



FRANCISCO TARCÍSIO LUCENA

**DIVERSIDADE GENOTÍPICA E VIRULÊNCIA DE  
*Xanthomonas* spp. PATOGÊNICAS AO FEIJOEIRO**

**LAVRAS-MG  
2022**

**FRANCISCO TARCÍSIO LUCENA**

**DIVERSIDADE GENOTÍPICA E VIRULÊNCIA DE *Xanthomonas* spp.  
PATOGENICAS AO FEIJOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Bacteriologia de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

Orientador

Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães

Coorientadora

**LAVRAS - MG  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Lucena, Francisco Tarcísio.

Diversidade genotípica e virulência de *Xanthomonas* spp.  
patogênicas ao feijoeiro / Francisco Tarcísio Lucena. - 2022.  
44 p.

Orientador(a): Ricardo Magela Souza.

Coorientador(a): Sarah da Silva Costa Guimarães.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Crestamento bacteriano comum. 2. Phaseolus vulgaris. 3.  
rep-PCR. I. Souza, Ricardo Magela. II. Guimarães, Sarah da Silva  
Costa. III. Título.

**FRANCISCO TARCÍSIO LUCENA**

**DIVERSIDADE GENOTÍPICA E VIRULÊNCIA DE XANTHOMONAS spp.  
PATOGÊNICAS AO FEIJOEIRO**

**GENOTYPIC DIVERSITY AND VIRULENCE OF XANTHOMONAS spp.  
PATHOGENIC TO COMMON BEAN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Bacteriologia de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de janeiro de 2022.

Dr. Ricardo Magela de Souza - UFLA

Dra. Patrícia Ricardino da Silveira - UFLA

Dra. Alessandra Keiko Nakasone - EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

---

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

Orientador

Dr<sup>a</sup>. Sarah da Silva Costa Guimarães

Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2022**

## **Dedicatória**

Aos meus amados pais, Francisca Pereira dos Santos (*In memoriam*) e Francisco Cartaxo de Lucena, por todo amor, carinho e incentivo.

À Thalia Cartaxo, pessoa especial em minha vida.

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por tudo que tenho recebido.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade e apoio na realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Ricardo Magela de Souza, pela orientação, ensinamentos compreensão e amizade.

À Dra. Sarah da Silva Costa Guimarães, pela Coorientação, pelo auxílio na realização da pesquisa, amizade e incentivo.

À Ana Maria dos Santos, técnica do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, pelo auxílio na montagem dos experimentos e amizade.

Ao Professor Dr. Vinícius Quintão Carneiro por fornecer os genótipos de feijoeiro para a realização dos ensaios.

A todos os professores, funcionários e amigos do Departamento de Fitopatologia - UFLA que auxiliaram na realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Fernandes Antonio de Almeida, orientador de graduação, pela amizade e incentivo.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia Ariane de Souza Alvarenga pela amizade e orientação nas atividades burocráticas.

Aos amigos do mestrado João Gondim, Vinicius, Luiz, Nayane, Thalita, Viviane e Edinilson pela convivência agradável.

Aos meus amigos Joaquim, José Soares, Edmar, Zaqueu e Walter pelo apoio e incentivo constante.

Aos meus pais Francisco Cartaxo de Lucena e Francisca Pereira dos Santos (*in memoriam*) pelo apoio constante em minha vida e aos meus irmãos Verônica, Maria das Graças, Maria das Dores, Sueli, Joaquim Roberto (*in memoriam*), Waldízio, José, Antônio e Cícero pelo incentivo.

À Liliana Rocivalda Gomes Leitão, pelo apoio e carinho.

**O Meu muito obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

FRANCISCO TARCÍSIO LUCENA, filho de Francisco Cartaxo de Lucena e Francisca Pereira dos Santos, nasceu na cidade de Mauriti, Ceará, em 14 de outubro de 1995.

Em maio de 2013 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Campina Grande, Pombal-PB, graduando-se em Agronomia em maio de 2018, sob orientação do professor Fernandes Antonio de Almeida.

Em março de 2019 ingressou no Mestrado em Agronomia/Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras -MG, submetendo-se a defesa de dissertação em janeiro de 2022.

## RESUMO

LUCENA, Francisco Tarcísio. **Diversidade genotípica e virulência de *Xanthomonas* spp. patogênicas ao feijoeiro comum.** 2022. 44 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fitopatologia) Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em várias regiões do Brasil sob condições edafoclimáticas distintas. As doenças são as principais causas de redução na produtividade da cultura e, entre elas, o crestamento bacteriano comum (CBC), causado por *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xpp) e *X. citri* pv. *fuscans* (Xcf), se destaca. Entre as estratégias do manejo integrado de doenças a resistência genética se sobressai e, na busca por materiais resistentes, é necessário se conhecer a diversidade genética dos patógenos. Nessa ótica, os objetivos com o presente trabalho foram: obter isolados de *Xanthomonas* spp. de plantas de feijoeiro com sintomas de CBC; identificar os isolados empregando primers específicos; caracterizar os isolados quanto a produção de pigmento; avaliar a diversidade genética de *Xanthomonas* spp. por rep-PCR e avaliar a virulência dos isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* ao feijoeiro. Foram empregados 12 isolados de *Xanthomonas* spp. e duas cultivares de feijoeiro, Rudá e BRS Esplendor, suscetível e resistente, respectivamente. Os primers X4c e X4e foram usados na identificação das espécies de Xpp. Dos doze isolados nove produziram pigmentação marrom nos meios avaliados e os outros três não produziram pigmento. Há pelo menos três linhagens genéticas dentro de *X. phaseoli* pv. *phaseoli*. Observou-se diferença na virulência dos isolados sendo o isolado M 354 o mais virulento. Esses resultados evidenciam a existência de variabilidade na virulência nos isolados estudados.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*. Crestamento bacteriano comum. rep-PCR. Virulência.



## ABSTRACT

LUCENA, Francisco Tarcísio. **Genotypic Diversity and Virulence of *Xanthomonas* spp. pathogenic to common bean.** 2022. 44 p. Dissertation (Master Program in Phytopathology), Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is cultivated in several regions of Brazil under different edaphoclimatic conditions. Diseases are the main causes of reduced productivity of this crop. *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xpp) and *X. citri* pv. *fuscans* (Xcf) are the etiological agents of common bacterial blight (CBC), the main bacteriosis that affects this crop. Among the strategies of integrated disease management, genetic resistance stands out, in the search for resistant materials it is necessary to know the genetic diversity of these pathogens. In this perspective, the present work had as objectives: to obtain isolated of *Xanthomonas* spp. from plants with symptoms of CBC from bean; identify the isolates using specific primers; characterize the isolates for pigment production; evaluate the genetic diversity of *Xanthomonas* spp. by rep-PCR and to evaluate the virulence of *Xanthomonas* spp. to the bean plant. Twelve Xpp isolates and two bean cultivars, Rudá and BRS Esplendor, susceptible and resistant respectively, were used. Primers X4c and X4e were sufficient to identify Xpp species. Nine isolates produced brown pigmentation in the evaluated medium and the other three did not produce pigment. There are at least three genetic lines within *X. phaseoli* pv. *phaseoli*. There was a difference in the virulence of the isolates, with M 354 being the most virulent isolate. These results evidence the existence of virulence variability in the studied isolates.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*. Common bacterial blight. rep-PCR. Virulence.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
2.1 Cultura do Feijoeiro .....	13
2.2 Crestamento bacteriano comum – CBC (Xpp e Xcf) .....	14
2.3 Etiologia.....	14
2.4 Sintomatologia, epidemiologia e controle.....	16
2.5 Métodos de detecção de bactérias fitopatogênicas .....	17
2.6 Diversidade genética.....	18
<b>3 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivos específicos.....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
4.1 Localização da área do experimento.....	21
4.2 Obtenção, preservação e teste de patogenicidade dos isolados .....	21
4.3 Identificação dos isolados empregando primers específicos.....	22
4.3.1 Extração de DNA .....	22
4.3.2 Identificação de Xpp e Xcf utilizando <i>primers</i> específicos .....	23
4.4 Caracterização fenotípica .....	24
4.5 Avaliação da Diversidade genotípica por Rep-PCR.....	24
4.6 Virulência dos isolados de <i>Xanthomonas</i> spp. ao feijoeiro .....	25
4.6.1 Preparo das suspensões bacterianas e avaliação dos sintomas .....	25
4.6.2 Inoculação dos isolados bacterianos em feijoeiro .....	25
4.7 Avaliação da severidade do crestamento bacteriano comum.....	25
4.8 Procedimentos experimentais e análise estatística .....	26
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
5.1 Caracterização fenotípica .....	28
.....	30
5.2 Identificação e caracterização dos isolados de <i>Xanthomonas</i> spp. de feijoeiro empregando primers específicos .....	31
5.3 Diversidade genética.....	32
5.4 Avaliação da virulência.....	34
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é amplamente cultivado em vários países do mundo e o feijão constitui uma das principais fontes de proteínas e ferro na dieta humana. No Brasil a área cultivada na safra 19/20 foi de aproximadamente 2,92 milhões de hectares com produção de 3,058 milhões de toneladas de feijão e produtividade média de 1047 kg/há (CONAB, 2020), evidenciando a importância da cultura no cenário agrícola do país. Seu baixo custo de aquisição, comparado às proteínas de origem animal, e seu fácil preparo contribuíram para sua inserção como principal componente da cesta básica dos brasileiros (CARNEIRO, 2014).

Entretanto, fatores abióticos, como temperatura e pluviosidade, e fatores bióticos, como fitopatógenos, fungos, vírus, bactérias e nematoides, constituem um dos principais entraves para obtenção de elevadas produtividades da leguminosa (AMORIM *et al.*, 2016).

As principais doenças de importância econômica na cultura do feijoeiro comum são a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), a murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*), a podridão cinzenta da haste (*Macrophomina phaseolina*), a podridão radicular (*Rhizoctonia solani*), o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), o crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* - Xpp e *X. citri* pv. *fuscans* - Xcf) e o mosaico-dourado (*Bean Golden Mosaic Virus-BGMV*) (VALENTINI *et al.*, 2010; CARNEIRO, 2014; ANDRADE *et al.*, 2017).

Entre essas doenças o crestamento bacteriano comum (CBC) tem se destacado. As medidas de manejo comumente recomendadas para o CBC são a rotação de culturas, o uso de sementes sadias, a incorporação de restos culturais, o manejo adequado da irrigação e o controle químico (KARAVINA *et al.*, 2011).

