante o estudo, *X. vesicatoria* foi detectada em todas as partes isoladas, inclusive nas raízes. Amostras de sementes foram observadas em microscópio eletrônico de varredura, nas quais a presença de estômatos ao longo da raiz principal foi detectada nessas plântulas. Apesar de não se ter conhecimento de que *X. vesicatoria* seja transmitida sistemicamente, é necessário investigar qual é o papel destes estômatos na transmissão de *X. vesicatoria*, e de outros fitopatógenos, da semente para a plântula, bem como na infecção por patógenos que causam infecção vascular.

8. ANEXO

NÚCLEO DE ANÁLISES GENÔMICAS

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
NORTE
FLUMINENSE**

AMOSTRA: BACTÉRIA G

ANÁLISE: Identificação de Isolado

Procedimentos Executados:

- 1- Inóculo e cultivo em meio líquido
- 2- Extração de DNA genômico
- 3- Amplificação de região correspondente ao gene rRNA 16S
- 4- Sequenciamento do Fragmento amplificado via

Fluorescência

- 5- Montagem da sequência
- 6- Alinhamento e agrupamento por similaridade em Banco

Internacional de Seqüências de DNA

- 7- Indicação de Espécie mais próxima por similaridade de seqüências

PROCEDIMENTOS UTILIZADOS:

1- Cultivo dos isolados em meio líquido. O isolado cresceu em meio DYGS líquido a 30°C sob condições controladas, em estufa e/ou shaker orbital com agitação de 150 rpm.

2- Extração de DNA genômico. DNA genômico foi obtido de células crescidas 'overnight' em meio DYGS líquido (5 ml) e coletadas por centrifugação. DNA foi isolado através do uso do kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen), de acordo com o manual do fabricante. DNA total foi quantificado através de gel de agarose 0,8% utilizando um padrão de concentração (KS – 50 ng/μL) .

3- Amplificação de região correspondente ao gene rRNA 16 S. O gene 16S rRNA foi amplificado por PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores para o domínio *Eubacteria* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991).

4- Sequenciamento do gene 16S rRNA. A PCR de seqüenciamento dos fragmentos foi feita em um volume final de 10 L onde foram utilizados 50 ng dos fragmentos de interesse; 3,2 pmoles de oligonucleotídeos iniciadores; 2,0 L de tampão 2,5 X; 0,5 L de Big Dye Terminator Cycle Sequencing v.3 (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram o rD1, fD1, além dos conjuntos de oligonucleotídeos internos descritos na Tabela 1, visando o fechamento da seqüência do gene 16S rRNA. As condições de amplificação foram: 4 minutos de desnaturação a 94°C; seguidos de 25 ciclos com desnaturação a 94°C, por 1 minuto, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

Tabela 1: Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores internos para amplificação do gene 16S rRNA.

Seqüência (3'-5')	Posição de alinhamento na seqüência de <i>E. coli</i>
CCT ACG GGA GGC AGC AG	341-357F
CTG CTG CCT CCC GTA GG	357R
GTA G(GC)G GTG AAA T(GC)C GTA GA	685-704F
TCT ACG SAT TTC ACC (GC) CT AC	704R
GGG TTG CGC TCG TTG C	1114F
GGG TTG CGC TCG TTG C	1114R

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, procedeu-se a precipitação com a eliminação dos ddNTPs que não foram incorporados. Os produtos de PCR foram transferidos para microtubos de 500 L e posteriormente foram adicionados 40 L de isopropanol 65%. Após a homogeneização por agitação, os microtubos foram incubados a temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugados a 12.000 rpm por 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e 200 L de etanol 60% foram adicionados. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado incubado por 10 minutos a 60°C para secagem. Em seguida, o precipitado foi ressuspendido em 10 L de formamida (HiDi formamida – Applied Biosystems) e transferido para microplacas com capacidade para 96 amostras. Esta microplaca foi colocada em um termociclador para a desnaturação do DNA a 96°C durante 5 minutos, sendo colocada no gelo por 2 minutos imediatamente.

A leitura das bases marcadas foi realizada no Seqüenciador Automático ABI Prism 3130 Genetic Analyser do Núcleo de Análise Genômica / UENF.

