

**OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA
DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*
EM SEMENTES DE FEIJÃO**

FRANKLIN CORDEIRO SILVA

2008

FRANKLIN CORDEIRO SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DETECÇÃO DE
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* EM SEMENTES DE FEIJÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Franklin Cordeiro.

Otimização da técnica de PCR para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão / Franklin Cordeiro Silva. – Lavras : UFLA, 2008.

49 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Bibliografia.

1. Crestamento bacteriano. 2. Bio PCR. 3. Feijão. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 635.65221
- 635.652932

FRANKLIN CORDEIRO SILVA

**OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DETECÇÃO DE
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* EM SEMENTES DE FEIJÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Aprovada em 31 de julho de 2008

Profª. Dra. Antonia dos Reis Figueira

UFLA

Prof. Dr. Hilário Antônio de Castro

UFLA

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

SUMÁRIO

Resumo.....	I
Abstract.....	ii
CAPÍTULO 1 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> : particularidades e perspectivas para a detecção em sementes.....	1
1 Introdução Geral.....	2
2 Referencial Teórico.....	4
2.1 Utilização de sementes de qualidade.....	4
2.2 Transmissão de patógenos através das sementes.....	5
2.3 Crestamento bacteriano comum - <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	6
2.4 Detecção de bactérias em sementes.....	7
2.4.1 Exame visual de sementes a olho nu.....	8
2.4.2 Isolamento em meio de cultura seletivo e semi-seletivo.....	9
2.4.3 Técnicas moleculares.....	10
2.4.3.1 Reação da Polimerase em Cadeia – PCR.....	10
3 Referências Bibliográficas.....	12
CAPÍTULO 2 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> a partir de diferentes formas de preparação dos extratos de sementes de feijão.....	17
Resumo.....	18
Abstract.....	19
1 Introdução.....	20
2 Material e Métodos.....	21
3 Resultados e Discussão.....	24
4 Conclusões.....	27
5 Referências Bibliográficas.....	27
CAPÍTULO 3 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em lotes comerciais a partir de diferentes formas de preparação dos extratos de sementes de feijão.....	30
Resumo.....	31
Abstract.....	32
1 Introdução.....	33
2 Material e Métodos.....	35
3 Resultados e Discussão.....	39
4 Conclusões.....	47
5 Referências Bibliográficas.....	47

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

A Nossa Senhora Aparecida, pela intercessão.

Aos meus pais e aos meus irmãos, pelo amor, amizade e confiança.

A minha esposa, Elka, pelo incentivo, apoio, compreensão e amor.

À Universidade Federal de Lavras – Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior-Capes, pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador, professor Dr. Ricardo Magela de Souza, pela orientação, valiosos ensinamentos e incentivo às novas realizações.

Aos colegas que me ajudaram durante a realização dos experimentos: Ana Beatriz, Flávia, Alessandra e Ana Maria.

Aos estagiários e demais colegas que contribuíram para essa conquista.

Aos amigos Cleilson, Aníbal, Vladimir, Léo Girão, Hermínio, Néia, Jean, Beatriz Cristina, Geraldo Magelo, René, Arley, Janilton, Sérgio, Ricardo Demicheli e João Carlos.

A todas as pessoas que participaram desta importante conquista.

Que Deus lhes recompense por tudo que fizeram por mim!

RESUMO

SILVA, Franklin Cordeiro. **Otimização da técnica de PCR para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. 2008. 49 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap), é a principal bacteriose do feijoeiro no Brasil, sendo transmitida principalmente por sementes. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de aperfeiçoar uma técnica para detecção de Xap em sementes de feijão, por meio da utilização de diferentes métodos de preparação do extrato para a detecção via PCR, além da detecção simultânea de Xap e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) nos extratos, utilizando a Bio-PCR. Após a inoculação das sementes de feijão, foram avaliados: extrato bruto, obtido diretamente das sementes, extrato concentrado em membrana milipore, extrato concentrado por centrifugação e extrato plaqueado em meio seletivo (Bio-PCR). Avaliou-se a presença de Xap e de Cff, em lotes comerciais de feijão provenientes de diversas regiões do Brasil, utilizando-se os mesmos procedimentos das sementes inoculadas. Para a otimização da técnica de PCR, foram utilizados os *primers* X4c e X4e. A partir do extrato bruto, do extrato concentrado por centrifugação e por membrana milipore, não foi possível a detecção de Xap nas sementes de feijão artificialmente contaminadas nem nos 47 lotes comerciais de sementes/grãos de feijão. A técnica de Bio-PCR permitiu a detecção de Xap a partir de extratos de sementes de feijão artificialmente contaminadas e em 18 dos 47 comerciais. A técnica de detecção simultânea de Xap e Cff no mesmo gel não foi viável, por amplificar fragmentos de DNA típicos de Cff na amostra controle Xap. O meio de cultura semi-seletivo XCP1 sem antibióticos pode ser utilizado para a recuperação de colônias de Xap.

*Orientador: Dr. Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador).

ABSTRACT

SILVA, Franklin Cordeiro. **Optimization of the PCR technique for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds.** 2008. 49p. Dissertation (Master program on Agronomy- Phytopathology) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Common blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) is the main bacterial malady in Brazilian beans, being transmitted mainly by seeds. This present work aimed at improving a technique for the detection of Xap in bean seeds, by using different extract preparation methods for detection through via PCR, and the simultaneous detection of Xap and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) in the extracts by using a Bio-PCR. After inoculating the bean seeds an assessment was made of gross extract obtained directly from the seeds, extract concentrated in Millipore membrane, extract concentrated via centrifugation and plating of seed extracts on a semi-selective agar medium (Bio-PCR). The presence of Xap and Cff in commercial lots of beans from several regions of Brazil by using the same procedures as those for inoculated seeds was also assessed. For the optimization of the PCR technique primers X4c and X4e were used. Neither from the gross extract, the extract concentrated by centrifugation and by Millipore membrane detection of Xap in artificially contaminated bean seeds nor in the 47 commercial lots of bean seeds/grains was the detection of Xap possible. The Bio-PCR technique enabled for the detection of Xap from artificially contaminated bean seed extracts and in 18 of the 47 commercial lots. The technique for the simultaneous detection of Xap and Cff in the same gel was not viable due to the amplification of typical Cff DNA fragments in the control Xap sample. The semi-selective cultivation medium XCP1 without antibiotics can be used for the recovery of Xap colonies.

*Guidance Committee: Dr. Ricardo Magela de Souza – UFLA (guiding professor)

CAPÍTULO 1

***Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*: particularidades e perspectivas para a detecção em sementes**

1 INTRODUÇÃO GERAL

O feijoeiro, devido à sua boa adaptação às mais variadas condições edafoclimáticas do Brasil, faz parte da maioria dos sistemas produtivos dos pequenos e médios produtores, cuja produção é direcionada ao consumo familiar e à comercialização do excedente. Atualmente, o feijoeiro tem sido cultivado também na época de inverno, sob irrigação, atraindo médios e grandes produtores, geralmente usuários de tecnologias (Yokoyama et al., 1996).

Levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2008) a produção de 3.340.000 toneladas de feijão, plantadas em 4.088.000 há, na safra 2006/2007 e a estimativa de 3.507.000 toneladas para uma área de 3.923.000 há, para a safra 2007/2008. Isso representa um aumento de, aproximadamente, 5% na produção, mesmo com a redução da área em torno de 4%.

Minas Gerais é o 2º maior produtor de feijão do Brasil, com estimativas de produção, para a safra 2007/2008, de 570.000 toneladas, ou seja, 13% maior que a safra 2006/2007 de 504.000 toneladas. O Paraná, maior estado produtor brasileiro, terá uma produção estimada, para a safra 2007/2008, de 773.000 toneladas (CONAB, 2008).

A dinâmica da produção de feijão no Brasil alterou-se muito nos últimos anos (Paula Júnior et al., 2004). Apesar da redução da área plantada, a produtividade média apresentou crescimento significativo de 1990 a 2007 (Paula Júnior et al., 2007). Em 1990, a produtividade média era de 510 kg/ha, passando a 817 kg/ha em 2007, ou seja, aumento em torno de 63% (CONAB, 2008). Essa produtividade é muito baixa se comparada ao potencial genético dessa cultura, ao qual, a utilização de tecnologias avançadas, representada pelo cultivo irrigado e pelo intenso uso de insumos, como defensivos agrícolas, variedades

melhoradas, fertilizantes e outras técnicas de produção, tem proporcionado rendimentos superiores a 3.500 kg/ha (Ferreira et al., 2004).

Um dos fatores que contribuem para o baixo rendimento da cultura do feijoeiro é a utilização de grãos, em vez de sementes, para o plantio. No Brasil, a taxa de utilização de semente comercial de feijoeiro é muito baixa, em torno de apenas 10%. A qualidade sanitária para a semente do feijoeiro é um dos fatores mais importantes para o sucesso da produção, pois muitas doenças da cultura são transmissíveis pelas sementes (Bragantini, 1996). Em consequência da não utilização de sementes idôneas, os problemas fitossanitários levam à baixa produtividade do feijão. Segundo Sartorato & Rava, (1994), as medidas de controle das doenças do feijoeiro, para serem eficientes, devem contemplar ações associadas de controle integrado, como utilização de sementes sadias e tratamento químico de sementes.

O crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, é a principal bacteriose do feijoeiro no Brasil. O constante uso de sementes contaminadas tem sido a causa do aumento do nível de inóculo da bacteriose nos campos de produção (Pereira et al., 2002).

Vários são os métodos de detecção de bactérias em sementes. Porém, análises de diagnose, para fins de subsidiar a adoção de tecnologias preventivas à ocorrência de epidemias, que resultem em prejuízos econômicos à exploração de espécies cultivadas, requerem a combinação, em série, de inúmeras técnicas, envolvendo desde a inspeção visual da semente até o emprego de técnicas moleculares para a identificação e a quantificação da bactéria (Denardin, 2002).

