

Sensibilidade do método de obtenção das células bacterianas e da técnica de PCR para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão

Carolina Cardoso Deuner^{1*}, Ricardo Magela de Souza², Ana Beatriz Zacaroni², Antonia dos Reis Figueira², Juliane Nicolodi Camera¹

¹Universidade de Passo Fundo (UPF), Fitopatologia, Caixa Postal 611, 99052-900, Passo Fundo, RS; ²Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Fitopatologia, Caixa Postal 3037, 37200-000, Lavras, MG. * Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Lavras (2007).

Autor para correspondência: Carolina Cardoso Deuner (carolinadeuner@upf.br)

Data de chegada: 22/10/2010. Aceito para publicação em: 02/01/2012.

1711

RESUMO

Deuner, C.C., Magela, R.S., Zacaroni, A.B., Figueira, A.R. Camera, J.N. Sensibilidade do método de obtenção das células bacterianas e da técnica de PCR para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão *Summa Phytopathologica*, v.38, n.1, p.48-53, 2012.

Atualmente, existe a necessidade de se desenvolver métodos sensíveis, baratos, reproduzíveis e rápidos para a detecção de fitobactérias em sementes. O objetivo deste trabalho foi otimizar um método de obtenção das células bacterianas e a técnica de PCR para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*), em sementes de feijão. Foi utilizado o primer *Cff*FOR2-REV4, desenhado a partir do fragmento amplificado via PCR baseado na seqüência repetitiva (Rep-PCR). Avaliaram-se também quatro métodos de preparação dos extratos de sementes de feijão para a obtenção células de *Cff*: 1) extrato bruto de sementes; 2) extrato concentrado por filtração em membrana milipore (0,22 μ m de diâmetro) e ressuspensão em água; 3) extrato concentrado por centrifugação a 10.000 xg por 15 minutos no volume de 20 ou de 80 mL e 4) Bio-PCR. Dentre esses métodos,

tanto a Bio-PCR quanto a concentração do extrato por centrifugação, seja no volume de 20 ou de 80 mL, possibilitaram amplificar o segmento de DNA de 306 pb, característico de *Cff*. Essas duas técnicas, além de detectar a bactéria, apresentam alta sensibilidade, detectando até 1 semente inoculada artificialmente com *Cff* em 999 sementes sadias. Analisaram-se dezessete lotes comerciais de sementes de feijão pelo método de concentração de extrato por centrifugação, sendo que em doze detectou-se a bactéria *Cff*, observado pela presença de bandas com 306 pb. Portanto, foi possível otimizar um método de obtenção das células bacterianas e técnica de PCR para detecção de *Cff* em sementes de feijão, que seja sensível, reproduzível e de fácil execução, que poderá ser utilizado rotineiramente em laboratórios de análises de sementes.

Palavras-chave adicionais: Detecção de bactéria, inoculação artificial, restrição hídrica.

ABSTRACT

Deuner, C.C., Magela, R.S., Zacaroni, A.B., Figueira, A.R. Camera, J.N. Sensitivity of the method of obtaining bacterial cells and PCR for detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. *Summa Phytopathologica*, v.38, n.1, p.48-53, 2012.

Currently, there is a need to develop sensitive methods, inexpensive, reproducible and rapid detection of phyto-bacteria seeds. The objective of this study was to optimize a method for obtaining bacterial cells and the PCR technique to detect *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*), in bean seeds using PCR. It was used one pairs of primers *Cff*FOR2-REV4, designed from an PCR amplified fragment of the conserved repetitive sequence (Rep-PCR). The primer pair *Cff*FOR2-REV4 was selected in this study, because demonstrated higher reproducibility and efficacy in the detection of *Cff* strains in bean seeds. Four methods were also evaluated in the seed extract preparation for PCR: 1) rough seed extract; 2) millipore membrane filter (0.22 μ m diameter) concentrated seed extract and subsequently resuspended in water; 3) centrifuge concentrated seed

