

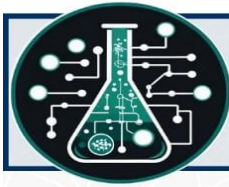


## Desenvolvimento e validação de *primers* específicos para a detecção de *Pseudomonas viridiflava* por PCR

Carvajal-Jaimes, J. P.;<sup>1</sup>Queiroz-Ferreira, M. S.<sup>1</sup>; Alves A. R.; Quezado-Duval, A.M.<sup>2</sup>; Rossato, M.  
<sup>1</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. <sup>2</sup> Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brasil. \*[jaimes.julieth@aluno.unb.br](mailto:jaimes.julieth@aluno.unb.br)

### Resumo

O gênero *Pseudomonas* é amplamente estudado e abrange um vasto número de espécies, com mais de 352 formalmente descritas. Atualmente, cerca de 21 destas espécies são reconhecidas como fitopatogênicas. Entre elas, destaca-se o complexo de espécies *P. syringae*. A *Pseudomonas viridiflava* também integra este complexo, apresentando uma ampla gama de hospedeiros, causando diversos sintomas em diferentes órgãos da planta, como caules, folhas e flores. Além de seu papel como fitopatógeno, também atua como endofítica, epífita e saprófita em ambientes agrícolas e naturais. Nos últimos anos, têm-se observado um aumento nos relatos de sua ocorrência associados a doenças em novos hospedeiros (maçã, alface, repolho entre outros). Contudo, a identificação taxonômica de espécies de *Pseudomonas* permanece desafiadora devido à elevada diversidade genética do gênero. Este trabalho teve como objetivo identificar isolados de *P. viridiflava* obtidos de tomateiro e desenvolver *primers* específicos para sua detecção molecular por PCR. Foram utilizados isolados pertencentes à coleção de trabalho da Embrapa Hortaliças (Brasília, DF) oriundos de plantas sintomáticas de diferentes estados brasileiros. Para o desenho dos *primers*, foram utilizadas sequências de genoma completo do GenBank, sendo cinco de *P. viridiflava* (espécie-alvo) e 187 de espécies não-alvo (incluindo fitopatógenos como *P. syringae* pv. *tomato* (Pst), *P. syringae* pv. *syringae* (Pss), *P. corrugata*, *P. mediterranea*, *P. cichorii*, *P. marginalis* e espécies de vida livre). Regiões genômicas exclusivas foram identificadas com o software RUCS (*Rapid identification of PCR primers for Unique Core Sequences*) e usadas no desenho dos *primers*. Seis pares de *primers* foram desenhados com softwares específicos *PrimalScheme* e o *Geneious prime 2025*. A especificidade destes *primers* foi validada *in silico* e *in vitro*. No teste *in vitro* frente a um painel de isolados de *P. viridiflava* e de espécies filogeneticamente próximas (*P. corrugata*, *P. marginalis*, Pst, *P. syringae* pv. *syringae* (Pss) e *P. cichorii*). O par desenhado manualmente no *Geneious* apresentou os melhores resultados na



avaliação por PCR. O par de *primers* selecionado VIR35F/177R foi específico, amplificando um fragmento de 113 pb em todos os isolados de *P. viridiflava*. Nenhuma amplificação inespecífica foi detectada nas demais espécies avaliadas. Este método de diagnóstico por PCR oferece uma ferramenta rápida, específica e confiável, para a identificação precisa de *P. viridiflava* em distintos contextos agrícolas.

**Palavras-chave:** *Diagnóstico molecular; Fitobactéria, Solanum lycopersicum.*

## Referências

- BERGE, O. *et al.* A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e105547, 2014.
- GOSS, E. M.; KREITMAN, M.; BERGELSON, J. Genetic diversity, recombination and cryptic clades in *Pseudomonas viridiflava* infecting natural populations of *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v. 169, n. 1, p. 21-35, 2005.
- KEARSE, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop *software* platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.
- LIPPS, S. M.; SAMAC, D. A. *Pseudomonas viridiflava*: An internal outsider of the *Pseudomonas syringae* species complex. **Molecular Plant Pathology**, v. 23, n. 1, p. 3-15, 2022.
- QUICK, J. *et al.* Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. **Nature Protocols**, v. 12, n. 6, p. 1261-1276, 2017.
- THOMSEN, M. C. F. *et al.* RUCS: rapid identification of PCR primers for unique core sequences. **Bioinformatics**, v. 33, n. 24, p. 3917-3921, 2017.