Devido à importância do crestamento bacteriano para a cultura do feijoeiro, este trabalho foi realizado com o objetivo de aperfeiçoar uma técnica para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, em sementes de feijão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Utilização de sementes de qualidade

Sementes de boa qualidade fisiológica e sanitária são extremamente importantes para o estabelecimento e o desenvolvimento da cultura no campo. Entretanto, a qualidade sanitária ainda é negligenciada, apesar dos prejuízos causados pela transmissão de patógenos por meio das sementes (Frare et al., 2002). A associação de patógenos com sementes constitui um dos aspectos de maior importância, do ponto de vista sanitário, em razão das consequências danosas que esta interação pode produzir (Costa et al., 2002).

Sementes vigorosas e livres de patógenos, de cultivares melhoradas, são necessárias para o aproveitamento máximo dos efeitos de irrigação, da adubação e dos defensivos agrícolas. A qualidade da semente é expressa pela interação de quatro componentes: genético, físico, fisiológico e sanitário. O componente sanitário refere-se ao efeito deletério provocado pelos insetos e microrganismos associados às sementes, desde o campo de produção até o armazenamento. A constatação da presença de microrganismo, mesmo patogênico na semente, não é suficiente para garantir que ele irá infectar a planta proveniente desta semente. Entretanto, a associação patógeno-semente indica um potencial de transmissão e possível estabelecimento da doença no campo (Vieira et al., 1993).

Segundo Machado (2000), os danos decorrentes da associação de patógenos com sementes não se limitam apenas a perdas diretas de população de plantas no campo, mas abrangem também uma série de outras implicações que, de forma mais acentuada, podem levar a danos irreparáveis a todo o sistema agrícola. Dentre os agentes patogênicos que podem associar-se às sementes de plantas, os fungos formam o maior grupo, seguido das bactérias e, em menor proporção, dos vírus e nematóides.

A utilização de sementes de qualidade deve ser prioridade no cultivo de todas as culturas, principalmente no plantio do feijoeiro em que este material propagativo pode transportar um número significativo de patógenos potencialmente danosos para a cultura (Frare et al., 2002).

O uso de semente de boa qualidade fisiológica, aliado à utilização de cultivares melhoradas, mais resistentes às doenças, pode contribuir com acréscimos de até 40% na produtividade do feijoeiro (Bragantini, 1996).

2.2 Transmissão de patógenos através das sementes

O acesso de patógenos às sementes pode ser influenciado por inúmeros fatores, entre os quais a própria natureza do parasitismo de cada organismo. Dentre os agentes patogênicos, os fungos são os mais ativos, tendo maior habilidade de penetrar diretamente nos tecidos vegetais e daí se estenderem mais facilmente. Por sua vez, a penetração de bactérias e vírus em tecidos vegetais pode ser efetivada pela interferência de certos vetores ou condições da própria planta, que promovem a transferência passiva do inóculo (Machado, 2000).

A associação com as sementes de seus hospedeiros é um dos mecanismos de sobrevivência desenvolvidos pelas fitobactérias. O transporte de patógeno bacteriano pela semente é condição importante de sobrevivência e transferência de inóculo no tempo e no espaço (Oliveira et al., 2005). Quando se mencionam bactérias em associação com sementes, isso pode significar tanto a bactéria infectando a semente alojada em seus tecidos como simplesmente infestando a semente, ou seja, a ela aderida, sem causar infecção (Romeiro, 2005).

O emprego de semente certificada ou fiscalizada é garantia, para o agricultor, de que ele está investindo em cultivar recomendada pela pesquisa, com alta pureza genética e porcentagem de germinação, porém, não há 100% de garantia de que ela está livre de patógenos. Logo, semente certificada e

fiscalizada não é sinônimo de semente sadia. Mesmo assim, elas constituem a melhor opção disponível no mercado (Vieira & Paula Júnior, 2004).

2.3 Crestamento bacteriano comum - *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Pereira et al. (2002) relatam que o crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) (Smith 1897; Vauterin et al., 1995) é a principal fitobacteriose do feijoeiro no Brasil. Em Minas Gerais, a sua ocorrência é maior nas áreas mais quentes, sobretudo durante o plantio “das águas” (Vieira, 1988). As *Xanthomonas* possuem bastonetes retos e predominantemente isolados, móveis por um único flagelo polar (monotriquia), gram-negativas e aeróbias estritas. Apresentam metabolismo oxidativo da glicose, hidrolisam amido, esculina, gelatina, caseína e Tween-80. As colônias são quase sempre amarelas, lisas e circulares com produção de um pigmento amarelo (xanthomonadina), não solúvel em água, ficando restrito às colônias (Bergamin Filho et al., 1995; Oliveira & Souza, 1997; Bianchini et al., 2000; Souza & Ishida, 2006). Em sementes, podem sobreviver por períodos variáveis de 2 a 15 anos, no estado hipobiótico, podendo estar localizadas interna ou externamente, sem perder sua patogenicidade. Em solo autoclavado umedecido, a bactéria sobrevive durante dez dias e, em solo autoclavado seco, por 150 dias. Em material desidratado sobrevive por um período de 1 ano e 6 meses. Seu período de sobrevivência em restos culturais infectados no solo é variável em função das condições ambientais (Bianchini et al., 2005).

A infecção das folhas e vagens pode ocorrer através de aberturas naturais, tais como estômatos e hidatódios, ou de ferimentos causados por insetos, partículas de solo, maquinários e animais, incluindo o próprio homem (Oliveira & Souza, 1997).

O crestamento bacteriano comum afeta toda a parte aérea do feijoeiro. Nas folhas, as lesões, inicialmente, são visíveis na face inferior, onde são

pequenas e encharcadas. Posteriormente, tornam-se secas, escuras, de tamanhos e conformações irregulares circundadas por halo amarelo facilmente observado na face superior da folha (Bianchini et al., 2000). No primeiro nó acima das folhas primárias pode ocorrer a formação de lesão, que poderá circundar a haste, ocasionando a quebra da planta no ponto de infecção durante o estágio de formação das vagens. As lesões nas vagens inicialmente são encharcadas, circulares e irregulares, apresentando ou não exsudato bacteriano de cor amarela. Posteriormente, tornam-se secas e avermelhadas. A infecção é frequentemente na sutura das vagens (Bianchini et al., 2000). Sementes infectadas podem apresentar descoloração e enrugamento do tegumento (Pinto, 2005).

Condições de altas temperaturas e umidade relativa favorecem o desenvolvimento da doença no campo. O principal modo de disseminação da bactéria de uma área a outra é por meio de sementes contaminadas e, dentro de uma plantação, pelos respingos de chuva, implementos agrícolas e insetos. Contaminações de 0,5% de sementes são suficientes para ocasionar séria epidemia na cultura em campo (Vieira, 1988; Bianchini et al., 2000).

Em estudos realizados com sementes provenientes de áreas de sequeiro e irrigadas, no Distrito Federal, Pereira et al. (2002) observaram que, dos 19 lotes avaliados, 15 apresentaram níveis de incidência de bacteriose proporcionada por Xap.

2.4 Detecção de bactérias em sementes

Na diagnose de bactérias em sementes, além dos procedimentos de análise de rotina, das boas práticas laboratoriais e da observância dos princípios microbiológicos, destacam-se:

- 1) preservação dos materiais padrões de referência, para assegurar as características e a viabilidade celular;
- 2) qualidade dos meios de cultura;

3) representatividade da amostra, que permita identificar a bactéria e quantificar o número mais provável de unidades formadoras de colônia do microrganismo por unidade de semente (Denardin, 2002).

A combinação de técnicas eleitas para o estabelecimento de análise de rotina para detecção, identificação e quantificação de bactérias associadas a sementes, envolve:

Sintomatologia diretamente na semente:

- exame visual de sementes a olho nu (Vieira & Rava, 2000; Denardin, 2002).

Identificação de bactérias:

- isolamento em meio de cultura seletivo e semi-seletivo (Valarine, 1990; 1991; Chang et al., 1991; Vieira & Rava, 2000; Agrios, 2005; Tebaldi et al., 2007).

Técnicas moleculares:

- reação em Cadeia da Polymerase (PCR) (Audy et al., 1996; Halfeld-Vieira et al., 2001; Denardin, 2002; Vieira 2002; Borém, 2005; Tebaldi, 2005; Arriel et al., 2006).

2.4.1 Exame visual de sementes a olho nu

Ao realizar a inspeção visual direta de 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). Este método permite obter uma rápida informação sobre o estado sanitário das sementes, não requerendo equipamentos sofisticados, e pode ser útil somente para patógenos causadores de sintomas visíveis externamente. Apresenta limitações quanto à sensibilidade e à

segurança para ser usado em rotina e não oferece informações sobre a viabilidade do patógeno (Valarine, 1990).

2.4.2 Isolamento em meio de cultura seletivo e semi-seletivo

Consiste em extrair a bactéria em sementes moídas 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 (Valarine, 1991).

Um excelente método para isolamento e identificação de bactérias dos tecidos das plantas ou do solo é por meio do uso do meio seletivo. O meio seletivo contém nutrientes que promovem o crescimento de um tipo particular de bactérias, enquanto, ao mesmo tempo, contém substâncias que inibem o crescimento de outros tipos de bactérias. A identificação positiva, geralmente, requer mais que uma subcultura no meio seletivo porque raramente apenas uma bactéria cresce no meio seletivo. Os meios seletivos disponíveis para bactérias fitopatogênicas são úteis para isolamento de rotina e, às vezes, para a identificação de gêneros de bactérias e de várias espécies, sendo possível até mesmo identificar patovares (Agris, 2005).