A diagnose precisa é a base para se definir as estratégias efetivas de manejo de doenças visando à máxima eficiência econômica em um sistema de cultivo. A diagnose de doenças de origem bacteriana teve início com o emprego de métodos convencionais de identificação de bactérias fitopatogênicas, como os testes bioquímicos, de patogenicidade e o cultivo em meios seletivos (BORÉM; CAIXETA, 2016).

Embora esses métodos sejam indispensáveis em análises de rotina, a sensibilidade, especificidade e o excessivo tempo de execução limitam a sua aplicação. O advento da biologia molecular permitiu o desenvolvimento das técnicas moleculares, que somados

às técnicas de rotina conferem maior eficiência tanto nos estudos de diagnose como em estudos de virulência em patógenos de plantas (MARIGONI, 1998).

No rol dessas técnicas a reação em cadeia da polimerase baseada em sequência repetitiva (rep-PCR) tem sido frequentemente empregada nos estudos de diversidade genética de microrganismos. Nas diagnoses a PCR utilizando *primers* específicos permite a amplificação de baixas quantidades do DNA de um patógeno em particular presente em uma determinada amostra (BORÉM; CAIXETA, 2016).

Assim, objetivou-se com este trabalho acessar a diversidade genética e avaliar os níveis de virulência de isolados de *Xanthomonas* spp. obtidos de plantas com sintomas de crestamento bacteriano comum.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cultura do Feijoeiro

O gênero *Phaseolus* spp. compreende cerca de 55 espécies, das quais cinco tem valor econômico, *P. vulgaris* L., *P. coccineus*, *P. lunatus*, *P. acutifolius* e *P. polyanthus* (CARNEIRO, 2014).

Segundo a CONAB (2020) a produção brasileira de feijão comum na safra 19/20 foi de 3,058 milhões de toneladas em uma área cultivada de 2,92 milhões de hectares, com uma produtividade média de 1.047 kg/ha.

A região Centro-Oeste do país responde por 23,11% da produção nacional com uma produtividade média 1757 kg / ha, 70,74% maior que a média nacional, evidenciando assim que o grau de tecnologia e o manejo fitossanitário empregados são fatores decisivos para o alcance de altas produtividades (CONAB, 2020).

Na ótica nutricional o grão de feijão é um alimento que engloba em sua constituição 25% de proteínas e todos os aminoácidos essenciais à dieta humana tais como: isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, triptofano, histidina e valina. Vale ressaltar que esses aminoácidos estão na forma livre sendo prontamente absorvidos pelo organismo, justificando sua importância na alimentação humana (FUKUJI *et al.*, 2019).

No Brasil seu baixo custo comparado às proteínas de fonte animal, a exemplo da carne bovina, fez deste grão a principal fonte de proteína para as classes sociais de baixo poder aquisitivo (GONTIJO NETO, 2015).

Vale salientar que o feijoeiro também é cultivado no modelo de agricultura familiar, contribuindo assim para geração de postos de trabalho no campo (GONTIJO NETO, 2015).

Embora algumas regiões brasileiras tenham obtido altas médias a produtividade do feijoeiro ainda é limitada face a atuação de fatores bióticos (fitopatógenos, ervas daninhas e pragas) e abióticos (manejo nutricional, escolha de cultivar e clima), que culminam para a redução dessa produtividade (VALE; BERTINI; BORÉM, 2017).

As doenças, particularmente as causadas por bactérias, constituem graves danos à cultura do feijoeiro e fatores agravantes, como erros de diagnose ou ausência de medidas eficientes de controle, contribuem para as perdas de rendimento na produção dessa leguminosa (VALE; BERTINI; BORÉM, 2017).

## 2.2 Crestamento bacteriano comum – CBC (Xpp e Xcf)

As doenças bacterianas constituem um dos principais fatores de redução na produtividade da cultura do feijoeiro. A mais grave dessas doenças é o crestamento bacteriano comum – CBC, com distribuição global, principalmente em regiões com condições climáticas onde predominam umidade e temperatura elevadas (ANDRADE *et al.*, 2017).

Embora não se encontre na literatura nacional dados que quantifiquem as perdas causadas pelo CBC ao feijoeiro, pesquisas internacionais relatam que elas podem reduzir em 40% a produção (SINGH; MIKLAS, 2015). No Estado de Michigan - EUA foram constatadas perdas de 33% devido ao crestamento bacteriano em três cultivares de feijoeiro e também influência negativa no desenvolvimento do dossel da cultura resultando em aceleração da maturidade, senescência e desfolhamento precoce de plantas infectadas (WALLEN; GALWAY, 1977).

## 2.3 Etiologia

O CBC é causado por um complexo de espécies bacterianas, inicialmente classificadas como *X. campestris* pv. *phaseoli* e *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. Em 1995, após uma revisão taxonômica do gênero *Xanthomonas* empregando a homologia de DNA e testes fenotípicos, este patovar foi transferido para a espécie *X. axonopodis* (YOUNG *et al.*, 1978; VAUTERIN *et al.*, 1995) e as cepas de *fuscans* formando uma variante dentro do patovar. Em um novo estudo de revisão taxonômica do complexo de espécies de *X. axonopodis* Constantin *et al.* (2016) propuseram que *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* fosse renomeada para *X. phaseoli* pv. *phaseoli* e a variante *fuscans* para *X. citri* pv. *fuscans*.

Tanto Xpp como Xcf pertencem ao filo Proteobacteria, classe Gamma Proteobacteria, ordem Xanthomonadales, família Xanthomonadaceae, Gram-negativas, baciliformes com 0,87 por 1,9 microm e um flagelo polar. A morfologia das colônias é caracterizada pelo amarelo limão, colônias lisas, convexas e circulares (BREED; MURRAY e SMITH, 1994; SCHAAD; JONES; CHUN, 2001).

Estudos recentes realocaram espécies do gênero *Xanthomonas* empregando a caracterização polifásica e análises simultâneas de sequências de genes. Portanto, atualmente a etiologia do CBC é atribuída a quatro linhagens genéticas pertencentes a duas espécies do gênero *Xanthomonas*, *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* -Xcf englobando as linhagens *fuscans*, NF2 e NF3 e *X. phaseoli* pv. *phaseoli* - Xpp composta pela linhagem

não fuscans NF1 (CONSTANTIN *et al.*, 2016, PAIVA, 2018). Um resumo do histórico da classificação taxonômica dessas duas espécies está descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resumo do histórico da classificação taxonômica de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*.

Autores	Classificação
Dye & Lelliott, 1974 citado por Young <i>et al.</i> (1978).	1 espécie e 1 variante: <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i> e <i>X. c.</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>
Vauterin <i>et al.</i> (1995)	1 espécie e 1 variante: <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> e <i>X. a.</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>
Rademaker <i>et al.</i> (2005)	2 grupos rep-PCR: 9.4 ( <i>X. a.</i> pv. <i>phaseoli</i> ) 9.6 ( <i>X. a.</i> pv. <i>phaseoli</i> e <i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> )
Schaad <i>et al.</i> (2006)	2 espécies: <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xap) e <i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> (Xff)
Alavi <i>et al.</i> (2008)	4 linhagens genéticas dentro de 2 espécies: linhagem <i>fuscans</i> (Xff); Xap GL1; Xap GL2 e Xap GL3.
Constantin <i>et al.</i> (2016)	4 linhagens genéticas dentro de 2 espécies: linhagem <i>fuscans</i> ( <i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i> ); NF3 ( <i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i> ); NF2 ( <i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i> ) e NF1 ( <i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> )

Fonte: PAIVA, 2018.

Algumas cepas bacterianas dos agentes etiológicos do CBC produzem pigmento marrom quando cultivadas em meio contendo tirosina e são, portanto, denominadas "fuscans". A cor marrom surge do ácido homogentísico oxidado (ácido 2,5 dihidroxifenilacético), um intermediário na via catabólica da tirosina que é secretado e oxidado nas cepas de fuscans (GOODWIN E SOPHER, 1994). O pigmento não está diretamente associado à virulência (SINGH; MIKLAS, 2015).

Trabalhos recentes de sequenciamento do genoma de isolados de *X. citri* pv. *fuscans* revelaram uma deleção de nucleotídeo único no gene *hmgA*, que codifica a enzima homogentisato oxigenase (ARITUA *et al.*, 2015).

Esta enzima catalisa uma etapa na via de degradação da tirosina que converte tirosina em fumarato e, desse modo, sua inativação possivelmente interrompe a degradação da tirosina levando ao acúmulo de homogentisato e sua subsequente oxidação

para formar o pigmento marrom em cepas de Xcf (GOODWIN E SOPHER, 1994). No entanto, estudos de revisão taxonômica realizado por Constantin *et al.* (2016) revelaram populações de isolados de Xcf não produtores de pigmento.

#### **2.4 Sintomatologia, epidemiologia e controle**

Os sintomas característicos da doença podem ser observados em toda a parte aérea da planta, como folhas, vagens, caules, sementes e botões florais (SINGH; MIKLAS, 2015). Inicialmente são observadas nos folíolos manchas encharcadas que evoluem em tamanho progredindo para necróticas, podendo apresentar halo amarelecido em seu contorno (AMORIM; REZENDE; CAMARGO, 2016).

No caule, são visualizadas manchas alongadas e encharcadas que se tornam avermelhadas, causando estrangulamento do caule e possível quebra. Algumas vezes, quando a infecção ocorre na região do nó das folhas primárias, pode ocorrer quebra da planta nesta região durante a fase reprodutiva originando o sintoma denominado podridão nodal (ROMEIRO, 2005).

As lesões nas vagens inicialmente são circulares e encharcadas, tornando-se necróticas de cor avermelhada. Nas sementes pode ocorrer o enrugamento seguido de manchas marrons ou amareladas sendo esta última característica mais visível em variedades de semente branca (AMORIM; REZENDE; CAMARGO, 2016).

A disseminação do patógeno, em estado hipobiótico, ocorre principalmente por sementes do hospedeiro, onde pode sobreviver por cerca de 2 a 15 anos, podendo estar localizada interna ou externamente sem perder a sua virulência. Água, restos culturais e plantas daninhas também são vias secundárias pelas quais a bactéria pode ser veiculada (ANDRADE *et al.*, 2017). Tais bactérias podem sobreviver por 6 a 18 meses em resíduos de plantas sobre ou acima da superfície do solo em condições de seca, em restos culturais e em plantas daninhas (BELETE; BASTAS, 2017).