extract 10.000 xg for 15 minutes for 20 and 80 mL; 4) Bio-PCR. Among those methods, either Bio-PCR or centrifuge concentrated extract, in a total 20 or 80 mL suspension volume, produced a 306bp DNA fragment, diagnostic for *Cff*. Those two techniques detected the bacterium and presented high sensitivity, detecting up to 1 *Cff* physiological conditioning artificially contaminated seed in a total 999 healthy ones. A total of seventeen commercial bean seed lots were analyzed by the method of concentration of the extract by centrifugation, and twelve detected in the bacterium *Cff*, observed by the presence of bands with 306 bp. Therefore, it was possible to optimize a method of obtaining the bacterial cells and PCR for detection of *Cff* in bean seeds, that is sensitive, reproducible and easy to perform, which can be used routinely in laboratories for seed.

Keywords: Detection of bacteria inoculation, water restriction.

As sementes constituem um meio ideal de sobrevivência e disseminação de fitobactérias, podendo estas permanecer viáveis em seu interior por vários anos (12). Além disso, podem ser disseminadas, de forma eficiente, a longas distâncias e ser introduzidas em áreas

onde a enfermidade não existe ou ainda servir como fonte de inóculo inicial para o progresso de epidemias no campo (6).

Atualmente, há a necessidade de se desenvolver métodos sensíveis, baratos, reproduzíveis e rápidos para a detecção de fitobactérias em

sementes. Para *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones, existem poucos métodos descritos na literatura. Os mais adotados atualmente são: exame visual, isolamento direto, testes de aglutinação e imunofluorescência, avaliação da patogenicidade em plantas hospedeiras (13), plaqueamento de sementes em meio seletivo (2) e inoculação de plantas de feijoeiro com o líquido de maceração de sementes (3). Esses métodos, embora ainda em uso, apresentam vários inconvenientes como, baixa sensibilidade e consumo excessivo de tempo e espaço físico, podendo ainda ocorrer resultados falsos-positivos.

Avanços recentes na biologia molecular permitem o desenvolvimento de métodos para a detecção de patógenos em plantas e sementes com o objetivo de serem usados como rotina em laboratórios de diagnose. Esses métodos têm a característica de serem rápidos, sensíveis e específicos, permitindo economia de tempo e dinheiro nas identificações. Alguns pesquisadores têm utilizado a técnica de amplificação enzimática, direcionada por primers de DNA, ou reação da polimerase em cadeia (PCR), para a detecção e diagnóstico de algumas fitobactérias.

Atualmente existem dois pares de primers para a detecção de *Cff*: um desenvolvido por Guimarães et al. (4) (CF4-CF5), a partir de biblioteca cromossomal, construído em plasmídeo, e outro desenhado por Tegli et al. (13) a partir do fragmento amplificado via PCR baseado na sequência repetitiva (Rep-PCR).

O objetivo deste trabalho foi otimizar um método de obtenção das células bacterianas e da técnica de PCR para detecção de *Cff* em sementes de feijão.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Foram utilizados neste estudo sete isolados brasileiros de *Cff*, provenientes dos estados de Goiás, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Minas Gerais, e do Distrito Federal (Tabela 1). Os isolados foram preservados em peptona glicerol a -80°C (5).

Primers e reação de amplificação

Suspensões de cada um dos sete isolados foram testadas com os dois pares de primers descritos na literatura para a detecção de *Cff*.

As reações de amplificação do DNA para os dois primers CF4-CF5 (4) e *Cff*FOR2-REV4 (13), foram realizadas em volume de 50 mL, sendo 5 mL do DNA da amostra, 5 mL do Tampão PCR 1X, 3 mL de MgCl₂ (3 mM), 2 mL de dNTPs (200 µM), 2 mL de cada primer (0,4 mM) e 1 mL de Taq polimerase (5 U/µL), completando-se o volume com água ultra-pura.