Dentre os meios semi-seletivos podem-se destacar o XCP1 (Goszczyńska & Serfontein, 1998), MT (Goszczyńska & Serfontein, 1998), MXP (Schaad & Staal, 1994). Valarini (1991) relata que o meio semi-seletivo (MXP) pode ser utilizado para a detecção de baixas incidências de Xap e sua variante *fuscans*, em sementes de feijão. Entretanto, segundo o autor, apesar de esse meio aumentar a chance de sucesso no isolamento do patógeno, apresenta o fator limitante de restrição do crescimento de algumas variantes do patógeno. Contudo, Marques et al. (2005) estudaram a sobrevivência e viabilidade de Xap

em sementes de feijão armazenadas em condições controladas utilizando o meio semi-seletivo MXP.

Tebaldi et al. (2007) avaliaram os meios de cultura semi-seletivos XCP1 e MT e o não seletivo 523 para a detecção de Xap em extratos de sementes de feijão moídas e inteiras e observaram que o meio XCP1 foi o mais eficiente na quantificação e na detecção deste patógeno em extratos de sementes inteiras. Segundo os autores, a utilização de meio de cultura semi-seletivo requer, ao menos, seis dias para a obtenção dos resultados. Entretanto, é uma técnica fácil de ser executada em exames de rotina em laboratório e não exige equipamentos sofisticados.

2.4.3 Técnicas moleculares

As técnicas moleculares constituem uma ferramenta que muito pode auxiliar na detecção/identificação de organismos de forma rápida e segura, possibilitando investigações de ácidos nucleicos ou de produtos gênicos. Especificamente na detecção de microrganismos em sementes, as técnicas moleculares têm sido de extrema relevância, havendo um crescente interesse na investigação neste campo, em todo o mundo. Na medida em que o controle de qualidade de sementes é uma preocupação no sentido de garantir material de propagação livre de patógenos e com identidade genética comprovada, além de outros atributos, metodologias de precisão ganham importância (Vieira, 2002).

2.4.3.1 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Nos anos de 1990, a detecção e a identificação sensível e precisa para todos os tipos de patógenos foram aumentadas amplamente pelo uso de técnicas empregando a reação da polimerase em cadeia (PCR). A PCR permite a amplificação de minúsculas quantidades do DNA do patógeno em uma amostra

pelo uso de *primers* de DNA específicos para aquele patógeno em particular (Agrios, 2005).

Esses marcadores dependentes de quantidades muito pequenas de DNA revolucionaram os procedimentos de análise de variabilidade genética, tanto pela rapidez com que podem ser feitos quanto pela possibilidade de se estudar os mais diferentes tipos de amostras que contenham um mínimo de DNA (Borém, 2005).

A PCR consiste na síntese artificial de milhões de cópias (10^6 - 10^7) de um fragmento sintético de DNA de tamanho definido (geralmente entre 100 e 1.000 pb) a partir do DNA de amostras biológicas, também chamado de DNA molde. Esta reação, chamada amplificação de DNA, ocorre na presença do DNA molde, de nucleotídeos (A,T,C e G), de um par de seqüências pequenas de DNA (oligonucleotídeos) iniciadoras (*primers*) e da enzima polimerase. O aquecimento a 94°C promove a separação das duas fitas do DNA molde, processo denominado desnaturação. A amostra é, então, resfriada a 35°C -60°C, de forma que cada fita se hibridiza por complementaridade com os iniciadores, permitindo que a polimerase inicie a duplicação do DNA num processo de síntese a 72°C. O novo DNA sintetizado é construído copiando-se o DNA da amostra como modelo e utilizando-se os iniciadores como ponto de partida. Subseqüentemente, a amostra é aquecida de forma a promover novamente a desnaturação da hélice dupla de DNA, iniciando-se um novo ciclo da cadeia. Este ciclo é repetido 25-30 vezes, ou mais, em um aparelho denominado termociclador. As regiões de DNA flanqueadas pelos iniciadores são, então, amplificadas exponencialmente (Borém, 2005). Uma série de técnicas moleculares foi desenvolvida a partir da técnica da PCR. Dentre eles podem ser citados RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), Microssatélites, etc. (Vieira, 2002; Borém, 2005).

Halfled-Vieira et al. (2001) avaliaram a viabilidade de utilização da técnica de PCR, usando *primers* considerados específicos para a identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, visando criar bases para a sua utilização em diagnose de rotina e em programas de identificação de sementes. De acordo com os autores, os *primers* utilizados (X4c e X4e) apresentam boa capacidade para a identificação dessas bactérias.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUDY, P.; BRAAT, C.E.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 4, p. 361-367, Apr. 1996.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. Amsterdam: Elsevier, 2005. 5. ed. 922 p.
- ARRIEL, N.H.C.; COSTA, M.M.; TREVISOLI, S.H.U.; MAURO, A.O. di. Outras aplicações dos marcadores. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 374 p.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia**. V. 1: Princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919 p.
- BIANCHINI, A.; CARNEIRO, S.M.T.P.G.; LEITE JÚNIOR, R.P. Doenças e seu controle. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Feijão: tecnologia de produção**. Londrina: 2000. 115 p.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. V.2. Doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 333-349.

BORÉM, A. Biotecnologia e sementes. In: ZAMBOLIN, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 1-34.

BRAGANTINI, C. Produção de sementes. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. p. 1-22.

CHANG, C. J.; DONALDSON, R.; CROWLEY, M.; PINNOW, D. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* from crucifer seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 8, n. 4, p. 449-453, Apr. 1991.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos: novo levantamento junho, 2008. Brasília: Conab, 2008. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br> >. Acesso em 14 de julho de 2008.

COSTA, M.L.N.; MACHADO, J.C.; GUIMARÃES, R.M.; POZZA, E.A.; ORIDE, D. Efeito de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* no desempenho de sementes de feijoeiro infectadas artificialmente. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Resumos e palestras**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. p. 42

DENARDIN, N.D. Metodologias de detecção de bactérias em sementes para análise de rotina. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Resumos e palestras**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. p. 129.

FERREIRA A.C.B.; ANDRADE M.J.B.; ARAÚJO G.A.A. Nutrição e adubação do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p. 61-72, 2004.

FRARE, V.C.; MOURA, C.J.F.; TOGNI, D.A.J.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. A importância dos testes de sanidade de sementes para a cultura do feijoeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Resumos e palestras**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. p. 19.

GOSZCZYNSKA, T.; SERFONTEIN, J.J. Semi-selective culture medium for *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolation from bean seeds **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 65-72, Mar. 1998.

HALFED-VIEIRA, B.A.; SOUZA, R. M.; FIGUEIRA, A.R.; BOARI, A de. J. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, n. 4, p. 737-740, dez. 2001.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes**. Lavras: UFLA-LAPS/FAEPE, 2000. 138 p.

MARQUES, A.S.A.; GUIMARÃES, P.M. SANTOS, J.P.; VIEIRA, M. Sobrevivência e viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão armazenadas sob condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 527-531, set./out. 2005.

OLIVEIRA, J.R.; MOURA, A.B.; SOUZA, R.M. Transmissão e controle de fitobactérias em sementes. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 113-134.

OLIVEIRA, J.R. de; SOUZA, R.M. de. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) controle de doenças causadas por bactérias. In: VALE, F.X.R. do; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas de grandes culturas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. Cap.7, p. 423-435.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; ZAMBOLIM, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p. 99-112, 2004.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA R.F.; CHAGAS J.M.; CARNEIRO J.E.S.; ARAÚJO G.A.A.; VENZON M.; RAMALHO M.A.P.; ABREU A.F.B.; ANDRADE M.J.B. Feijão (*Phaseolus vulgaris* L). In: PAULA JÚNIOR, T.J.; VENZON M. **101 culturas: manual de tecnologia agrícola**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2007. p. 331-342.

PEREIRA, L.L.A.; OLIVEIRA, J.R.; MAFFIA, L.A.; NASSER, L.C.B. Incidência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em lotes de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) do Distrito Federal. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Resumos e palestras**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2002. p. 61.

PINTO, N.F.J.A. Análise sanitária na produção de sementes de grandes culturas. In: ZAMBOLIN, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 295-332.

ROMEIRO, R S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. 417 p.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Controle químico de doenças fungicas. In: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília, EMBRAPA-SPI, 1994. p. 211-216.

SCHAAD, N.W.; STALL, E. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Saint Paul: Minnesota, 1994. p. 81-94.

SOUZA, M.R.; ISHIDA, A.K.N. Manejo de doenças bacterianas no feijoeiro. In: SIMPÓSIO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 6., 2006, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2006. p. 55-74.

TEBALDI, N.D. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão e aspectos epidemiológicos do crestamento bacteriano comum**. 2005. 102 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TEBALDI, N.D.; SOUZA, R.M.; MACHADO, J.C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi-seletivo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 55-58, jan./fev. 2007.

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

VALARINI, P. J. **Método para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. 1990. 167 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTES, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 472-489, July 1995.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, 1988. 231 p.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J. de.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 600p.

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

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, R.F.; PAULA JÚNIOR, T.J. Importância do uso de sementes de feijão livres de patógenos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p. 33-41, 2004.

VIEIRA, R.F.; VIEIRA, C.; RAMOS, J.A. **Produção de sementes de feijão**. Viçosa, MG: EPAMIG, 1993. 132 p.

YOKOYAMA, L.P.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. p. 1-22.