A infecção primária ocorre por meio de aberturas naturais (lenticelas, hidatódios, estômatos e estruturas florais) ou ferimentos causados por insetos e danos mecânicos na presença do patógeno, podendo resultar em períodos de incubação - PI de seis dias (PI: corresponde ao número de dias entre a inoculação do patógeno e o surgimento dos sintomas). A infecção secundária pode ocorrer a partir de material vegetal infectado presente no campo pelos mesmos métodos de dispersão já descritos para a infecção primária (SINGH; MIKLAS, 2015).



O controle de CBC do feijoeiro vem sendo realizado por meio de várias medidas tais como: emprego de sementes certificadas, rotação de culturas e controle químico. O controle químico é uma ferramenta que juntamente com outras medidas de controle, como uso de cultivares resistentes auxilia na manutenção da população bacteriana abaixo do limiar necessário ao desenvolvimento e disseminação do patógeno (BELETE; BASTAS, 2017).

Estão registrados no AGROFIT sete produtos químicos para o controle da doença, sendo cinco produtos à base de cobre (Bioprogress, Contact, Garabt BR, Kocide WDG Bioactive e Redshield 750) e dois produtos que apresentam como ingrediente ativo o acibenzolar-S-metil: Actigard e Bion 500 WG (MAPA, 2021).

Contudo essas medidas têm baixa efetividade nos sistemas produtivos (VALE *et al.*, 2017).

Informações sobre a diversidade genética de isolados de *Xanthomonas* spp. são primordiais para a seleção de genótipos resistentes. Lopez *et al.* (2006) avaliando 26 isolados de Xpp e Xcf de diferentes regiões do mundo, por meio de rep-PCR e RAPD, encontraram pouca diversidade genética entre os isolados, porém grande distância genética entre Xpp e Xcf, evidenciando a necessidade de se estudar essa diversidade.

Mutlu *et al.* (2008) estudando a virulência de cepas de Xpp e Xcf em genótipos de feijão de diferentes regiões do globo, constataram que as cepas de Xcf apresentaram maior virulência que Xpp e que a variação na virulência foi maior entre as cepas de Xpp.

## **2.5 Métodos de detecção de bactérias fitopatogênicas**

A detecção precisa de fitopatógenos é primordial na tomada de decisão no que tange ao planejamento do manejo integrado de doenças. Uma diagnose precisa requer alto nível de especificidade, sensibilidade e execução da metodologia adotada (AUDY *et al.*, 1994).

A diagnose de fitopatógenos se dá pelo emprego de métodos convencionais de identificação (testes bioquímicos, teste de patogenicidade) e, com o advento da biologia molecular, as técnicas moleculares foram incorporadas com o objetivo de complementar e otimizar a diagnose (BORÉM; CAIXETA, 2016). As técnicas convencionais de identificação têm como base dados fenotípicos e avaliações da presença de sinais e sintomas do patógeno no hospedeiro. Contudo, a sensibilidade e especificidade dessas técnicas limitam seu uso individual para diagnoses de alta complexidade, além de demandar maior tempo de execução (BORÉM; CAIXETA, 2016).

Nesse contexto, especificidade é conceituada como a capacidade de detectar o organismo de interesse na ausência de falsos positivos e negativos e a sensibilidade está relacionada ao menor número de patógenos detectados de forma confiável por ensaios ou amostras (LOPEZ *et al.*, 2003).

A PCR é empregada em diagnóstico de doenças de plantas, incluindo inúmeras doenças bacterianas (JENSEN; WEBSTER; STRAUS, 1993).

AUDY *et al.* (1994) estudando métodos de detecção via PCR em *X. phaseoli* obtiveram um par de primers específicos para a detecção de Xpp e Xcf (X4c e X4e), os quais contém sequências repetitivas do DNA genômico e do plasmídeo da bactéria. Os autores concluíram que houve a amplificação de um fragmento com 730 pb para os isolados de Xpp e uma banda adicional de 550 pb para os isolados de Xcf. Halfeld-Vieira *et al.* (2001) confirmaram a eficiência desses primers na identificação de Xpp e Xcf.

## **2.6 Diversidade genética**

As bactérias constituem um grupo de seres vivos detentores de uma das maiores fontes de diversidade genética até então conhecida, visto sua elevada plasticidade genética e o elevado grau de dependência em relação aos fatores ambientais (TIQUIA, 2010).

Em bactérias fitopatogênicas ocorrem modificações no material genético via inúmeros mecanismos, como recombinações e mutação por transposons, os quais permitem adquirir variabilidade genética, conferindo maior plasticidade às variações do ambiente nas populações seguintes (ROMEIRO, 2005).

A compreensão dessa diversidade genética é primordial para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro visando a definição de estratégias de controle (KARAVINA *et al.*, 2011).

Além disso, conhecer a variabilidade patogênica na população do patógeno constitui uma das bases para estudos de melhoramento genético visando à seleção de variedades resistentes ou tolerantes com amplo espectro.

Dentre as inúmeras técnicas moleculares utilizadas em estudos de variabilidade genética, rep-PCR vem sendo empregada na caracterização de isolados bacterianos. Famílias de sequências de DNA repetitivas altamente conservadas estão dispersas no genoma de diversas espécies bacterianas (VERSALOVIC *et al.*, 1994).

Três famílias vêm sendo estudadas com mais ênfase: REP (“repetitive extragenic palindromic”), ERIC (“enterobacterial repetitive intergenic consensus”) e BOX (“BOX

element”) coletivamente intituladas de rep-PCR (SOUZA; MARINGONI; KRAUSE-SAKATE, 2006).

Oligonucleotídeos iniciadores foram obtidos a partir das regiões flanqueadoras destas sequências repetitivas e, quando usados na reação de polimerização em cadeia (PCR), produzem uma amplificação seletiva de regiões genômicas localizadas entre os elementos REP, ERIC e BOX (FOURIE; HERSELMAN, 2011).

Os produtos de amplificação mostram um perfil de amplificação específica ao nível de espécie, subespécie, patovar ou mesmo de isolados (VERSALOVIC *et al.*, 1994).

A associação entre variação na virulência em Xpp e Xcf com a origem geográfica foi relatada em estudos realizados por Rava (1984), o qual verificou que os isolados de Xpp oriundos do Brasil, Colômbia, Porto Rico e Uganda, integraram o grupo de maior virulência em comparação aos isolados de Nebraska - EUA e por Rava e Romeiro (1990), em que isolados de Xpp oriundo de regiões tropicais apresentavam maior grau de virulência comparados aos oriundos de zonas temperadas.

Os resultados referentes a estudos sobre a diferença de virulência entre isolados de Xpp e Xcf demonstram contradição, visto que tem sido reportada maior virulência de Xcf (EKPO; SAETTLER, 1976) como também ausência de diferença na virulência entre estes. Halfeld-Vieira e Souza, (2000) verificaram que não houve diferença no grau de virulência entre *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*, assim como a origem geográfica não influenciou sobre esse fator.

Nesse contexto se faz necessário a realização de estudos que busquem responder essas indagações para que se possa implementar medidas de manejo fitossanitário efetivas no sistema de produção do feijoeiro.

### **3 OBJETIVO GERAL**

Acessar a diversidade genética e avaliar a virulência de *Xanthomonas* spp. do feijoeiro por rep-PCR.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- I. Obter isolados de *Xanthomonas* spp. de plantas de feijoeiro com sintomas do CBC;
- II. Identificar os isolados empregando primers específicos;
- III. Caracterizar os isolados quanto a produção de pigmento em meio de cultura;
- IV. Avaliar a diversidade genética de *Xanthomonas* spp. do feijoeiro por rep-PCR;
- V. Avaliar a virulência dos isolados de *Xanthomonas* spp. ao feijoeiro.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Localização da área do experimento

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia (DFP) da UFLA - Lavras, Minas Gerais.

### 4.2 Obtenção, preservação e teste de patogenicidade dos isolados

Os isolados PROG 125; PROG 122; VR 20; M 373; RIL 18 e M 354 foram obtidos de plantas sintomáticas do centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária da UFLA (CDCT) - Fazenda Muquém. O isolado Lagoa da Prata foi obtido de materiais de feijoeiro sintomático (Folhas) na cidade de Lagoa da Prata-MG. Os isolados Guaxupé, UFLA 02; UFLA 04 e UFLA 72 foram obtidos da coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do DFP/UFLA, incluindo o isolado de referência Xpp CFBP 6165 da “*Collection Français de Bactéries Phytopathogènes*” (CFBP), preservados em folhas de feijoeiro herborizadas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Identificação e origem dos isolados de *Xanthomonas* spp. obtidos de feijoeiro.

Código	Identificação	Origem	Data da coleta
1	CFBP 6165*	CFBP	03/98
2	UFLA 02	CDCT/UFLA	03/02
3	UFLA 04	CDCT/UFLA	03/02
4	Guaxupé	Guaxupé-MG	03/02
5	UFLA 72	CDCT/UFLA	03/02
6	PROG 125	CDCT/UFLA	11/19
7	PROG 122	CDCT/UFLA	11/19
8	VR 20	CDCT/UFLA	11/19
9	Lagoa da prata	Lagoa da Prata - MG	02/20
10	M 373	CDCT/UFLA	11/20
11	RIL 18	CDCT/UFLA	11/20
12	M 354	CDCT/UFLA	11/20

\*CFBP: isolado referência

No isolamento a partir dos materiais vegetais de feijoeiro coletados foi realizado inicialmente o teste de exsudação em gotas (MARIANO; SOUZA, 2017). Constatada a presença da bactéria fitopatogênica foi realizado o isolamento em placas de Petri contendo meio de cultura 523 de Kado e Heskett (1970) empregando-se o método de estrias paralelas, em seguida as mesmas foram mantidas em B.O.D (Demanda bioquímica do oxigênio) a 28 °C por 48 horas (ROMEIRO, 2001).

Para o teste de patogenicidade, sementes de feijoeiro da cultivar suscetível Rudá foram cultivadas em vasos de dois Kg contendo substrato composto por solo, areia e

esterco na proporção 2:1:1 e realizada adubação com formulado NPK 4-14-8 na dosagem de 2.5 g/vaso.

A patogenicidade dos isolados foi confirmada em casa de vegetação pela inoculação da suspensão bacteriana nas folhas do feijoeiro no estágio V3 (primeiro trifólio totalmente expandido), pelo método de agulhas múltiplas de Andrus (1948) (FOURIE; HERSELMAN, 2011). Previamente, foi realizada câmara úmida, em que as plantas de feijoeiro foram revestidas com cobertura plástica e regas a cada 3 horas, por 24 horas antes da inoculação e 48 h depois, e mantidas à temperatura de 28 °C. Para a inoculação, o folíolo principal do feijoeiro foi colocado sobre uma esponja previamente umedecida com a suspensão e em seguida pressionou-se o conjunto de agulhas previamente imersa na suspensão bacteriana sobre este (SILVA *et al.*, 2009). Posteriormente as plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida a 28 °C por 48 horas e observadas diariamente até o surgimento dos sintomas, lesões encharcadas com halo amarelo.