Detecção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão inoculadas artificialmente e sensibilidade das técnicas de obtenção das células bacterianas

As sementes de feijão cultivar Pérola foram inoculadas artificialmente com o isolado de *Cff* proveniente do estado de Santa Catarina (*Cff* SC), por meio da técnica de condicionamento utilizando-se o restritor manitol no potencial hídrico de -0,95 MPa, no tempo de 48 horas de exposição.

Foram utilizados diferentes métodos de obtenção de células bacterianas para posterior amplificação pela técnica de PCR. Foram analisadas 40 amostras compostas por 1.000 sementes, sendo 10 amostras para cada método testado.

Para testar a sensibilidade das técnicas de obtenção das células bacterianas utilizou-se 1 semente inoculada artificialmente com *Cff* para 999 sadias (1:1000) e 2 sementes inoculadas artificialmente com *Cff* para 998 sadias (2:1000).

Extrato bruto de sementes

Para a obtenção dos extratos brutos, dez amostras, cada uma com 1.000 sementes de feijão foram imersas em 500 mL de água destilada esterilizada, por aproximadamente, 18 horas, à temperatura de 4°C. Após esse procedimento, 5 µL dos extratos obtidos foram utilizados diretamente para amplificação por PCR.

Extrato concentrado em membrana milipore

Dos extratos brutos de sementes, retiraram-se 20 mL, os quais foram filtrados em membrana Millipore com 0,22 µm de diâmetro de poro. Em seguida, essas membranas foram lavadas com 3 mL de água ultrapura, visando recuperar as células bacterianas. Após esse procedimento, 5 µL da suspensão obtida da lavagem das membranas foram utilizados diretamente na reação de PCR.

Extrato concentrado por centrifugação

Para a obtenção dos extratos concentrados por centrifugação, foram utilizados dois volumes diferentes dos extratos brutos, 20 mL e 80 mL, os quais foram centrifugados, 10.000 xg por 15 minutos. Decorrido esse tempo, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentados ressuspendidos em 3 mL de água ultrapura, sendo 5 µL utilizados diretamente na reação de PCR.

Bio-PCR

Aliquotas de 500 mL dos extratos brutos foram retiradas e, a partir desse volume, procedeu-se a diluição em série. Posteriormente, 100 mL das diluições 10⁻¹ e 10⁻² foram plaqueados no meio seletivo CNS (11). As placas foram incubadas a 28°C, por 48-72 horas. Após o crescimento das colônias típicas, adicionaram-se às placas de Petri 3

Tabela 1. Origem dos isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Isolado	Origem	Doador	Ano	Código
Unb-1252	Goiás	C.F. Uesugui (UNB)	2005	<i>Cff</i> GO
Feij-2936	Distrito Federal	A.C. Maringoni (Unesp)	2005	<i>Cff</i> DF
<i>Cff</i> 001	Minas Gerais	C.C.Deuner (UFLA)	2005	<i>Cff</i> MGP
<i>Cff</i> 002	Minas Gerais	C.C.Deuner (UFLA)	2005	<i>Cff</i> MGU
12768	Paraná	R.P. Leite Jr. (IAPAR)	2000	<i>Cff</i> PR
Feij-2928	Santa Catarina	A.C. Maringoni (Unesp)	2005	<i>Cff</i> SC
Feij-2634	São Paulo	A.C. Maringoni (Unesp)	2005	<i>Cff</i> SP

mL de água ultrapura, obtendo-se as suspensões bacterianas. Após esse procedimento, 5 µL das suspensões bacterianas foram utilizados diretamente para amplificação por PCR.

Deteção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em lotes comerciais de sementes de feijão

Foram utilizados, neste trabalho, lotes comerciais de sementes de feijão, provenientes de Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina e Distrito Federal (Tabela 2). Para a deteção de *Cff* em lotes comerciais, foi utilizado o método de obtenção de células bacterianas por concentração do extrato por centrifugação com volume de 80 mL.