CAPÍTULO 2

Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a partir de diferentes formas de preparação dos extratos de sementes de feijão

RESUMO

SILVA, Franklin Cordeiro. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a partir de diferentes formas de preparação dos extratos de sementes de feijão. In: _____. **Otimização da técnica de PCR para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão** 2008. Cap. 2, p. 17-29. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Visando o desenvolvimento de uma metodologia para a detecção de Xap em análises de rotina em programas de certificação de sementes de feijão, avaliaram-se quatro métodos de preparação do extrato de sementes de feijão para a detecção de Xap via PCR: 1) extrato bruto de sementes; 2) extrato concentrado por filtração em membrana milipore (0,22 μ m de diâmetro) e ressuspensão em água ultrapura; 3) extrato concentrado por centrifugação a 16.000 rpm, por 30 minutos e 4) Bio-PCR. Foram utilizados os *primers* X4c (GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG) e X4e (CGC CGG AAG CAC GAT CCT CGA AG), considerados específicos para detecção de Xap. Para a obtenção dos extratos, 0, 1 e 2 sementes de feijão, inoculadas com Xap pela técnica de restrição hídrica, foram misturadas, respectivamente, a 1.000, 999 e 998 sementes consideradas sadias e, posteriormente, imersas em 600 mL de água destilada esterilizada, permanecendo, por 18 horas, a 10°C. Apenas a técnica de Bio-PCR permitiu a detecção de Xap em todos os extratos, inclusive no extrato sem adição de semente inoculada, o que indica a presença de Xap nas sementes de feijão consideradas sadias. Por esta técnica, a diagnose de um lote de sementes de feijão pode ser realizada em, aproximadamente, quatro dias.

* Orientador: Dr. Ricardo Magela de Souza – UFLA.

ABSTRACT

SILVA, Franklin Cordeiro. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* from different bean seeds extract preparation forms. In: _____. **Optimization of the PCR technique for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds**. 2008. Cap. 2, p. 17-29. Dissertation (Máster program on Agronomy- Phytopathology) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Aiming the development of a methodology for the detection of Xap in routine analyses in programs of certification of bean seeds, four seed extract preparation methods were assessed as for the detection of Xap via PCR: 1) gross seed extract; 2) concentrated extract by filtering through Millipore membrane (0,22µM in diameter) and re-suspension in ultra-pure water; 3) extract concentrated by centrifugation at 16,000 rpm for 30 minutes and 4) Bio-PCR. Primers X4c (GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG) and X4e (CGC CGG AAG CAC GAT CCT CGA AG), considered specific for Xap detection were used, for collecting extracts, 0, 1, and 2 bean seeds inoculated with Xap by the hydric restriction were merged respectively at 1000, 999 and 998 seeds considered healthy, later immersed in 600 ml of distilled, sterilized water, for 18 hours at 10°C. Only the Bio-PCR technique could allow for the detection of Xap in all extracts, including the one without the addition of inoculated seeds, which indicates the presence of Xap in bean seeds considered healthy. Through this technique, the diagnosis of a lot of bean seeds can be carried out in approximately four days' time.

*Guidance Committee: Dr. Ricardo Magela de Souza – UFLA (guiding professor)

1 INTRODUÇÃO

O crestamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) (Smith 1897; Vauterin et al., 1995) foi constatado, pela primeira vez no Brasil, em 1938 e descrito por Robbs (1954) ocorrendo em regiões de clima quente e úmido. Tem sido problemática nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo, Rio Grande do Sul e na região Centro-Oeste, principalmente na safra das águas (Bianchini et al., 2005).

As sementes podem ser efetivas fontes de inóculo primário de doenças, além de contribuir para a manutenção do poder infectivo e da longevidade de patógenos (Marques et al., 2005). Em certos casos, a fitobactéria encontra-se associada às sementes, sem que se possa perceber sua presença, em razão da ausência de sintomas externos visualmente reconhecíveis (Romeiro, 2001). Assim sendo, inspeções de campo nem sempre são suficientemente seguras para detectar o crestamento bacteriano comum, tornando-se necessária a detecção do patógeno por meio de testes de laboratório (Romeiro, 1993).

Segundo Valarini & Mentem (1992), além das inspeções de campo, torna-se importante utilizar métodos eficientes, sensíveis e relativamente rápidos para a detecção do patógeno em lotes de sementes de feijoeiro. Neste contexto, técnicas moleculares em procedimentos rotineiros de detecção de patógenos vêm sendo cada vez mais estudadas como ferramentas promissoras, devido à sua maior precisão em caracterizar organismos e apresentar resultados rápidos no processo de identificação (Louws et al., 1994).

Dentre as técnicas moleculares, a reação da polimerase em cadeia (PCR) tem se destacado na detecção de bactérias em sementes. A técnica de Bio-PCR consiste em deixar as sementes em uma solução extratora por períodos variáveis e submeter o sobrenadante à PCR, utilizando *primers* com alta especificidade e que forneçam resultados confiáveis (Rego, 2005). Nestes casos, procura-se

trabalhar com extratos das sementes, partindo-se da premissa de que já que é impossível encontrar uma semente infectada ou infestada, procura-se no lote inteiro (Romeiro, 2001).

Objetivou-se, com a realização deste trabalho, avaliar diferentes métodos de preparação do extrato de sementes de feijão para a detecção de Xap via PCR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e de Virologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Origem, isolamento, purificação e preservação do patógeno

O isolado de Xap obtido de folhas de feijoeiro provenientes da região produtora de Minas Gerais e se encontra preservado em peptona glicerol a -80°C (Lazo & Gabriel, 1987) e em folhas herborizadas. Para o uso experimental, este isolado foi transferido para o meio 523 (Kado & Heskett, 1970) pelo método de estrias paralelas e incubado por 48 horas, a 28°C.

2.2 Origem das sementes de feijão

Foram utilizadas amostras de sementes básicas do cultivar Pérola, as quais se encontravam armazenadas em câmara fria e seca (10°C e 50% UR), no Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA. Foram analisadas amostras de 1.000 sementes aplicadas em três tratamentos em triplicata. O tratamento 1 consistiu de 1.000 sementes sadias; o tratamento 2, de 1 semente inoculada artificialmente com Xap, em 999 sadias e o tratamento 3, com 2 sementes inoculadas artificialmente com Xap, em 998 sadias.

2.3 Preparo do meio de cultura

Ao meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970): 10 g de sacarose, 8 g de caseína ácida hidrolisada, 4 g de extrato de levedura, 2 g de K_2HPO_4 anidro, 0,3 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g de ágar bacteriológico e 1.000 mL de água destilada foram acrescidos de 66,10g manitol, para se atingir o potencial hídrico – 0,95 MPa (Mega Pascal). Este meio foi utilizado para a inoculação artificial das sementes de feijão pelo condicionamento osmótico que, segundo Kobayatsi (2002), é adequado para aumentar a eficiência do processo de inoculação de Xap em sementes de feijão.

2.4 Inoculação das sementes

As sementes de feijão foram desinfestadas superficialmente por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl 0,5%), por 2 minutos, sendo em seguida lavadas três vezes com água destilada esterilizada, colocadas em papel filtro e deixadas em câmara de fluxo laminar, por 1 hora, para secar. Foram colocadas 20 sementes de feijão em placas de Petri de 9 cm, contendo 30 mL de meio de cultura 523 + manitol, contendo a bactéria, agitados e guardados em câmara de crescimento, por 48 horas.

2.5 Preparação dos extratos de sementes de feijão para PCR

Utilizaram-se sementes do cultivar Pérola, inoculadas artificialmente pelo método de condicionamento fisiológico utilizando-se o manitol no potencial hídrico -0,95 MPa, com 48 horas de exposição.

2.5.1 Extrato bruto de sementes

Amostras de 1.000 sementes de feijão foram imersas em 600 mL de água destilada e esterilizada, permanecendo, aproximadamente, 18 horas à

temperatura de 4°C. Em seguida, foram retirados 5 µL desse extrato para uso direto para amplificação por PCR.

2.5.2 Extrato concentrado por filtração em membrana milipore

Após filtração de 100 mL dos extratos brutos em membrana millipore (0,22 µm de diâmetro de poro), estas permaneceram por 1 hora, a 28°C, sob agitação constante, emergidas em 5 mL de água ultrapura para serem lavadas para a recuperação das células bacterianas; 5 µL da suspensão obtida foram utilizados para PCR.

2.5.3 Extrato concentrado por centrifugação

Foram centrifugados 105 mL de extrato bruto a 16.000 rpm, por 30 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 3 mL de água ultrapura e 5 µL utilizados para a PCR.

2.5.4 Bio-PCR

Alíquotas de 500 µL de extrato bruto foram diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,85%), nas concentrações de 10^{-1} a 10^{-4} , sendo plaqueados 100 µL das diluições 10^{-2} e 10^{-4} em meio de cultura XCP1 (Tebaldi et al., 2007). As placas foram incubadas, por 72 horas, a 28°C, em câmara de crescimento.

Após o crescimento das colônias típicas, adicionaram-se às placas para resuspensão das colônias típicas ou não, 3 mL de água ultrapura, obtendo-se, assim, suspensões bacterianas mistas, das quais 5 µL foram utilizados diretamente para amplificação por PCR.

2.6 Reação de amplificação

As reações de amplificações de DNA foram realizadas em volume de 50 µL, sendo 5 µL de tampão 10 X; 3 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTP's; 1 µL de cada

primer X4c (5'-GGCAACACCCGATCCCTAAAACAGG-3') e X4e (5'-CGCCGGAAGCACGATCCTCGAAG-3') (Audy *et al.*, 1994); 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µl); 5 µL da suspensão bacteriana e 33,5 µL de água ultrapura.

Utilizaram-se, como controles, suspensão de Xap e água ultrapura. O ciclo utilizado foi 94°C/2 minutos, 25 ciclos de 94 °C/1 minuto, 58 °C/1 minuto, 72 °C/2 minutos e extensão final a 72 °C/8 minutos (Schaad *et al.*, 1995, modificado).