#### **4.3 Identificação dos isolados empregando primers específicos**

A partir das folhas inoculadas sintomáticas foram realizados os isolamentos das bactérias, as extrações dos DNAs e as PCRs utilizando primers específicos para as identificações.

##### **4.3.1 Extração de DNA**

Cada isolado foi submetido ao plaqueamento em meio de cultura 523 de Kado e Heskett (1970) e mantido durante 36 horas a 28 °C, em B.O.D. Em seguida as colônias foram ressuspensas em 1,5 mL de água Milli-Q, para então serem submetidas à extração do DNA bacteriano seguindo o protocolo de AUSUBEL *et al.* (1991). Após a extração o DNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ® ND-1000 UV-Vis), onde também foi verificada a sua qualidade. Em seguida, o DNA foi submetido à diluição em água estéril e deionizada para a concentração de 20 ng/ µl (AUSUBEL *et al.*, 1991). A extração foi realizada seguindo o protocolo Ausubel *et al.* (1991) conforme descrito abaixo.

#### **Procedimento**

1. Cultivou-se a bactéria em 2 ml de meio de cultura 523 de Kado e Heskett a 28°C por 36 h. Após este período, adicionou-se 1 a 3 alças do crescimento bacteriano em um microtubo;
2. Adicionou-se 567 µL de Tris base- acetato - EDTA (TE 1x) e agitou-se no vortex;

3. Adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de SDS 10% e 3  $\mu\text{L}$  de proteinase K (20 mg/mL), agitou-se no vortex e incubou-se por 1 hora a 37°C.
4. Posteriormente adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M, e agitou-se no vortex;
5. Adicionou-se 80  $\mu\text{L}$  de CTAB/NaCl, agitou-se no vortex e levou-se ao banho maria a 65°C por 10 min;
6. Adicionou-se 780  $\mu\text{L}$  de clorofórmio /álcool isolamílico na proporção de 24:1, agitou-se manualmente por 10 min e centrifugou-se por 10 min a 10.000 rpm;
7. Transferiu-se 600  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para outro microtubo;
8. Adicionou-se 360  $\mu\text{L}$  de Isopropanol gelado, misturou-se gentilmente até o DNA precipitar e centrifugou-se a 10.000 rpm por 15 minutos;
9. Descartou-se o sobrenadante, preservando o pellet, e adicionou-se 1 mL de etanol 70% e centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 rpm e posteriormente colocou-se para secar em papel toalha;
10. Ressuspendeu-se o pellet em 50  $\mu\text{L}$  TE uma vez acrescido de RNase (10 mg mL<sup>-1</sup>) e incubou-se a 37°C por 30 min. Posteriormente o DNA foi quantificado e as amostras diluídas para a concentração de 20 ng e estocou-se a - 20 °C.

#### **4.3.2 Identificação de Xpp e Xcf utilizando *primers* específicos**

A reação de PCR para a detecção de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* foi conduzida de acordo com os procedimentos descritos por Audy *et al.* (1994). A amplificação foi realizada em volume final de 20  $\mu\text{l}$ , contendo 5  $\mu\text{l}$  de tampão 10X, 3  $\mu\text{l}$  de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1  $\mu\text{l}$  de dNTP mix 10 mM, 1  $\mu\text{l}$  de cada primer (100  $\mu\text{M}$ ) X4c (GGC AAC ACCCGA TCC CTA AAC AGG) e X4e (CGC CGG AAG CAC GAT CCT CGA AG), 0,5 $\mu\text{l}$  da taq Polimerase, 5  $\mu\text{l}$  da cultura bacteriana diluída em água, e 13, 2  $\mu\text{l}$  de água Milli-Q.

O controle positivo foi representado pelo isolado de referência CFBP 6165. A amplificação foi conduzida em 30 ciclos de desnaturação (94 °C / 1 min), anelamento (65 °C / 2 min) e extensão (72 °C / 2 min), e uma extensão final a 72 °C / 10 min, em termociclador (MJresearch, modelo PTC-100).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese, onde foram acrescidos no produto da amplificação cinco  $\mu\text{l}$  do corante azul de bromofenol, e adicionado em gel de agarose 1,5%, preparado com Tris base- acetato-EDTA (TAE) 1x, por duas horas a 80 volts. O marcador utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foi de 1

kb e o gel foi submetido à coloração com gel red 3 µl. A visualização das bandas e fotodocumentação foi realizada usando o fotodocumetador MiniBIS Pro.

#### **4.4 Caracterização fenotípica**

Cada isolado foi repicado nos meio de cultura King B; GYCA e YDC por 72 h. Depois de repicadas, as colônias foram mantidas a 28°C em B.O.D. por 72 h para se verificar a produção do pigmento marrom (KING; WARD; RANEY, 1954; BIRCH *et al.*, 1997). Os ensaios foram repetidos duas vezes.

#### **4.5 Avaliação da Diversidade genotípica por Rep-PCR**

Os iniciadores ERIC (eric1R 5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C 3' e eric 2 5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3'), BOX (boxA1R 5' CTA CGC CAA GGC GAC GCC TGA CG 3') e REP (rep1 R-I 5' III CGI CGI CAT CIG GC 3' e rep2 R-I 5' ICG ICT TAT GIG GCC TAC 3'), foram utilizados separadamente para amplificação dos DNAs dos isolados. As reações foram realizadas em volume de 20 µL, contendo 2,5 µL 10X Taq buffer; 1,2µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0,5 µL de dNTP (10 mM); 0,5 µL do primer (10 µM); 0,3 µL de enzima Taq DNA polimerase (5U/ µL) (Invitrogen), 2 µL de DNA (50ng/µL) e 13µL de água livre de nucleasse (AUDY *et al.*, 1994).

As amplificações foram realizadas em Therm 1000 Axigen Maxigene utilizando-se os seguintes ciclos para o iniciador ERIC: um ciclo inicial de 95 °C por 7 min; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 44 °C por 1 min e extensão a 65 °C por 8 min seguido de um ciclo final de extensão a 65 °C por 15 min. Para os iniciadores BOX e REP as etapas de amplificação foram: um ciclo inicial a 95 °C por 7 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min (40 °C por 1 min para REP) e extensão a 65 °C por 8 min, seguidos de um ciclo final de extensão a 65 °C por 15 min.

Após as amplificações foram acrescentados 5 µl de corante azul de bromofenol nas reações, as quais foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5 %, preparada com tampão Tris base- acetato- EDTA (TAE) 1x, por 2 horas a 80 Volts. O marcador utilizado foi de 1 Kb. Em seguida, os géis foram visualizados e as imagens capturadas usando o Bio- Rad sistema de documentação de gel.

Os perfis eletroforéticos obtidos por rep-PCR foram analisados por sistema binário (bandas presentes 1 ou ausentes 0, para cada isolado). A matriz de similaridade foi construída utilizando-se o coeficiente de Dice. O dendrograma foi obtido utilizando-se o algoritmo de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) por meio do software PAST vers. 2.17 (HAMMER *et al.*, 2001).



Além dos isolados de Xpp e Xcp também foi empregado no estudo de diversidade um isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* fora do grupo, sendo este pertencente a coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas do DFP/UFLA.

#### **4.6 Virulência dos isolados de *Xanthomonas* spp. ao feijoeiro**

##### **4.6.1 Preparo das suspensões bacterianas e avaliação dos sintomas**

Os isolados obtidos do material vegetal foram semeados em placas de Petri com meio de cultura 523 de Kado e Heskett (1970) pelo método de estrias paralelas, incubados em B.O.D a 28°C por 48 h. Após o crescimento foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) com a concentração ajustada em espectrofotômetro para  $A_{600nm} = 0,23$ , o que corresponde a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (ROMEIRO, 2001; SILVA *et al.*, 2009).

##### **4.6.2 Inoculação dos isolados bacterianos em feijoeiro**

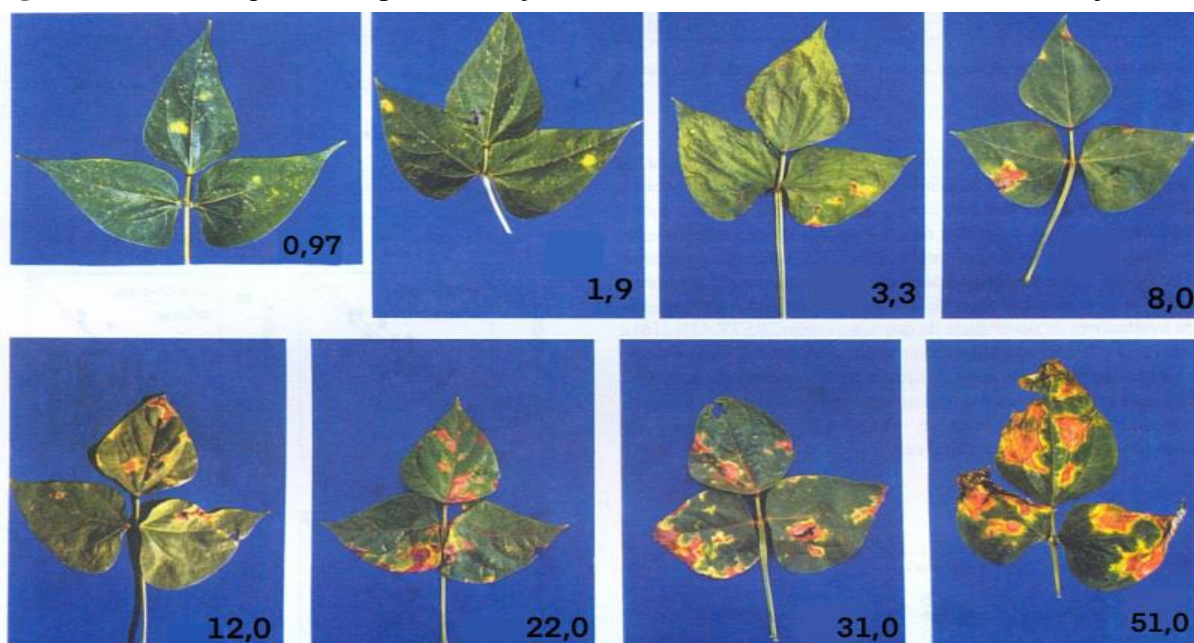
Foram empregadas duas cultivares de feijoeiro sendo uma resistente, BRS esplendor, e uma suscetível, Rudá (SILVA *et al.*, 2009). Foram selecionados dois trifólios por planta os quais foram identificados com fios de lã.