Tabela2 Origem dos lotes comerciais de feijão. UFLA, Lavras, MG, 2007.

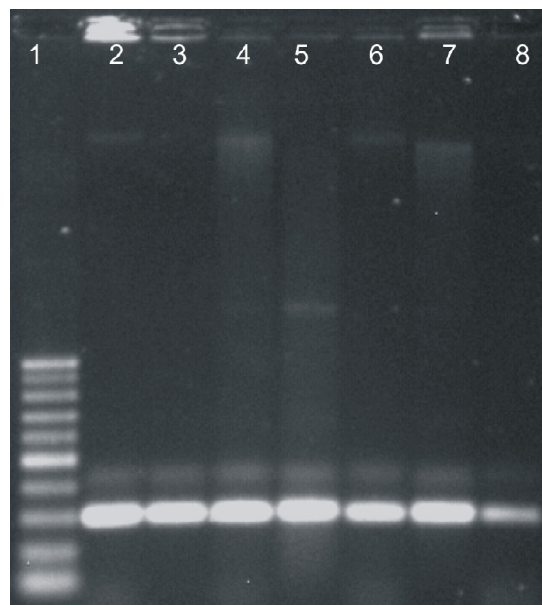
Lote	Origem	Doador
Lote 1	Minas Gerais	Comércio
Lote 2	Santa Catarina	C.L.B. Montemor
Lote 3	Minas Gerais	N.D. Tebaldi (UFLA)
Lote 4	Santa Catarina	C.L.B. Montemor
Lote 5	Minas Gerais	Eustáquio (produtor)
Lote 6	Goiás	M. Lobo Júnior
Lote 7	Goiás	M. Lobo Júnior
Lote 8	Distrito Federal	C. Uesugi
Lote 9	Minas Gerais	Comércio
Lote 10	Minas Gerais	J.C. Machado (UFLA)
Lote 11	Minas Gerais	J.C. Machado (UFLA)
Lote 12	Minas Gerais	Takao (produtor)
Lote 13	Minas Gerais	N.D. Tebaldi (UFLA)
Lote 15	Minas Gerais	Comércio
Lote 14	Minas Gerais	Comércio
Lote 16	Minas Gerais	N.D. Tebaldi (UFLA)
Lote 17	Minas Gerais	N.D. Tebaldi (UFLA)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Otimização da técnica de PCR

Para deteção dos diferentes isolados de *Cff* utilizando-se o par de *primer* *Cff*FOR2-REV4 desenhado por Tegli et al. (13), observou-se maior repetibilidade na amplificação da bandas de 306 pb. Além disso, verificou-se a presença de bandas mais visíveis nos sete isolados de *Cff* testados (Figura 1), quando comparado com o *primer* desenhado por Guimarães et al. (4) (CF₄-CF₅). Este último, em alguns casos, não detectou o isolado proveniente do estado de São Paulo (Feij-2634), comprometendo, assim, a repetibilidade do estudo. Esses dados corroboram com os observados por Souza et al. (10), no qual o par de *primer* de Tegli et al. (13), mostrou-se altamente específico na deteção de todos os isolados de *Cff* de feijoeiro, não detectando os isolados endofíticos de citros, confirmando que esses são os *primers* mais indicados para a deteção de isolados fitopatogênicos de *Cff*.

Porém, para obter repetibilidade com os *primers* *Cff*FOR2 e *Cff*REV4, houve necessidade de reduzir a temperatura de desnaturação do DNA para 94°C, pois a temperatura de 96°C, utilizada pelos autores, não permitiu a repetibilidade dos resultados. Essas adaptações foram necessárias, pois as condições de reação e os isolados utilizados nos dois trabalhos são distintos.