2.7 Eletroforese e fotodocumentação

Após a reação no termociclador, 5 µL das amostras acrescidas de 4 µL do corante azul de bromofenol, foram colocados em gel de agarose 1% preparado com tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5x, com corante fluorescente para ácidos nucleicos em água (Uniscience do Brasil) e submetidos, em seguida, à eletroforese. A fotodocumentação do gel foi realizada usando o programa de captura de imagens LisCap Version 2.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seguindo o protocolo de Kobayasti (2002) e utilizando-se os *primers* X4c e X4e, fragmentos específicos de DNA com 730 pb foram amplificados.

A utilização do extrato bruto não permitiu a detecção de Xap, independente do tratamento utilizado (Figura 1), possivelmente pela presença de inibidores de PCR. De forma semelhante, Schaad *et al.* (1995), ao realizarem estudos para detectar a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* diretamente do extrato de sementes, não obtiveram êxito nas análises.

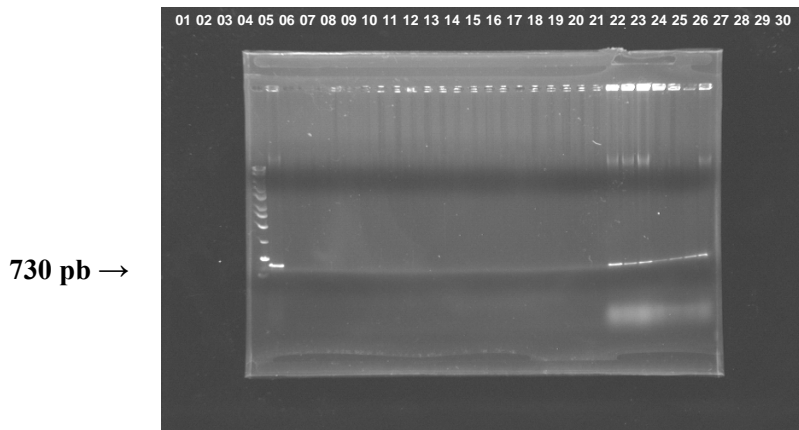


FIGURA 1. Análise eletroforética em gel de agarose (1%) de 5 μ L dos produtos amplificados a partir dos extratos de sementes de feijão obtidos por diferentes métodos; 01 marcador de DNA (Jena Bioscience); 02 Xap; 03 (0:1000)¹ eb; 04, 05, 06. (1:1000)² eb; 07, 08, 09. (2:1000)³ eb; 10. (0:1000) ef; 11, 12, 13. (1:1000) ef; 14, 15, 16. (2:1000) ef; 17. (0:1000) ec; 18, 19, 20. (1:1000) ec; 21, 22, 23. (2:1000) ec; 24, 25, 26. (1:1000) Bio PCR; 27, 28, 29. (2:1000) Bio PCR; 30. (0:1000) Bio PCR. ¹(0:1000) = 1000 sementes sadias; ²(1:1000) = 1 semente contaminada em 999 sadias; ³(2:1000) = 2 sementes contaminadas em 998 sementes sadias, eb = extrato bruto, ef = extrato filtrado em milipore, ec = extrato centrifugado. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Como se pode observar na Figura 1, não foi possível detectar a presença da bactéria Xap por PCR nos extratos resultantes da lavagem e da agitação das membranas de milipore utilizadas na filtração do extrato bruto. É possível inferir que as células bacterianas podem ter sido retidas nas membranas utilizadas e que a agitação utilizada foi insuficiente para desprendê-las.

O extrato concentrado por centrifugação não apresentou resultado positivo para detecção de Xap (Figura 1). Resultados diferentes foram obtidos por Deuner (2007), em cujo trabalho a utilização da centrifugação para a detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* a partir de

sementes artificialmente inoculadas proporcionou resultados favoráveis à sua detecção por meio da PCR.

É possível observar, ainda na Figura 1, que apenas a técnica de Bio-PCR permitiu a detecção de Xap em todos os extratos, inclusive no extrato sem adição de semente inoculada, o que indica a presença de Xap nas sementes de feijão consideradas sadias.

Kobayashi (2002), estudando a otimização da BIO-PCR para a detecção de Xap, observou que essa técnica permitiu a detecção de até uma colônia de bactérias por placa de Petri contendo meio seletivo. Diversos trabalhos confirmam a sensibilidade e a eficiência da BIO-PCR para outras bactérias em sementes de feijão, como *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Schaad et al., 1997) e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Deuner, 2007) e em outras culturas, como a batata, em que foi possível detectar a presença de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Schaad et al., 1999).

Schaad et al. (1995) afirmam que a técnica de BIO-PCR possui muitas vantagens quando comparada aos métodos padrões para PCR, principalmente para a detecção de patógenos em sementes em análises de rotina. Dentre as vantagens, podem-se destacar a simplicidade da técnica, o aumento da sensibilidade e a detecção somente de células vivas. Dessa forma, por meio da BIO-PCR elimina-se a possibilidade de falsos positivos resultantes da presença de células mortas que podem estar presentes nas sementes e de falsos negativos, devido ao potencial de eliminação de inibidores de PCR em extratos de sementes, aumentando a sensibilidade de detecção.

Dentre as diferentes formas de preparação dos extratos de sementes de feijão para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, verificou-se que os extratos obtidos a partir da ressuspensão das colônias bacterianas para emprego na Bio-PCR foram os mais promissores na detecção de Xap e que, com

base nos resultados obtidos na BIO-PCR, pode-se inferir que essa técnica é bastante promissora na detecção de Xap em sementes de feijão.

4 CONCLUSÕES

A utilização do extrato bruto, do extrato concentrado por centrifugação e por membrana milipore não permitiu a detecção de Xap em sementes de feijão artificialmente contaminadas.

A técnica de Bio-PCR permitiu a detecção de Xap a partir de extratos de sementes de feijão artificialmente contaminadas. Além disso, a Bio-PCR permite a detecção de Xap em um lote de sementes de feijão em quatro dias.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUDY, P.; LAROCHE, A.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; GILBERTSON, R.L. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c.* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 10, p. 1185-1192, Oct. 1994.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. V.2. Doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 333-349.

DEUNER, C.C. **Inoculação artificial e detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão**. 2007. 120 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

KOBAYASTI, L. **Inoculação, transmissão e detecção por Bio-PCR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão.** 2002. 125 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LAZO, G.R.; GABRIEL, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, n. 3, p. 448-453, Mar. 1987.

LOWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, July 1994.

MARQUES, A.S.A.; GUIMARÃES, P.M. SANTOS, J.P.; VIEIRA, M. Sobrevivência e viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão armazenadas sob condições controladas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 527-531, set./out. 2005.

REGO, A.M. Análise sanitária na produção de sementes de hortaliças. In: ZAMBOLIN, L. **Sementes: qualidade fitossanitária.** Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 267-332.

ROBBS, C.F.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; DEBRUIJN, F.J. A bacteriose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Distrito Federal. **Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3/4, p. 231-233, jul./dez. 1954.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas.** Viçosa, MG: UFV, 2001. 297 p.

ROMEIRO, R.S.; PEREZ, F.S.; OLIVEIRA, J.R.; PELOSO, M.J. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 1-5, 1993.

SCHAAD, N.W.; BERTHIER-SCHAAD, Y.; SECHLER, A.; KNORR, D. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated real-time fluorescence detection system. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 12, p. 1095-1100, Dec. 1999

SCHAAD, N.W.; BONDE, M.R.; HATZILOUKAS, E. Bio-PCR: a highly sensitive technique for detecting seedborne fungi and bacteria. In: HUTCHINS,

J.D.; REEVES, J.C. (Ed.). **Seed health testing**. Wallingford: Cab International, 1997. p. 159-164.

SCHAAD, N.W.; CHEONG, S.S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N.P. A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 243-248, Feb. 1995

TEBALDI, N. D.; SOUZA, R. M.; MACHADO, J. C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi-seletivo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 56-58, jan./fev. 2007

VALARINI, P.J.; MENTEM, J.O.M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão: detecção por inoculação em plantas indicadoras. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 171-180, 1992.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTES, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 472-489, July 1995.

CAPÍTULO 3

Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em lotes comerciais de sementes de feijão a partir de diferentes formas de preparação dos extratos

RESUMO

SILVA, Franklin Cordeiro. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em lotes comerciais de sementes de feijão a partir de diferentes formas de preparação dos extratos. In: _____. **Otimização da técnica de PCR para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão.** 2008. Cap. 3, p. 30-49. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap), é uma das principais doenças do feijoeiro. As sementes constituem a principal forma de sobrevivência e de disseminação do patógeno e a utilização de sementes livres da bactéria representa uma boa produtividade em áreas de cultivo. Para se evitar a proliferação da doença, quatro métodos de preparação do extrato de sementes de feijão foram utilizados para detectar a presença de Xap em lotes comerciais via PCR: 1) extrato bruto de sementes; 2) extrato concentrado por filtração em membrana milipore (0,22µM de diâmetro) e ressuspensão em água ultrapura; 3) extrato concentrado por centrifugação a 16.000 rpm por 30 minutos e 4) extrato bruto de sementes após cultivo em meio semi-seletivo (Bio-PCR). Foram utilizados os *primers* X4c (GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG) e X4e (CGC CGG AAG CAC GAT CCT CGA AG), considerados específicos para a detecção de Xap. Foram utilizadas amostras de 1.000 sementes/grãos de feijão de 47 lotes comerciais de diversas regiões do país, sendo os ensaios realizados em triplicatas. Buscou-se, ainda, a detecção simultânea de Xap e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em extratos de sementes e buscou-se a detecção com a utilização de meio de rotina para a técnica de Bio-PCR. A técnica de Bio-PCR permitiu a detecção de Xap em 18 lotes comerciais dos 47 analisados. A técnica de detecção simultânea de Xap e Cff no mesmo gel não foi viável por amplificar fragmentos de DNA típicos de Cff no controle Xap. O meio de cultura semi-seletivo XCP1, quando utilizado sem adição de antibiótico, permitiu a redução de um dia no período de incubação.