As plantas ao atingirem o estágio vegetativo (V3, 14 - 21 dias), foram inoculadas empregando-se o método de agulhas múltiplas como descrito acima.

#### **4.7 Avaliação da severidade do crestamento bacteriano comum**

As avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias, sendo a primeira 7 dias após a inoculação (PI de 7 dias), totalizando três avaliações. Foi utilizada a escala diagramática de Diaz, Bassanezi e Bergamin Filho (2001), a qual é baseada na porcentagem de área foliar com lesões necróticas, amarelas ou translúcidas. A escala diagramática é composta por oito níveis de severidade: 1- 0,97; 2- 1,9; 3- 3,3; 4- 8,0; 5- 12; 6- 22; 7-31 e 8-51% (Figura 1).

**Figura 1.** Escala diagramática para avaliação do Crestamento bacteriano comum em feijoeiro.



Fonte: DIAZ; BASSANEZI; BERGAMIN FILHO (2001).

Com os dados de severidade no decorrer do tempo foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) pelo método de integração trapezoidal. A AACPD foi calculada empregando-se a seguinte equação de Shaner & Finney (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} \left[ \frac{(x_i + x_{i+1})}{2} \right] (t_{i+1} - t_i)$$

Onde:

AACPD: área abaixo da curva de progresso da doença.

$n$  : é o número de avaliações,

$x$  é a proporção da doença e  $(t_{i+1} - t_i)$  o intervalo entre duas avaliações consecutivas.

#### **4.8 Procedimentos experimentais e análise estatística**

O delineamento estatístico empregado foi em blocos casualizados (DBC) em arranjo fatorial, sendo dois acessos de feijoeiro (BRS esplendor resistente e Rudá suscetível) x 13 tratamentos (12 isolados e testemunha) com quatro repetições totalizando 104 parcelas. Os ensaios foram repetidos duas vezes. Procedeu-se à análise de variância para os dados obtidos a partir da área abaixo da curva de progresso da doença, e posteriormente as médias foram submetidas ao teste de agrupamento univariado de Scott Knott ao nível de 5% probabilidade empregando-se o Software GENES (CRUZ, 2016). Adotou-se o modelo estatístico:  $Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l$ .

Onde:

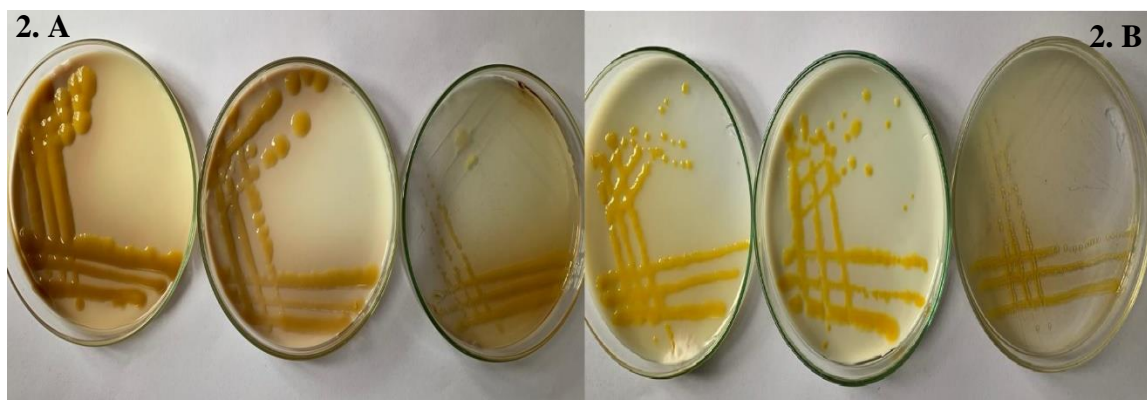
Bi: efeito de bloco; lj: efeito dos isolados; Ck: efeito dos cultivares e Ejkl: efeito do erro.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização fenotípica

Os isolados de *Xanthomonas* spp. obtidos de feijoeiro estudados apresentaram as características culturais padrões: colônias amarelas, convexas e brilhantes com crescimento liso e mucoide. Os isolados Referência CFBP 6165; UFLA 2; Guaxupé; UFLA 72; Prog 125; Prog 122; M373; RIL 18 e M 354, correspondentes a 75% dos isolados estudados, crescido nos meios KING B; GYCA e YDC por 72 horas, apresentaram a produção de pigmento marrom (Figura 2A). Os isolados UFLA 04, VR 20 e Lagoa da Prata não produziram a pigmentação marrom nos meios avaliados (Tabela 3, Figura 2B).

**Figura 2.** Colônias de *Xanthomonas* spp. obtidas de feijoeiro e cultivadas em meios King B; GYCA e YDC por 72 h. 2A Produtora de pigmento marrom: isolado UFLA 02. 2B Não Produtora de Pigmento marrom: isolado VR 20.



Fonte: Autor (2022).

Observou-se variação no crescimento entre os isolados nos diferentes meios avaliados, com crescimento mais acentuado nos meios YDC e GYCA. Os isolados M 354, RIL 18, M373, VR 20, UFLA 04 e UFLA 02 foram os que apresentaram maior crescimento em relação aos demais isolados.

Os isolados estudados apresentaram as mesmas características encontradas por Tebaldi *et al.* (2007), Torres, Silva Junior e Marigoni (2009) e Paiva *et al.* (2018) em estudos de detecção e caracterização de isolados de *Xanthomonas* spp. do feijoeiro.

Embora o escurecimento do meio por alguns isolados tenha sido no passado empregado como marcador na identificação de Xpp e Xcf, essa característica não configura um marcador consistente, visto que estudos de sequenciamento do genoma de Xcf realizado por Constantin *et al.* (2016) evidenciaram isolados dentro de Xcf que produziam pigmentos e outros não.

O sequenciamento do genoma da cepa *fuscans* Xcf revelou que a deleção de um gene descrito como *hmgA*, responsável pela codificação da enzima homogentisato oxigenase resultava no acúmulo de homogentisato e sua subsequente oxidação para formar o pigmento marrom dentro de isolados de Xcf, porém alguns isolados de Xcf não sofreram essa deleção levando a existência de populações de isolados não produtores de pigmento (ARITUA *et al.*, 2015).

**Tabela 3.** Produção de pigmento marrom por isolados de *Xanthomonas* spp.

Isolado	King B 31/12/21	GYCA 31/12/21	YDC 31/12/21	King B 03/01/22	GYCA 03/01/22	YDC 03/01/22
Referência	*++	++	++	++	+++	+++
CFBP 6165						
Crescimento						
Pigmento	+	+	+	+	+++	+
UFLA 02	++	++	++	+++	+++	+++
Crescimento						
Pigmento	++	++	++	+++	+++	+++
UFLA 04	++	++	++	+++	+++	+++
Crescimento						
Pigmento	*-	-	-	-	-	-
Guaxupé	++	++	++	++	+++	+++
Crescimento						
Pigmento	+	+	++	++	+++	+++
UFLA 72	++	++	++	++	+++	+++
Crescimento						
Pigmento	+	+	++	++	+++	+++
PROG 125	+	+	+	++	+++	+++
Crescimento						
Pigmento	+	-	+	+	+++	++
PROG 122	++	++	++	++	+++	+++
Crescimento						
Pigmento	+	-	-	++	+++	+++
VR 20	++	++	++	+++	+++	+++
Crescimento						
Pigmento	-	-	-	-	-	-
Lagoa da Prata	+	+	+	+++	+++	+++
Crescimento						
Pigmento	-	-	-	-	-	-
M 373	++	++	++	+++	+++	+++
Crescimento						
Pigmento	+	++	++	+++	+++	+++
RIL 18	++	++	++	+++	+++	+++
Crescimento						

Pigmento	++	++	++	+++	+++	+++
M 354	++	++	++	+++	+++	+++
Crescimento						
Pigmento	++	++	++	+++	+++	+++

---

\*- Ausência de produção de pigmento ou crescimento; +: leve; ++: moderado; +++: intenso

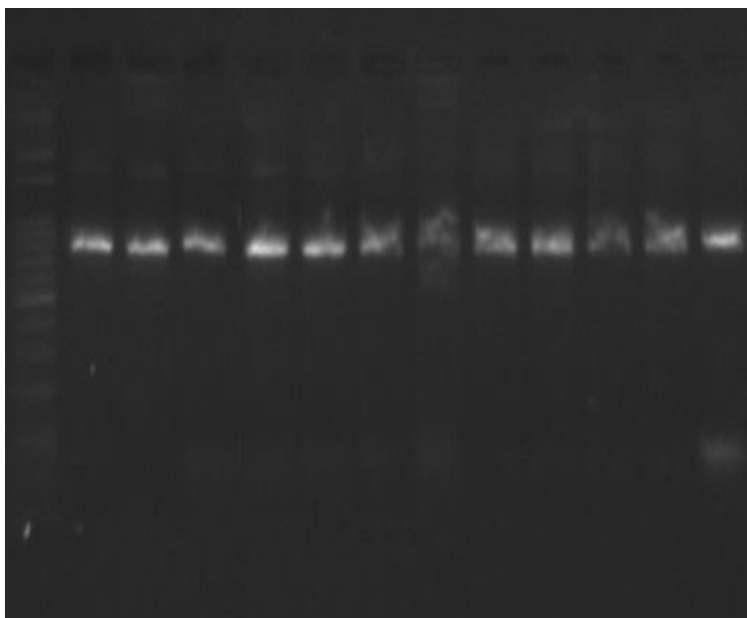
## 5.2 Identificação e caracterização dos isolados de *Xanthomonas* spp. de feijoeiro empregando primers específicos

Os doze isolados avaliados apresentaram o mesmo tamanho de banda 730 pares de bases, como o isolado de referência CFBP 6165 *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (Figura 3). Segundo Halfeld-Vieira *et al.* (2001) e Paiva (2014) os primers X4c e X4e são suficientes para identificar as espécies de Xpp e Xcf, esses mesmos autores também não observaram para nenhum isolado de Xcf um fragmento adicional.

Figura 3. Identificação dos Isolados de *Xanthomonas* spp. utilizando primers específicos X4c e X4e.

M 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12

730 pb



Fonte: Autor (2021).