306 pb →

FIGURA 1. Análise eletroforética em gel de agarose (1%) de 5mL dos produtos amplificados por PCR para a confirmação da identidade dos isolados *Cff* utilizando-se os *primers* descritos por Tegli et al. (13). Legenda: **1** marcador de DNA (Jena Bioscience); **2** *Cff* SP - Feij-2634; **3** *Cff* SC - Feij-2928; **4** *Cff* DF - Feij-2936; **5** *Cff* PR - 12768; **6** *Cff* GO - Unb-1252; **7** *Cff* MGP - *Cff* 001; **8** *Cff* MGU - *Cff* 002. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Deteção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão inoculadas artificialmente e sensibilidade das técnicas de obtenção de células bacterianas

A utilização do extrato bruto de sementes na PCR não permitiu detectar a presença da bactéria *Cff*, independente do número de sementes inoculadas artificialmente (Figura 2). Provavelmente, a presença de inibidores da PCR nesse extrato impediu o resultado positivo. Fato semelhante foi observado por Schaad et al. (9), ao tentarem detectar a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) diretamente do extrato de sementes. Entretanto, essa inibição pode ser superada e ter a sensibilidade aumentada por meio do cultivo da bactéria em meio de cultura antes da PCR. Esta técnica foi descrita por Schaad et al. (8) e tem como terminologia a sigla BIO-PCR. No presente trabalho, a BIO-PCR permitiu a amplificação do segmento de DNA de 306 pb de até uma semente inoculada artificialmente com *Cff* em 999 sadias. Segundo Audy et al. (1), a utilização de kits específicos para a purificação dos extratos de sementes e posterior deteção pela PCR é possível, entretanto, trata-se de uma técnica onerosa e que requer mais tempo.

Com relação à concentração por filtração em membrana milipore, acredita-se que as células ficaram presas na membrana, apresentando, assim, resultados negativos. Porém, novos estudos serão feitos visando superar esse problema, como, por exemplo, proceder a agitação da membrana em tampão após as filtrações, permitindo a liberação das células bacterianas.

A concentração do extrato por centrifugação, no volume de 80 mL, permitiu a amplificação do segmento de DNA de 306 pb, indicando que essa técnica, bem como a BIO-PCR, além de detectar a bactéria, apresenta alta sensibilidade, permitindo a deteção até de 1 semente inoculada artificialmente com *Cff* em 999 sementes sadias. Já a concentração do extrato por centrifugação, no volume de 20 mL, mostrou ser menos sensível por detectar somente 2 sementes inoculadas artificialmente com *Cff* em 998 sementes sadias. Esses resultados