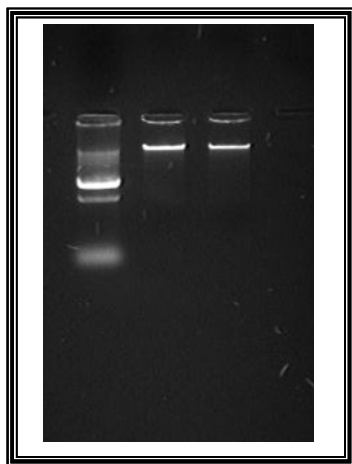
5- Montagem da seqüência do gene 16S rRNA. As seqüências geradas foram montadas através dos programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998).

6- Alinhamento e agrupamento por similaridade em banco internacional das seqüências de DNA e indicação de espécie mais próxima por similaridade de seqüências. As seqüências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

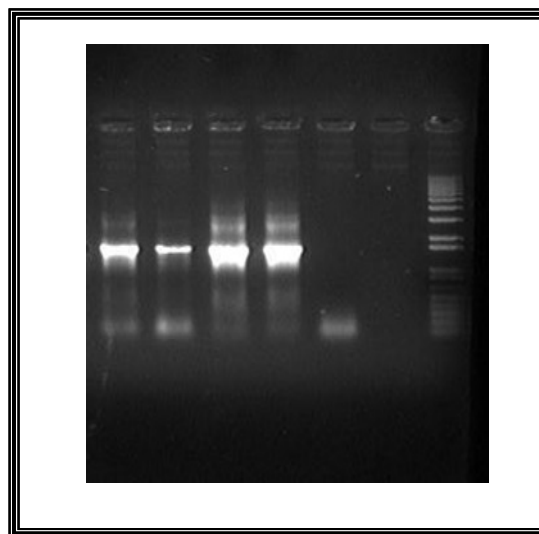
RESULTADOS

EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICA E AMPLIFICAÇÃO VIA PCR: AMOSTRA: Bactéria G

A



B



A - Análise da qualidade do DNA genômico extraído (eletroforese em gel. Linha 1, controle plasmidial. Linha 2 e 3, **Amostra Teste**

B - Análise da qualidade do produto de amplificação de DNA via PCR. Linha 1, DNA sem diluir. Linha 2, Diluído 1/1000. Linha 3, 1/100, Linha 4, 1/10. Linha 5, Padrão de tamanho de DNA.

SEQUENCIAMENTO: AMOSTRA: Bactéria G

GCCGCAGGTTCCCCTACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTCATCGGCCACACC
GTGGTAAGCGTCCTCCTTGCGGTTAGACTACCTACTTCTGGTGCAACAAATCCCATGG
TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCG
CGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACG
ATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCCTATCGCTAGGTAGCAACCCTTTGTACCGACCATTG
TAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCGCCGCCTT
CCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTTAAAGTTCCCGGCTTAACCCGCTGGCAAATAA
GGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG
ACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTT
CTTACTATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACACATGCTC
CACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAGTCTTGCGACCGTACTCCC
CAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCT
AGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCATGC
TTTCGTACCTCAGCGTCAGTATTAGGCCAGATGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCC
AGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCATCCTCTCCATACTCTAG
CTTCCCAGTATCGAATGCAATTCCTAAGTTAAGCTCAGGGATTTACATCCGACTTAAAA
AGCCGCCTACGCACGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTAACGCTCGCACCCCTCTGTATT
ACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGCGAGTAACGTCCACTATC
CAAGAGTATTAATCTCGGTAGCCTCCTCCTCGCTTAAAGTGCTTTACAACCAAAAGGCC
TTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTGTCCAATATCCCA
CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCGGATCATCCT
CTCAGACCCGCTACAGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCT
GACTTAGGCTCATCTATTAGCGCAAGGTCCGAAGATCCCCTGCTTTCCCCCGTAGGGC
GTATGCGGTATTAGCATTCTTTTCGGAATGTTGTCCCCACTAATAGGCAGATTCTAA
GCATTACTACCCGTCCGCCGCTAGGTCAGGTAGCAAGCTACCCTTCCCCGCTCGACT
TGCATGTGTTAAGCC

CONSIDERAÇÕES

Os trabalhos de amplificação via PCR, e sequenciamento forneceram uma seqüência de 1479 nucleotídeos. A utilização de tal informação permitiu, por alinhamento e agrupamento, a **Conclusão quanto ao gênero** da amostra.

PARECER:

Acinetobacter sp (99%)

LITERATURA CITADA

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A., GENE-TRAK, D.J.L. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.2, p.697-703, 1991.