M: marcador; 01 referência CFBP 6165; 02 UFLA 02; 03 UFLA 04; 04 Guaxupé; 05 UFLA 72; 06 PROG 125; 07 PROG 122; 08 VR 20; 09 Lagoa da prata; 10 M 373; 11 RIL 18 e 12 M354.

### 5.3 Diversidade genética

A diversidade genética foi avaliada entre 12 isolados de *Xanthomonas* spp. patogênicos ao feijoeiro por meio da análise dos padrões de *fingerprinting* utilizando a técnica de BOX-PCR.

Com base nos agrupamentos do dendrograma, os isolados, independente do município de origem ou ano de obtenção, apresentaram perfil genético semelhante ao isolado de referência Xpp CFBP 6165, sendo, portanto, identificados como *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (sinônimo *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*).

Dos 12 isolados, observou-se que quatro (UFLA 02, UFLA 72, VR 20 e Guaxupé) apresentaram 100% de similaridade com o isolado de referência Xpp CFBP 6165. O isolado UFLA 04 apresentou 89% de similaridade, enquanto os demais isolados (PROG 125, PROG 122, Lagoa da prata, M 373, RIL 18, M 354) apresentaram 87% de similaridade com o isolado de referência Xpp CFBP 6165 (Figura 4).

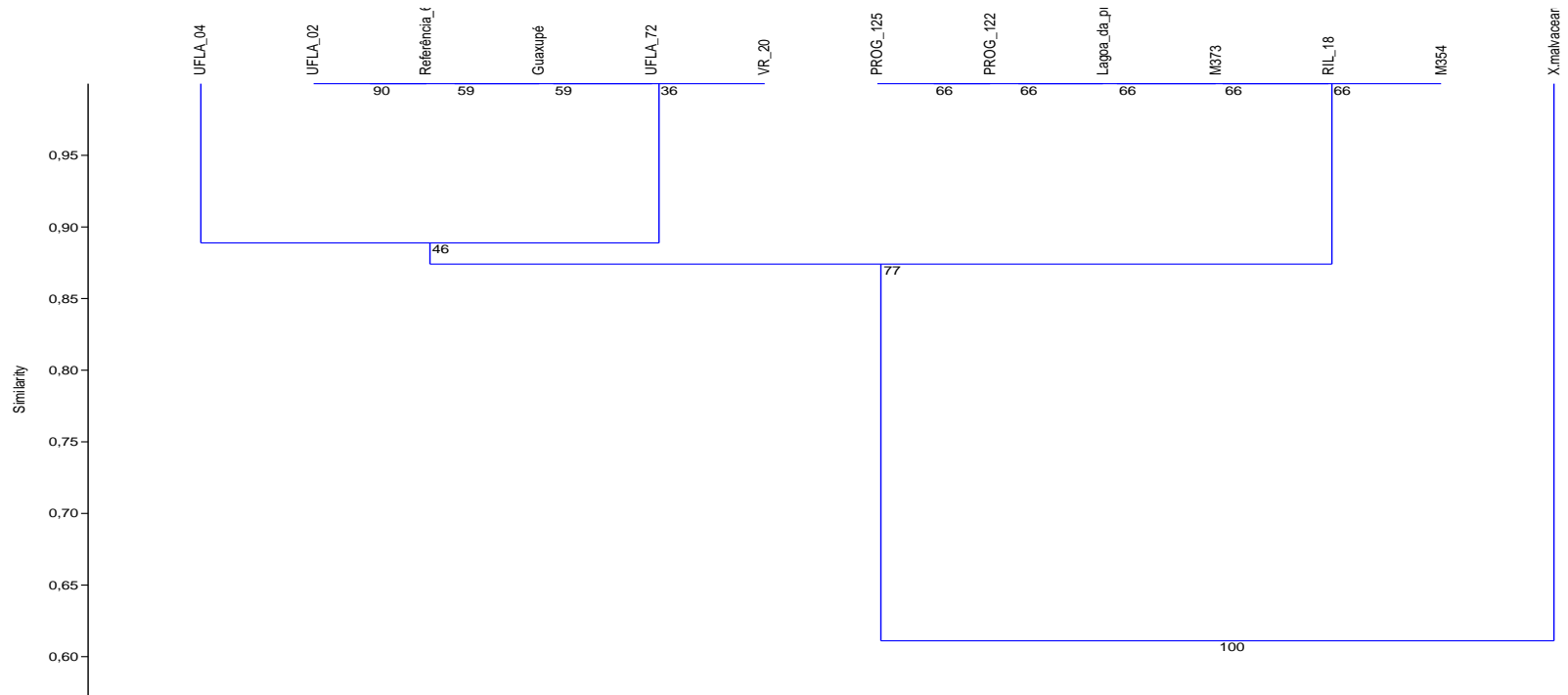
Este resultado demonstra que há pelo menos três linhagens genéticas dentro de *X. phaseoli* pv. *phaseoli*.

O isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (sinônimo *X. citri* pv. *malvacearum*) pertencente ao filogrupa PG I do complexo de espécies *Xanthomonas axonopodis* (CONSTANTIN *et al.* 2016), no qual também está incluído *X. citri* pv. *fuscans* (sinônimo *X. fuscans* subsp. *fuscans*), apresentou 61% de similaridade em relação *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, pertencente ao filogrupa PG III do complexo de espécies *Xanthomonas axonopodis* (Figura 4).

Paiva *et al.* (2018) estudando a diversidade de populações de Xpp e Xcf, observaram valores maiores para loci polimórficos (59%) para Xpp, enquanto entre os isolados Xcf essa medida foi de apenas 21%, revelando que essa população era mais diversa geneticamente, corroborando esse resultado.



**Figura 4.** Dendrograma obtido a partir do coeficiente de Dice entre os perfis rep-PCR dos isolados de *Xanthomonas sp.* obtidos de feijoeiro com sintomas de cretamento bacteriano comum empregando a região BOX.



#### 5.4 Avaliação da virulência

A análise de variância demonstra que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os doze isolados, entre as cultivares e entre a interação isolados x cultivar estudados (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resumo da análise de variância para as cultivares de feijoeiro Rudá e BRS Esplendor, respectivamente suscetível resistente a *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*, inoculadas com doze isolados da bactéria em casa de vegetação.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>
<b>Blocos</b>	3	12.784
<b>Isolados</b>	11	605.881*
<b>Cultivar</b>	1	145.818 *
<b>Isolado x cultivar</b>	11	77.365 *
<b>Isolados x cultivar</b>	22	341.623 *
<b>Isolados/Cultivar Rudá</b>	11	411.156 *
<b>Isolados/Cultivar BRS Esplendor</b>	11	272.090 *
<b>Cultivar/Isolados</b>	12	83.070 *
<b>Cultivar/ Referência 6165</b>	1	345.031*
<b>Cultivar/ UFLA 02</b>	1	33.031 ns
<b>Cultivar/ UFLA 04</b>	1	19.882 ns
<b>Cultivar/ Guaxupé</b>	1	26.345 ns
<b>Cultivar/ UFLA 72</b>	1	57.791 *
<b>Cultivar/ PROG 125</b>	1	271.174 *
<b>Cultivar/PROG 122</b>	1	1.398 ns
<b>Cultivar/ VR 20</b>	1	170.643 *
<b>Cultivar/ Lagoa da Prata</b>	1	17.720 ns
<b>Cultivar/ M 373</b>	1	2.506 ns
<b>Cultivar/ RIL 18</b>	1	14.524 ns
<b>Cultivar/ M354</b>	1	36.793 ns

<b>Resíduo</b>	69	-
<b>Total</b>	95	-
<b>CV (%)</b>	11.23	

**Legenda:** \* Significativo a 5 % pelo teste F.

**Fonte:** Autor (2021)

O teste de Scott & Knott agrupou os isolados em cinco grupos. O isolado M 354, pertencente ao grupo A, apresentou a maior média da AACPD nas cultivares BRS Esplendor e Rudá, sendo essa 60% e 224%, respectivamente, maior que a média do isolado referência CFBP 6165, grupo E, destacando-se dos demais isolados que compõem os grupos B, C, D e E, evidenciando que houve diferença na virulência desses isolados (Figura 5).

Embora o isolado M354 no teste de caracterização fenotípica tenha produzido o pigmento marrom em meio de cultura e tenha apresentado maior virulência em relação aos demais isolados, não houve relação entre a capacidade de produzir esse pigmento e a virulência, pois o isolado UFLA 02, também produtor do pigmento marrom, apresentou a menor média da AACPD, indicando ser pouco virulento.

Este resultado corrobora com outros trabalhos de virulência e diversidade fenotípica de isolados de Xpp em que os autores verificaram a não ocorrência da relação entre a produção de pigmentação em meio de cultura e a virulência dos isolados (MARIGONI, 1998; HALFELD-VIEIRA & SOUZA, 2000; MUTLU *et al.*, 2008, MONTEIRO, 2021).

Os isolados do grupo B (M 373; PROG 125 e RIL 18) apresentaram média da AACPD superior a 168% na cultivar Rudá quando comparados ao isolado referência CFBP 6165, grupo E. Entretanto, na cultivar BRS Esplendor os isolados do grupo B (M373 e RIL 18) apresentaram média da AACPD superior a 37,3% quando comparados ao isolado referência CFBP 6165.

Resultados semelhantes foram obtidos por Monteiro *et al.* (2021) e Paiva *et al.* (2018), ao avaliar perfis de virulência e diversidade de efetores tipo III em Xcf e Xpp, que constataram variação na virulência entre isolados e também na interação isolados x cultivar.