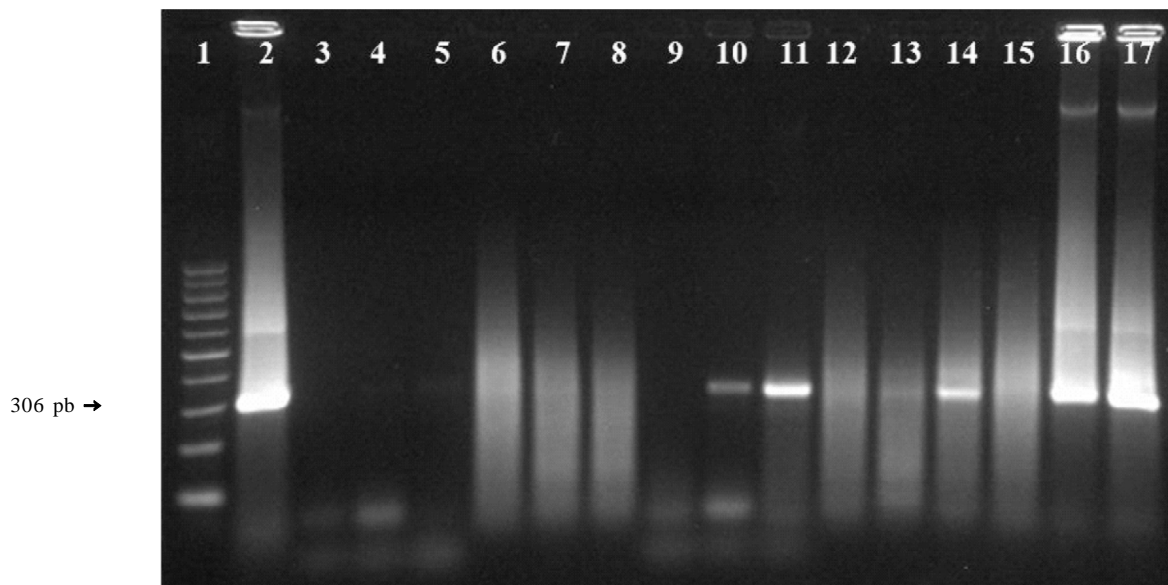


Figura 2. Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%) de 5µL dos produtos amplificados pelos diferentes métodos de obtenção de *Cff*; **1** marcador de DNA (Jena Bioscience); **2** *Cff* SC - Feij-2928; **3** Test¹ eb; **4** (1:1000)² eb; **5** (2:1000)³ eb; **6** Test ef; **7** (1:1000) ef; **8** (2:1000) ef; **9** Test C80; **10** (1:1000) C80; **11** (2:1000) C80; **12** Test C20; **13** (1:1000) C20; **14** (2:1000) C20; **15** Test BioPCR; **16** (1:1000) BioPCR; **17** (2:1000) BioPCR. ¹Test=1000 sementes sadias; ²(1:1000)=1 semente inoculada artificialmente em 999 sadias; ³(2:1000)=2 sementes inoculadas artificialmente em 998 sementes sadias, eb=extrato bruto, ef=extrato filtrado em milipore, C80=80 mL de extrato centrifugado, C20=20 mL de extrato centrifugado. UFLA, Lavras, MG, 2007.