* Comitê orientador: Dr. Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador).

ABSTRACT

SILVA, Franklin Cordeiro. Detection of *Xanthomonas axonopodis* PV. *Phaseoli* in commercial lots of bean seeds, from different extracts preparation forms. In: _____. **Optimization of the PCR technique for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds.** 2008. Cap. 3, p. 30-49. Dissertation (Máster program on Agronomy- Phytopathology) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Common blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) is one of bean culture's most important diseases. Seeds are the chief means for survival and spreading of the pathogen, thus using bacteria-free seeds is worth good productivity. In order to avoid the disease's spreading through crop areas, four methods of preparation of bean seeds were approached so as to detect the presence of Xap in commercial lots via PCR: 1) gross seed extraction 2) concentrated extract through filtering through Millipore membrane (0,22µM in diameter) and re-suspension in ultra-pure water; 3) concentrated extract through centrifugation at 16,000 rpm for 30 minutes, and 4) gross extraction of seeds after cultivation in semi-selective agar medium (Bio-PCR). Primers X4c (GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG) and X4e (CGC CGG AAG CAC GAT CCT CGA AG) were used as they are considered specific for Xap detection. Samples with 1,000 seeds/grains of bean from 47 lots from several locations of the country were used, tests being carried out in triples. The simultaneous detection of Xap and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in seed extracts and the use of routine means for the Bio-PCR technique was also sought. The Bio-PCR technique allowed for Xap detecting in 18 out of 47 lots analyzed. The detection technique for simultaneous Xap and Cff in the same gel did not turn out feasible for it amplified Cff typical DNA fragments in the Xap control. The semi-selective agar medium XCP1, when applied without the use of antibiotics allowed for the reduction of one day from the incubation period.

*Guidance Committee: Dr. Ricardo Magela de Souza – UFLA (guiding professor)

1 INTRODUÇÃO

As sementes representam o meio mais eficiente de disseminação de patógenos a longas distâncias. Nelas, microrganismos conseguem sobreviver desde a colheita até o plantio, da próxima e até de safras subseqüentes, dependendo do patossistema. Em razão do comércio internacional e da maior exigência dos produtores, a sanidade de sementes é essencial para definir o destino do lote: venda imediata, tratamento ou descarte (Rego, 2005).

No controle das doenças, deve-se incluir, necessariamente, o uso de sementes sadias ou com níveis de contaminação dentro de padrões aceitáveis, obtidos a partir de lavouras livres de patógenos ou pela aplicação de métodos de tratamento eficientes (Carmo et al., 2004). Dentre as doenças bacterianas que afetam a cultura do feijoeiro, o crestamento bacteriano comum (CBC), causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap), é a que possui maior importância no Brasil (Sartorato & Rava, 2000). Além dessa, a murcha-de-curtubacterium, causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) (Hedges, 1922; 1926; Collins & Jones, 1983), embora detectada recentemente no Brasil (Maringoni & Rosa, 1997), tem trazido grande preocupação aos pesquisadores e aos produtores. Essas duas bacterioses têm nas sementes contaminadas suas principais formas de disseminação.

A análise fitossanitária tem ajudado muitos agricultores a impedirem que áreas livres de patógenos sejam contaminadas, fazendo com que a cultura a ser implantada seja economicamente viável, com vantagens quantitativas e para o agricultor. Para isso, é necessária a utilização de métodos eficazes que possam ajudar a detectar os fitopatógenos nas sementes.

Inspeções de campo nem sempre são suficientemente seguras para detectar as bacterioses do feijoeiro, o que leva, portanto, à necessidade de se detectar o patógeno por meio de testes de laboratório (Romeiro et al., 1993).

Para eficiência das análises em laboratório, é necessário contar com métodos específicos, sensíveis e de fácil execução para a detecção de bactérias nas sementes (Valarini, 1990).

Os métodos tradicionais apresentam valor limitado para a detecção de bactérias em sementes, devido às dificuldades da identificação precisa e ao consumo de tempo. Além disso, esses métodos proporcionam resultados confiáveis apenas quando as amostras de sementes contêm, proporcionalmente, maior quantidade do patógeno alvo do que de organismos saprofíticos. Métodos sorológicos, como teste ELISA e imunofluorescência, são úteis para testes rápidos, entretanto, falso positivo e falso negativo são problemas contínuos em tais testes (Schaad et al., 1997).

O desenvolvimento de técnicas moleculares tem evoluído de modo extremamente rápido, o que possibilita maior segurança e confiabilidade dos resultados na avaliação e no controle da qualidade de sementes (Vieira et al., 2006).

Os marcadores moleculares baseados na análise do DNA não são afetados pelo ambiente, permitindo uma análise mais objetiva e precisa. As técnicas envolvendo o DNA apresentam alto poder de resolução e, como as diferenças nas seqüências de nucleotídeos ao longo da fita de DNA de indivíduos distintos são extremamente abundantes, a distinção se torna mais fácil, na maioria dos casos (Borém, 2005).

Além de serem rápidas, sensíveis e específicas, as técnicas moleculares permitem economia de tempo e redução de custos na identificação de patógenos. Em laboratórios de análises de sementes, a técnica da PCR (reação da polimerase em cadeia), que consiste na amplificação enzimática por iniciadores (*primers*) de DNA, tem sido muito usada, possibilitando a detecção e o diagnóstico de algumas bactérias, inclusive *Xap*.

Toth et al.(1998) constataram a presença de Xap variante *fuscans* em folhas de feijoeiro infectado 10 dias antes dos sintomas da doença se tornarem visíveis, comprovando, dessa forma, a eficiência da PCR.

Este trabalho foi realizado com os objetivos de verificar a presença de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em lotes comerciais de sementes de feijão, por meio de diferentes formas de preparação do extrato e fazer a detecção simultânea de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Bacteriologia de Plantas e Virologia Vegetal do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Origem dos lotes de sementes de feijão

Foram utilizadas amostras de 47 lotes comerciais de sementes de feijão e também grãos, de diversas regiões do país (Tabela 1). Algumas amostras se encontravam armazenadas em câmara fria e seca (10°C e 50% UR), no Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA. Outras foram cedidas por pesquisadores de outras instituições ou adquiridas no comércio. As amostras foram compostas por 1.000 sementes e os ensaios realizados em triplicatas.

TABELA 1 Procedência dos lotes comerciais de sementes e grãos de feijão analisados para a presença de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Origem	Lote	Doadores
Botumirim - “Canastra”, MG	19	G. Souza (EMATER-MG)
Claro dos Poções, MG	16	J. C. Silva (EMATER-MG)
Claro dos Poções , “Boa Sorte”, MG	12	J. C. Silva (EMATER-MG)
Claro dos Poções - “Candeias”,MG	17; 18	J. C. Silva (EMATER-MG)
Distrito Federal Goiás	42 29; 40; 41	C. F. Uesugui (UNB) M. Lobo Jr. (EMBRAPA)
Jaíba - “Projeto Jaíba”, MG	07	Comércio
Janaúba - “Paraguaçu”, MG	09	Comércio
Janaúba - “Piranhas” MG Lavras, MG	06 01; 02; 03; 04; 13; 14; 15; 20; 21; 22; 23; 24; 27; 43; 44; 45; 46	A. Batista (produtor) Comércio
Madre de Deus, MG	26; 47	J. M. Vitório (produtor)
Mato Verde, MG	11	Comércio
Nova Porteirinha- “Paraguaçu”, MG	08	R. Souza (EMATER-MG)
Patrocínio, MG	28	Comércio
Porteirinha- “Áreas”, MG	05	Comércio
Santa Catarina	30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39	R. T. Casa (UDESC)
Santo Antônio do Retiro- “Rio Pardinho”, MG	10	Comércio
São João Del Rei, MG	25	J. M. Vitório (produtor)

2.2 Extrato bruto de sementes

Amostras de 1.000 sementes de feijão foram imersas em 600 mL de água destilada e esterilizada, permanecendo por, aproximadamente, 18 horas à temperatura de 4°C. Em seguida, foram retirados 5 µL desse extrato para uso direto na amplificação por PCR.

2.3 Extrato concentrado por filtração em membrana milipore

Cem microlitros de extrato bruto de sementes, obtidos conforme o item 2.2, foram filtrados em membrana millipore de 0,22 μm de diâmetro de poro. A seguir, as membranas permaneceram imersas em 5 mL de água ultrapura por uma hora, a 28°C, sob agitação constante. Cinco microlitros da suspensão obtida foram utilizados na PCR.

2.4 Extrato concentrado por centrifugação

Cento e cinco mL de extrato bruto foram centrifugados, a 16.000 rpm, por 30 minutos. Os sedimentos foram ressuspendidos em 3 mL de água ultrapura e 5 μL utilizados para a PCR.

2.5 Bio-PCR

Alíquotas de 500 μL de extrato bruto foram diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,85%), nas concentrações de 10^{-1} a 10^{-4} , sendo plaqueados 100 μl das diluições 10^{-2} e 10^{-4} em meio de cultura XCP1 (Tebaldi et al., 2007), sem a adição de antibióticos. As placas foram incubadas, por 48 horas, a 28°C, em câmara de crescimento.

Após o crescimento das colônias típicas, adicionaram-se 3 mL de água ultrapura às placas para suspensão das colônias, típicas ou não, obtendo-se, assim, uma suspensão bacteriana mista, da qual 5 μL foram utilizados diretamente para amplificação por PCR.

2.6 Detecção simultânea de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), em lotes comerciais de sementes

Com o objetivo de se detectar simultaneamente a presença de Xap e Cff, foram realizadas reações multiplex em extratos de 10 lotes comerciais de sementes/grãos de feijão. Testes anteriores indicaram a presença de Xap e Cff

nos lotes 29, 36, 38, 40, 41 e 47, Cff no lote 42, lotes 33 e 34 com Xap e o lote 32 com nenhuma das duas bactérias. Também foram plaqueados 50µL de suspensão bacteriana de Xap + 50µL suspensão bacteriana de Cff como testemunhas positivas.