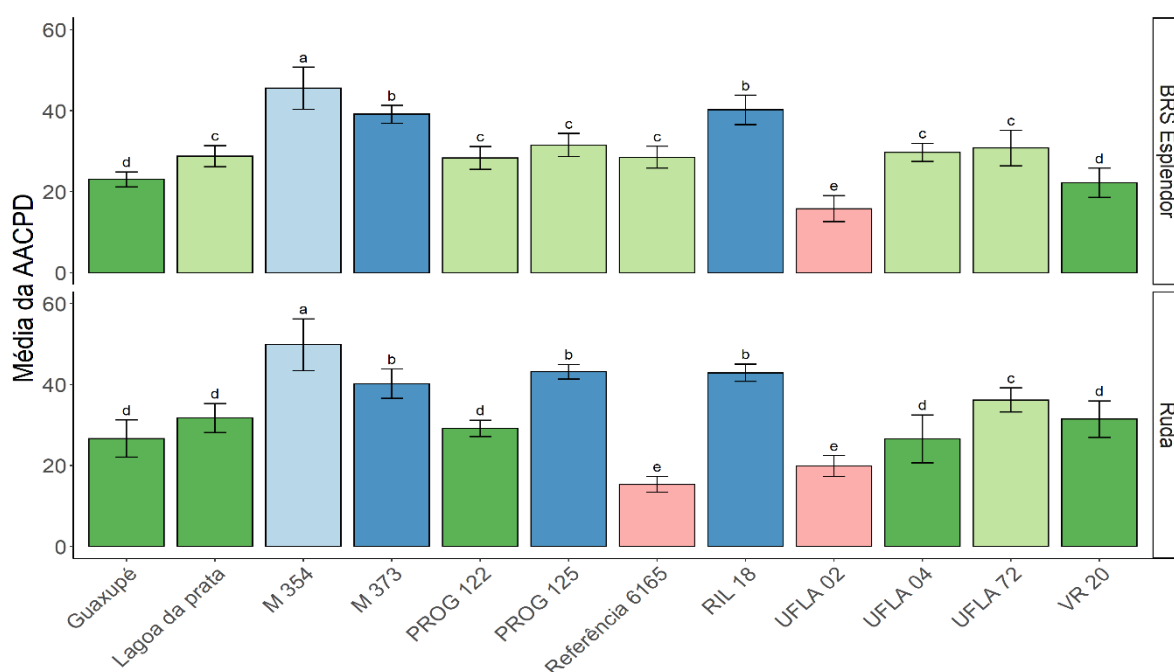
A expressão de um maior ou menor grau de virulência de um isolado dentro de uma cultivar possivelmente está associada à diversidade de efetores que a bactéria detém,

implicando em níveis de virulência variados (RUH *et al.*, 2017; MHEDBI-HAJRI *et al.*, 2011).

Aritua *et al.* (2015) verificaram que há um conjunto principal de 14 efetores que é codificado em todas as cepas sequenciadas de Xpp e Xcf, mas o efetor XopF2 é limitado apenas a Xcf e XopC2 a Xpp, evidenciando a existência de variação na virulência entre isolados possivelmente decorrente da diversidade de efetores em seu genoma.

Essas variações na virulência das cepas causadoras do CBC estão significativamente associadas aos repertórios de efetores presentes nessas bactérias e à convergência de cepas filogeneticamente distintas em uma espécie hospedeira comum pode ser parcialmente explicada por efetores compartilhados decorridos de grandes eventos de transferência horizontal de genes (RUH *et al.*, 2017). Tal fato é corroborado por Aritua *et al.* (2015) em estudos de sequenciamento do genoma e troca genética entre Xpp e Xcf, os quais identificaram mais de 100 genes que possivelmente foram adquiridos recentemente por Xpp de Xcf, implicando no surgimento de populações com níveis de virulência distintos.

**Figura 5.** Médias da AACPD dos isolados bacterianos inoculados nas cultivares de feijoeiro Rudá e BRS Esplendor, respectivamente suscetível e resistente a *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*, em casa de vegetação.

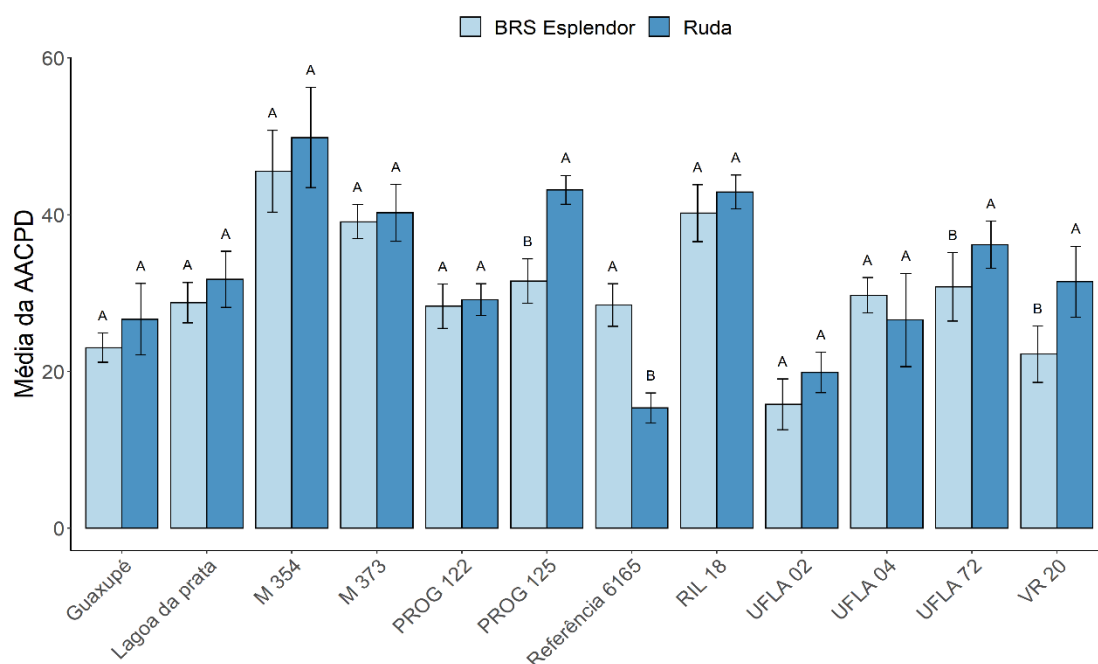


Dentro dos níveis dos fatores de cultivares (Rudá e BRS Esplendor) existe diferença significativa entre as médias da AACPD dos isolados em função dos níveis das cultivares apenas para os isolados PROG 125; Referência CFBP 6165; UFLA 72 e VR 20 (Figura 6).

Os isolados VR 20, PROG 125 e UFLA 72 apresentaram médias da AACPD maiores na cultivar Rudá quando comparado à cultivar BRS Esplendor. Os valores foram de 41,6 %, 37 % e 17,5 % respectivamente superiores quando comparados aos obtidos na cultivar BRS Esplendor. O isolado referência CFBP 6165 apresentou média da AACPD 85,71% superior na cultivar BRS esplendor quando comparado à cultivar Rudá.

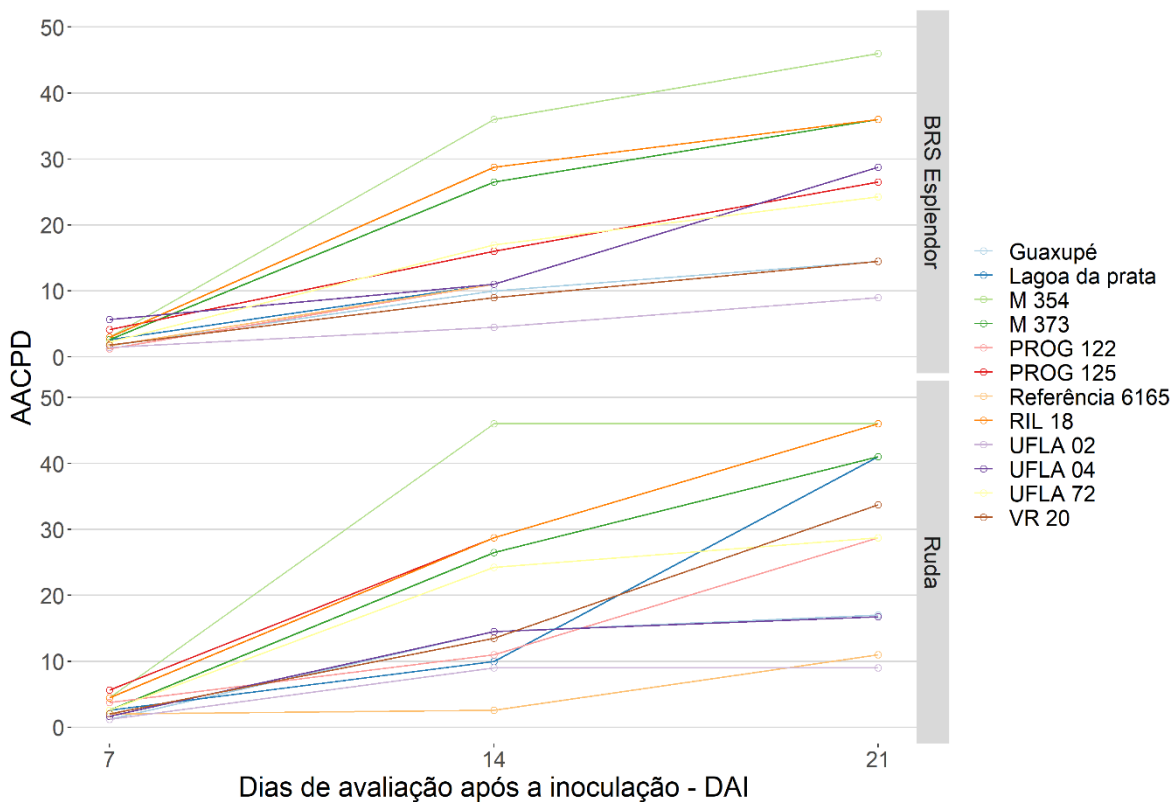
Esse resultado possivelmente pode ser decorrente de transferências horizontais de genes entre populações de Xcf e cepas de Xpp observados em trabalhos de transferência horizontal de genes realizados por (RUH *et al.*, 2017; MONTEIRO *et al.*, 2021).

**Figura 6.** Comportamento das cultivares de feijoeiro BRS Esplendor e Rudá, respectivamente resistente e suscetível, em resposta à inoculação de isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* em casa de vegetação.



O isolado M354 aos 14 dias após inoculação se sobressai dos demais isolados (Figura 7), no tocante a AACPD, expressando uma maior virulência em ambas as cultivares avaliadas, fato este possivelmente relacionado ao perfil de efetores relatados em trabalhos de sequenciamento genômicos (ARITUA *et al.*, 2015).

**Figura 7.** Área abaixo da curva de progresso da doença para isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* nas cultivares BRS esplendor e Rudá, respectivamente, resistente e suscetível em casa de vegetação.



Esse trabalho permitiu verificar a existência de variação na virulência entre isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*, o que pode ser de grande relevância em futuros ensaios de melhoramento visando a resistência, que possa ser empregado no manejo do CBC do feijoeiro.

## 6 CONCLUSÕES

Os primers X4c e X4e são eficientes na identificação de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*.

A produção de pigmento marrom em meio de cultura não é um marcador consistente para separar *X. phaseoli* pv. *phaseoli* de *X. citri* pv. *phaseoli*.

Há pelo menos três linhagens genéticas entre os isolados de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* estudados e dentro de cada linhagem diferentes níveis de virulência, destacando-se o isolado M 354 como o mais virulento em ambas as cultivares avaliadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI, S. M.; SANJARI, S.; DURAND, F.; BRIN, C.; MANCEAU, C., POUSSIER, S. Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. **Applied and Environmental Microbiology**. 74: 3295-3301, 2008.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. F. A. **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Viçosa -MG: Agronômica Ceres, 2016. 810 p.

ANDRADE, F. A; GONÇALVES, L. S; FUKUJI, A; MIGLIORANZA, E; TAKAHASHI, L. S. A; BALBI-PEÑA, M. I; RODRIGUES, R. Snap beans for organic farming and evaluation of resistance to the common bacterial blight. **Horticultura Brasileira**, 3: 385-389, 2017.

ARITUA, V.; HARRISON, J., SAPP, M.; BURUCHARA, R.; SMITH, J.; STUDHOLME, D. J. Genome sequencing reveals a new lineage associated with lablab bean and genetic exchange between *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. **Frontiers in Microbiology**, 6: 1-18, 2015.

AUDY, P.; LAROCHE, A.; SAINDON, G.; HUANG, H.; GILBERTSON, R. L. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. **Plant Pathology**, 84: 1185-1192, 1994.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN. J.D.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley and Sons, 1991. 1600 p.

BELETE T.; BASTAS K.K. Common Bacterial Blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) of Beans with Special Focus on Ethiopian Condition. **J Plant Pathol Microbiol**, 8: 1-11, 2017.

BERGAMIN FILHO, A; CARNEIRO, S. M. T. P. G; GODOY, C. V; AMORIM, L., BERGER, R. D; HAU, B. Angular leaf spot of Phaseolus beans: Relationships between disease, healthy leaf area, and yield. **Phytopathology**, 87: 506-515, 1997.

BIRCH, P. R.; HYMAN, L. J.; TAYLOR, R.; OPIO, A. F.; BRAGARD, C.; TOTH, I. K. RAPD PCR-based differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. **European Journal of Plant Pathology**, 103: 809-814, 1997.

BORÉM, A; CAIXETA, E. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: editora UFV, 2016. 385 p.

BREED, R. S.; MURRAY E.G.D.; SMITH, N. R. **Manual of Determinative Bacteriology**. S.L: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787 p.



CARNEIRO, J. E.; PAULA JÚNIOR, T; BORÉM, A. **Feijão do Plantio à Colheita**. Viçosa-MG: UFV, 2014. 384 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/MS/uploads/arquivos/>>. Acesso em: 17 fev. 2020.

CONSTANTIN, E. C.; CLEENWERCK, I.; MAES, M.; BAEYEN, S.; VAN MALDERGHEM, C.; VOS, P.; COTTYN, B. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, 65: 792-806, 2016.

CRUZ, C. D. Genes Software - extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**. 38: 547-552, 2016.

DÍAZ, C.G., BASSANEZI, R.B., GODOY, C.V., LOPES, D.B.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação do efeito do cretamento bacteriano comum na eficiência fotossintética e na produção do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira** 26:71-76. 2001.

EKPO E. J. A.; SAETTLER A. W. Pathogenic variation in *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. **Plant disease reporter**, 60: 80-83, 1976.

FOURIE, D.; HERSELMAN, L. Pathogenic and genetic variation in *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and its *fuscans* variant in Southern Africa. **African Crop Science Journal**, 19: 393-407, 2011.

FUKUJI, A. Y. S; CONSTANTINO, L. V; ZEFFA, D. M; ANDRADE, F. A; SILVA, M. B; GONÇALVES, L. S. A. Amino acid concentration, total phenolic compound content and antioxidant activity of snap bean genotypes. **Brazilian Journal Food Technology**, 22: 1-6, 2019.

GONTIJO NETO, G. F. **Uso de indutores de resistência na cultura do feijoeiro comum**. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fitotecnia, UFLA, Lavras-MG, 2015.

GOODWIN, P. H.; SOPHER, C. R. Brown pigmentation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* associated with homogentisic acid. **Canadian Journal of Microbiology**. 40: 28-34, 1994.

HALFELD-VIEIRA, B. A. ; SOUZA, R. M. . Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. **Ciência e Agrotecnologia**, 24: 94-102, 2000.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; SOUZA, R. M.; FIGUEIRA, A. R.; BOARI, A. J. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. **Fitopatologia Brasileira**, 26: 737-740, 2001.

- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Paleontological statistics software: Package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, 9: 1-9, 2001.
- JENSEN, M. A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction - amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Applied and environmental microbiology**, 59: 945-952, 1993.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. **Phytopathology**. 60: 969-976, 1970.
- KARAVINA, C.; MANDUMBU, R.; PARWADA, C.; TIBUGARI, H. A review of the occurrence, biology and management of common bacterial blight. **Journal of agricultural Technology**. 7:1459-1474, 2011.
- KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 44: 301-307, 1954.
- LOPEZ, M. M.; BERTOLINI, E; OLMOS, A; CARUSO, P; GORRIS, M. T; LLOP, P; PENYALVER, R; CAMBRA, M. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**, 6: 233-243, 1 dez. 2003.
- LÓPEZ, R; ASENSIO, C; GILBERTSON, R. L. Phenotypic and genetic diversity in strains of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) in a secondary center of diversity of the common bean host suggests multiple introduction events. **Phytopathology**, 96: 1204-1213, 2006.
- MAPA. 2021. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em <[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 01 de dez. de 2021.
- MARIANO, R L. R.; SOUZA, E. B. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. 3. ed. Recife - PE: UFRP, 2017. 234 p.
- MARINGONI, A. C. Virulência de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (smith) dye em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 33: 861-867, 1998.
- MHEDBI-HAJRI, N., DARRASSE, A.; PIGNÉ, S.; DURAND, K.; FOUTEAU, S.; BARBE, V.; MANCEAU, C.; LEMAIRE, C.; JACQUES, M. A. Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. **BMC Evolutionary Biology**. 11: 01-12, 2011.
- MONTEIRO, A.L.; PANTALEÃO, A.S.; BADEL, J.L.; SOARES, P. H. M. Genome-wide association study (GWAS) of *Phaseolus vulgaris* resistance to *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*. **Plant Pathology**, 00:1–12, 2021
- MUTLU, N.; VIDAVER, A. K.; COYNE, D. P.; STEADMAN, J. R.; LAMBRECHT, P. A.; REISER, J. Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and

*X. fuscans* subsp. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. **Plant Disease**, 92: 546-554, 2008.

PAIVA, B. A. R de. **Caracterização fenotípica e molecular de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. fuscans* subsp. *fuscans* procedentes de regiões produtoras de feijoeiro comum no Brasil**. 2014. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, UFG, Goiânia-Go, 2014.

PAIVA, B.A.R.; WENDLAND, A.; BORBA, TC.; ARAUJO, LG. Molecular Characterization and Differential Interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* with Common Beans (*Phaseolus vulgaris*). **Genetics And Molecular Research**, 17: 1-13, 2018.

RADEMAKER, J., LOUWS, F.; SCHULTZ, M., ROSSBACH, U., VAUTERIN, L.; BRUJIN, F. J. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**. 95:1098-111, 2005.

RAVA, C. A. Patogenicidade de isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 4: 445-448, 1984.

RAVA, C.A; ROMEIRO, R.S. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* quanto a patogenicidade em cultivares de *P. vulgaris*. **Summa phytopathology**, 16: 226-232, 1990.

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

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. 1. ed. UFV, 2001. 279 p.

RUH, M.; BRIAND, M.; BONNEAU, S.; JACQUES, M-A.; CHEN, N. W. G. *Xanthomonas* adaptation to common bean is associated with horizontal transfers of genes encoding TAL effectors. **Bmc Genomics**.18: 02-18, 2017.

SCHAAD, N. W., POSTNIKOVA, E., LACY G; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Syst App Microbiol** 29: 690-695, 2006.

SCHAAD, N. W; JONES, J. B; CHUN, W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. **Plant Pathology**, 50: 812-814, 2001.

SILVA, A.; SANTOS, I; BALBINOT, A. L; MATEI, G; OLIVEIRA, P. H. Reação de genótipos de feijão ao cretamento bacteriano comum, avaliado por dois métodos de inoculação. **Ciência e Agrotecnologia**, 33: 2019-2024, 2009.

SINGH, S. P.; MIKLAS, P. N. Breeding Common Bean for Resistance to Common Blight: A Review. **Crop Science**, 55: 971-984, 2015.

SOUZA, V.L.; MARINGONI, A.C.; KRAUSE-SAKATE, R. Genetic variability in *Curtobacterium flaccumfaciens* isolates. **Summa Phytopathologica**, 32: 170-176, 2006.

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**, 32:056-058, 2007.

TIQUIA, S.M. Metabolic diversity of the heterotrophic microorganisms and potential link to pollution of the Rouge River. **Environmental Pollution**, 158: 1435-1443, 2010.

TORRES, J. P.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; MARINGONI, A.C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do Estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathologica**, 35:136-139, 2009

VALE, J. C.; BERTINI, C; BORÉM, A. **Feijão-Caupi do Plantio à Colheita**. Viçosa - MG: UFV, 2017. 267 p.

VALENTINI, G.; GUIDOLIN, A. F.; BALDISSERA, G.; COIMBRA, J. L. M. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: etiologia, detecção e medidas de controle. **Biotemas**, 23: 1-8, 2010.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 45: 472-489, 1995.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and Cellular Biology**, 5: 25-40, 1994.

VIDAVER, A. K. Synthetic and Complex Media for the Rapid Detection of Fluorescence of Phytopathogenic Pseudomonads: Effect of the Carbon Source'. **Applied Microbiology**, 15: 1523-1524, 1967.

VOLPIANO, C. G. **Rhizobium spp. para o controle biológico do fungo fitopatogênico *Sclerotium (Athelia) rolfsii* no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2017. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, UFRS, Porto Alegre, 2017.

WALLEN, V.R.; GALWAY, D.A. Bacterial blight of field bean: disease progress, yield loss, and crop canopy development in principal cultivars in Ontario. **Canadian Plant Disease Survey**, 57: 61-64, 1977.

YOUNG, J.; DYE, D.; BRADBURY, J.; PANAGOPOULOS, C.; ROBBS, C. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**. 21: 153-77, 1978.

ZAPATA, M.; BEAVER, J.S.; PORCH, T.G. Dominant gene for common bean resistance to common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Euphytica**. 179: 373-382, 2011.