Visando verificar algum tipo de contaminação da suspensão controle Xap e o efeito da diluição das suspensões de Xap + Cff, foi realizada outra PCR com colônias puras de Xap e diluição das suspensões de Xap + Cff.

2.7 Reação de amplificação

As reações de amplificações de DNA foram realizadas em volume de 50 µL, sendo 5 µL de tampão 10 X; 3 µL de MgCl₂; 1 µL de dNTP's; 1 µL de cada *primer* X4c e X4e (Audy et al., 1994); 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µl); 5 µL da suspensão bacteriana e 33,5 µL de água ultrapura.

Utilizou-se, como controle, suspensão de Xap e água ultrapura.

Os dois pares de *primers* X4c e X4e (Audy et al., 1994) e *Cff*FOR2 *Cff*REV4 (Tegli et al., 2002) foram adicionados ao mix da reação de PCR, para a detecção simultânea no mesmo gel de Xap e Cff.

O ciclo utilizado foi 94°C/2 minutos, 25 ciclos de 94 °C/1 minuto, 58 °C/1 minuto, 72 °C/2 minuto e extensão final a 72 °C/8 minuto (Schaad at al., 1995, modificado).

2.8 Eletroforese e fotodocumentação

Após a reação no termociclador, foram acrescentados 4 µL do corante azul de bromofenol a 5 µL do produto da reação e colocados em gel de agarose. O gel de agarose 1% foi preparado com tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5x e corante fluorescente para ácidos nucleicos em água (Uniscience do Brasil). Após a eletroforese, a fotodocumentação do gel foi realizada utilizando-se o programa de captura de imagens LisCap Version 2.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amplificações realizadas com os *primers* X4c e X4e revelaram a presença de Xap em 18 lotes comerciais de sementes/grãos, para os 47 lotes avaliados. Dentre as diferentes formas de preparação dos extratos utilizadas, verificaram-se amplificações apenas para Bio-PCR.

As vantagens da Bio-PCR sobre as técnicas existentes para PCR incluem a eliminação de falsos positivos resultantes da presença de células mortas que podem estar presentes nas sementes e eliminação de falsos negativos devido ao potencial de inibidores de PCR em extratos de sementes, aumentando a sensibilidade de detecção (Schaad et al., 1995).

Com o uso do meio de cultura XCP1 (Tebaldi et al., 2007) sem adição de antibiótico, a bactéria foi detectada em maior número de lotes, em comparação à detecção utilizando-se meio de cultura com antibióticos (Figura 2 e 3). Além da maior sensibilidade do método sem utilização dos antibióticos, foi possível reduzir o período de incubação para detecção da bactéria em um dia (Tabela 2) (Figura 1).

TABELA 2 Contagem do número de colônias suspeitas e saprófitas em meio de cultura XCP1 com e sem antibióticos, em 10 lotes comerciais de sementes/grãos de feijão, após 72 horas de incubação. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Lotes	Diluições	Com antibiótico		Sem antibiótico	
		Colônias suspeitas	Colônias saprófitas	Colônias suspeitas	Colônias saprófitas
29	10 ⁻²	1	33	6	15
29	10 ⁻⁴	-	51	1	12
32	10 ⁻²	-	-	-	7
32	10 ⁻⁴	-	1	-	1
33	10 ⁻²	3	36	6	>300
33	10 ⁻⁴	1	6	-	10
34	10 ⁻²	4	1	8	29
34	10 ⁻⁴	-	-	-	-
36	10 ⁻²	-	>300	47	>300
36	10 ⁻⁴	4	>300	7	>300
38	10 ⁻²	3	>150	18	170
38	10 ⁻⁴	-	-	-	3
40	10 ⁻²	3	16	7	>300
40	10 ⁻⁴	-	-	1	1
41	10 ⁻²	15	111	8	>300
41	10 ⁻⁴	3	2	-	8
42	10 ⁻²	-	>150	-	>300
42	10 ⁻⁴	-	-	-	18
47	10 ⁻²	138	>300	>300	>300
47	10 ⁻⁴	15	56	5	163
Testemunha	10 ⁻²	-	>300	>300	-
Testemunha	10 ⁻⁴	-	>300	>300	-

Observou-se que o crescimento de colônias suspeitas e saprófitas foi maior em meio de cultura sem antibióticos, porém, a redução de um dia no período de incubação permitiu diminuir a quantidade de DNA na suspensão, evitando-se, assim, falsos negativos.

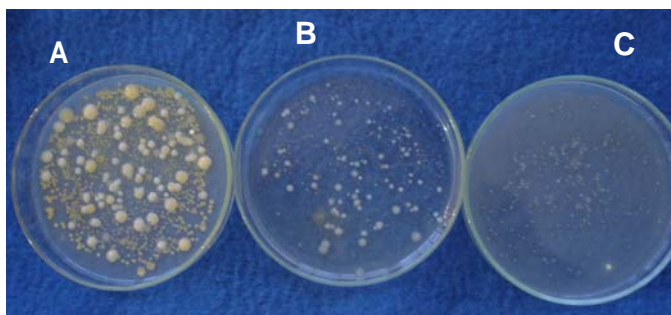


FIGURA 1 Colônias suspeitas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e saprófitas em meio de cultura MB1 (A), XCP1 sem antibióticos (B) e XCP1 com antibióticos (C), após 48 horas de incubação.

Após 48 horas de incubação, as colônias plaqueadas em meio de cultura XCP1 sem antibióticos já apresentavam crescimento bacteriano suficiente para a obtenção da suspensão para a BIO-PCR (Figura 1).

Na reação de BIO-PCR, o controle Xap apresentou ampliações típicas de Xap e de Cff (Figura 2 e 3). Na suspensão de Xap + Cff, não houve ampliações, possivelmente pelo excesso de DNA presente na suspensão.

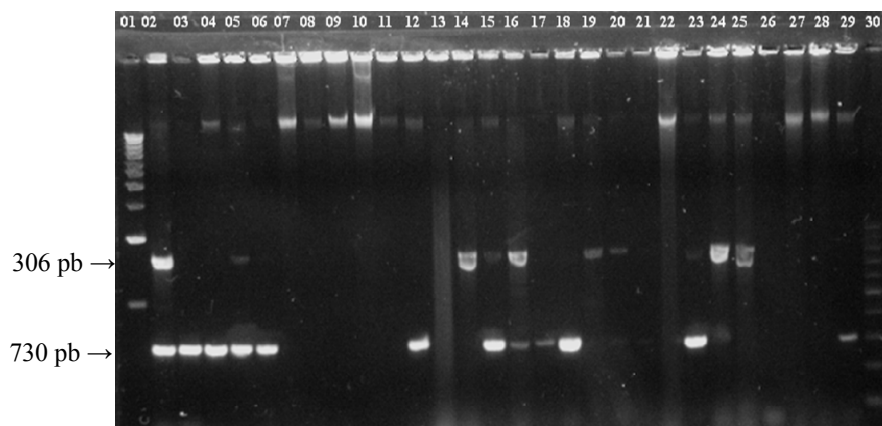


FIGURA 2 Análise eletroforética em gel de agarose (1%) de 5 μ L dos produtos amplificados de extratos de sementes comerciais de feijão plaqueados em diferentes meios de cultura, utilizando-se os *primers* específicos para Xap e Cff, em uma reação multiplex. **01** marcador de DNA (Jena Bioscience); **02** Xap; **03** Cff-SC; **04** Cff, **09** Xap + Cff, **12** Lote-47, **15** Lote-34, **18** Lote-41, **21** Lote-29, **26** Lote-33, **29** Lote-42 em meio de cultura CNS; **05** Cff, **07** Xap, **10** Xap + Cff, **13** Lote-47, **17** Lote-34, **20** Lote-41, **22** Lote-29, **25** Lote-33 **28** Lote-42 em meio de cultura XCP1 com antibiótico; **06** Cff, **08** Xap, **11** Xap + Cff, **14** Lote-47, **16** Lote-34, **19** Lote-41, **23** Lote-29, **24** Lote-33, **27** Lote-42, **30** marcador de DNA (Jena Bioscience). UFLA, Lavras, MG, 2008.

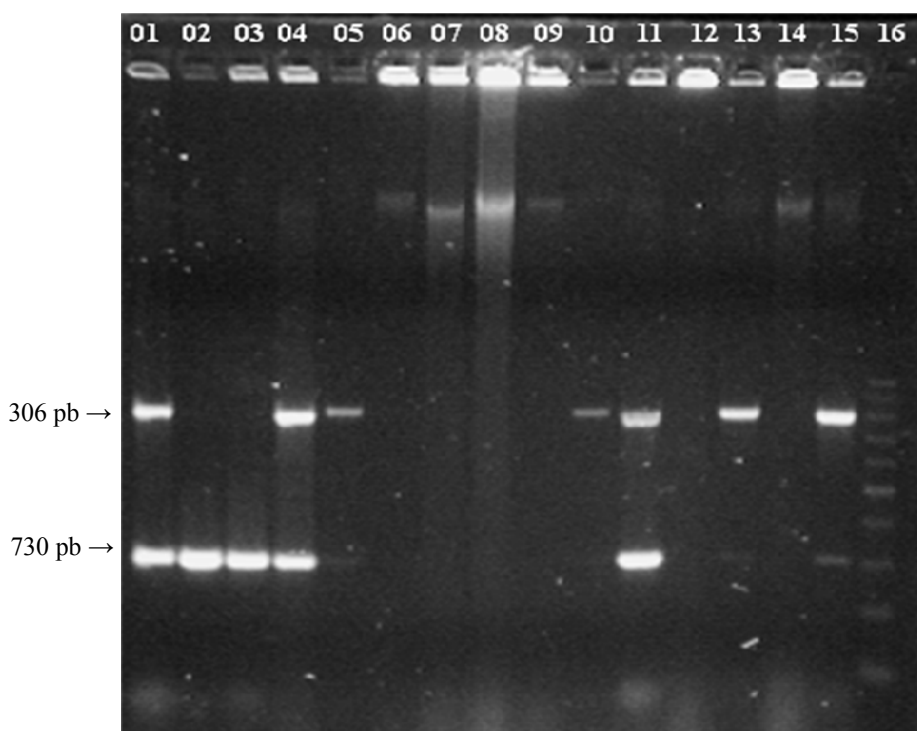


FIGURA 3 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%) de 5 μ L dos produtos amplificados de extratos de sementes de feijão plaqueados em diferentes meios de cultura, utilizando-se os *primers* específicos para Xap e Cff, em uma reação multiplex. **01** Xap; **02** Cff-SC; **03** Lote-40, **06** Lote-32, **09** Lote-38, **12** Lote-36 em meio de cultura CNS; **04** Lote-40, **08** Lote-32, **11** Lote-38, **13** Lote-36, **15** Lote-36 em meio de cultura XCP1 sem antibiótico; **05** Lote-40, **07** Lote-32, **10** Lote-38, **14** Lote-36 em meio de cultura XCP1 com antibiótico; **16** marcador de DNA (Jena Bioscience). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Verificou-se a amplificação de bandas típicas de Cff na suspensão controle Xap. Além disso, mesmo com as diluições das suspensões de Xap + Cff, não foi possível distinguir as duas bactérias na mesma reação, o que pode inviabilizar o uso da técnica multiplex (Figura 4).

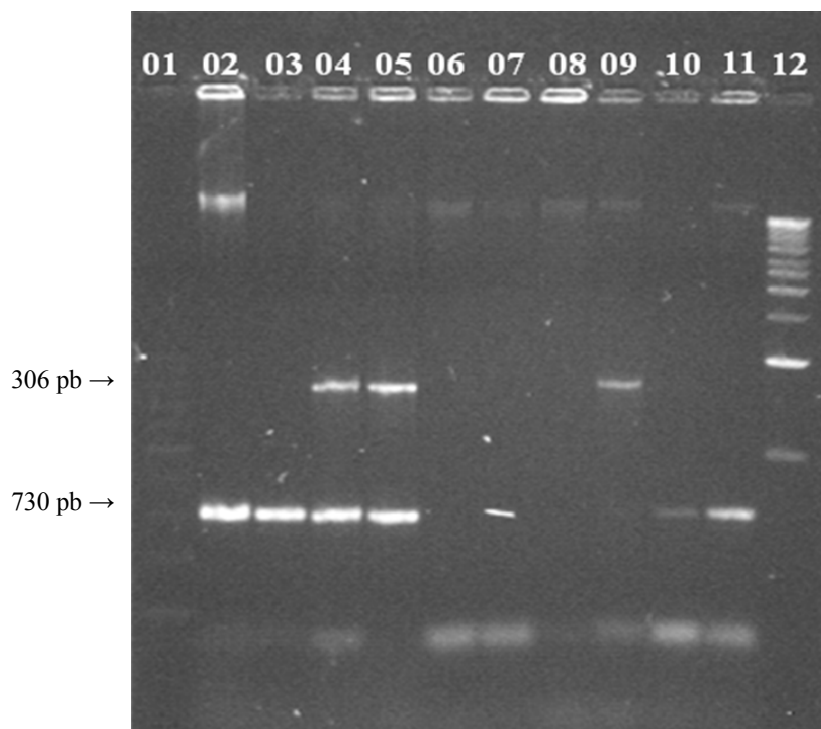


FIGURA 4 Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%) de 5 μ L dos produtos amplificados de suspensões bacterianas plaqueadas em diferentes meios de cultura, utilizando-se os *primers* específicos para Xap e Cff em uma reação multiplex. **01** marcador de DNA (Jena Bioscience); **02** Cff-SC; **03** Cff-SC; **04** Xap; **05** Xap; **06** Xap + Cff, **09** Xap + Cff em meio de cultura CNS; **07** Xap + Cff, **10** Xap + Cff em meio de cultura XCP1 com antibiótico; **08** Xap + Cff, **11** Xap + Cff em meio de cultura XCP1 sem antibiótico; **12** marcador de DNA (Jena Bioscience). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Dos 47 lotes comerciais de sementes/grãos de feijão analisados, foi detectada a presença de Xap pela técnica de BIO-PCR com plaqueamento em meio de cultura XCP1 (Tebaldi et al., 2005) sem adição de antibióticos em 18 lotes comerciais (Tabela 3).

TABELA 3 Resultado da análise de 47 lotes comerciais de sementes/grãos de feijão, quanto à presença de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, por meio de diferentes formas de obtenção do extrato. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Lotes	Extrato bruto	Filtração em membrana 0,22 μ M	Centrifugação a 16.000 rpm	Bio-PCR
01	-	-	-	+
02	-	-	-	-
03	-	-	-	-
04	-	-	-	-
05	-	-	-	+
06	-	-	-	+
07	-	-	-	-
08	-	-	-	-
09	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	-	-	-	+
27	-	-	-	-
28	-	-	-	+
29	-	-	-	+
30	-	-	-	+
31	-	-	-	+
32	-	-	-	-
33	-	-	-	+
34	-	-	-	+

Continuação da tabela 3

Lotes	Extrato bruto	Filtração em membrana 0,22 μM	Centrifugação a 16.000 rpm	Bio-PCR
35	-	-	-	+
36	-	-	-	+
37	-	-	-	+
38	-	-	-	+
39	-	-	-	+
40	-	-	-	+
41	-	-	-	+
42	-	-	-	-
43	-	-	-	-
44	-	-	-	-
45	-	-	-	-
46	-	-	-	-
47	-	-	-	+

A utilização do extrato bruto de sementes e a concentração do extrato por centrifugação, no volume de 105 mL, não permitiram detectar a presença da bactéria Xap (Tabela 3). Provavelmente, a presença de inibidores da PCR no extrato bruto e a baixa concentração das células bacterianas, mesmo após a centrifugação, impediram o resultado positivo.

Na filtração em membrana milipore, acredita-se que as células possam ter ficado retidas na membrana e que a agitação não foi suficiente para desprendê-las, apresentando, assim, resultados negativos.

Porém, propõe-se que novos estudos sejam feitos visando superar esses problemas, como, por exemplo, proceder à agitação da membrana em tampão por mais tempo após as filtrações, permitindo a liberação das células bacterianas. A extração das bactérias em meio enriquecido com peptona também são opções a serem investigadas.

4 CONCLUSÕES

O meio de cultura semi-seletivo XCP1 sem antibióticos permitiu maior recuperação de colônias de Xap do que em sua versão original com antibióticos.

A técnica de Bio-PCR possibilitou a detecção de Xap em 18 amostras de lotes comerciais de sementes de feijão, entre 47 analisados.

A utilização dos extratos de sementes de feijão obtidos diretamente (extrato bruto), concentrado por centrifugação ou por filtração em membrana milipore, não permitiu a detecção de Xap nos 47 lotes comerciais de sementes/grãos de feijão analisados.

A distinção de Xap e Cff no mesmo gel não foi possível, pois houve amplificação de um fragmento de 306 pb, típicos de Cff, tanto para Xap quanto pra Cff.

A Bio-PCR permite a detecção de Xap em lotes comerciais de sementes/grãos de feijão em três dias.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUDY, P.; BRAAT, C.E.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 4, p. 361-367, Apr. 1996.

BORÉM, A. Biotecnologia e sementes. In: ZAMBOLIN, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 1-34.

CARMO, M.G.F.; CORREIA, F.M.; CORDEIRO, E.S.; CARVALHO, A.O.; ROSSETO, C.A.V. Tratamento de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, jul./set. 2004.

COLLINS, M.D.; JONES, D. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium flaccumfaciens*. **Journal General of Microbiology**, London, v. 129, n. 11, p. 3545-3548, Nov. 1983.

HEDGES, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, Washington, v. 55, p. 433-4, 1922.

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

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

REGO, A.M. Análise sanitária na produção de sementes de hortaliças. In: ZAMBOLIN, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 267-332.

ROMEIRO, R.S.; PEREZ, F.S.; OLIVEIRA, J.R.; PELOSO, M.J. **Deteção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v. 15, n. 1, p. 1-5, 1993.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A. Patologia de sementes. In: VIEIRA, E.H.N.; RAVA, C.A. **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. p. 201-218.

SCHAAD, N.W.; BONDE, M.R.; HATZILOUKAS, E. Bio-PCR: a highly sensitive technique for detecting seedborne fungi and bacteria. In: HUTCHINS, J.D.; REEVES, J.C. (Ed.). **Seed health testing**. Wallingford: Cab International, 1997. p. 159-164.

SCHAAD, N.W.; CHEONG, S.S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N.P. A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 243-248, Feb. 1995.

TEBALDI, N.D. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão e aspectos epidemiológicos do crestamento bacteriano comum**. 2005. 102 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TEBALDI, N.D.; SOUZA, R.M.; MACHADO, J.C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi-seletivo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 56-58, jan./fev. 2007.

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

TOTH, I.K.; HYMAN, L.J., TAYLOR, R.; BIRCH, P.R.J. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant materials and its differentiation from *X.c.*pv. *phaseoli*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, n. 2, p. 327-336, Aug. 1998.

VALARINI, P. J. Método para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. 1990. 167 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.V.R.; SALGADO, K.C.P.C. Técnicas moleculares em sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 232, p. 88-96, maio/jun. 2006.