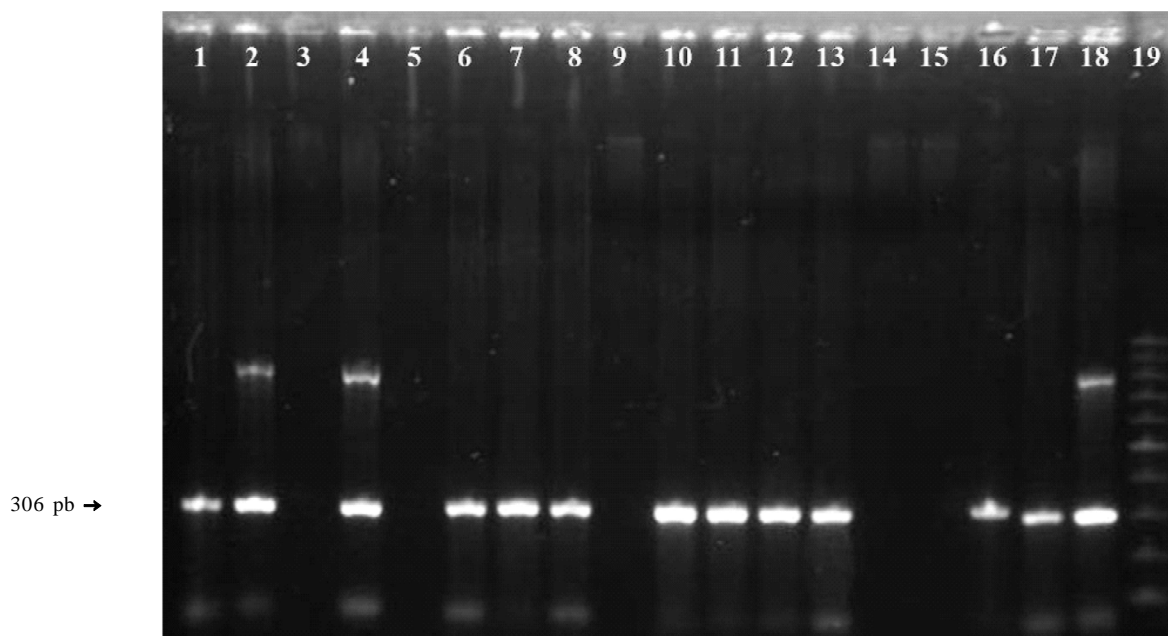


Figura 3. Análise eletroforética em gel de agarose (0,7%) de 5µL dos produtos amplificados pelo método de concentração de extrato com volume de 80 mL; **1** Lote 1, **2** Lote 2, **3** Lote 3, **4** Lote 4, **5** Lote 5, **6** Lote 6, **7** Lote 7, **8** Lote 8, **9** Lote 9, **10** Lote 10, **11** Lote 11, **12** Lote 12, **13** Lote 13, **14** lote 14, **15** Lote 15, **16** Lote 16, **17** Lote 17, **18** *Cff* SC - Feij-2928, **19** marcador de DNA (Jena Bioscience); UFLA, Lavras, MG, 2007.

corroboram com os de Prosen et al. (7) que relataram a detecção da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, Dye & Wilkie em extratos de sementes de feijão contendo uma semente inoculada artificialmente em 2.000 consideradas sadias. Essa detecção foi realizada por meio da técnica de PCR, a partir de colônias crescidas em meio de cultura semi-seletivo, ou seja, BIO-PCR.

Para a detecção de *Xanthomonas albilineans* (Ashby), agente causal

da escaldadura da folha da cana-de-açúcar, foram comparadas a eficiência e a segurança da PCR, BIO-PCR, ELISA e o isolamento clássico. As suspensões de *X. albilineans* foram preparadas a partir de extratos de toletes e de folha de cana-de-açúcar. A PCR clássica e a BIO-PCR apresentaram como vantagem a não necessidade dos testes de patogenicidade para se confirmar a identidade das colônias. O meio semi-seletivo foi tão sensível quanto a BIO-PCR, entretanto, sete

dias foram necessários para a obtenção dos resultados, além da necessidade de se confirmar a identidade das colônias (14).

Neste estudo, quando se analisa a detecção de *Cff*, observa-se que a BIO-PCR foi tão eficiente e sensível quanto o método de concentração do extrato por centrifugação com volume de 80 mL. Entretanto, sete dias foram necessários para a obtenção dos mesmos resultados. A BIO-PCR é uma técnica sensível e fácil de ser executada em exames de rotina, detecta apenas células viáveis, devido ao fato de que células fisiologicamente enfraquecidas, injuriadas e mortas não podem se multiplicar no meio de cultura (8, 9, 13, 14). Porém, requer, na confecção do meio de cultura, reagentes e antibióticos importados e de custos elevados, tornando seu custo elevado. Segundo Schaad et al. (8), a principal vantagem da técnica de BIO-PCR sobre a PCR clássica é a eliminação de inibidores presentes em extratos de sementes, além de aumentar a sensibilidade da detecção em lotes de sementes com baixos níveis de bactérias.

O enriquecimento de células viáveis de bactérias em meio líquido ou sólido permite a detecção do patógeno, mesmo quando presente em baixas populações nas sementes ou outros materiais de propagação (8). Para o preparo de uma amostra, o extrato da planta é depositado no meio líquido ou sólido, incubado de 15 a 72 horas, dependendo do organismo, e as colônias resultantes usadas diretamente na PCR. Não é necessária a extração do DNA das bactérias, uma vez que a lise das células ocorrerá naturalmente durante a desnaturação inicial da amplificação (8).

No presente trabalho, a concentração do extrato de sementes por centrifugação e posterior ressuspensão em tampão, minimizaram os efeitos dos inibidores da PCR, surgindo, portanto, como uma técnica viável e promissora na detecção da bactéria em lotes de sementes.

Apesar das vantagens da BIO-PCR, este trabalho mostra que a técnica de concentração do extrato por centrifugação com volume de 80 mL é mais vantajosa por não requerer reagentes caros para o meio de cultura e por demandar menos tempo para a obtenção dos mesmos resultados. Portanto, quando o tempo é mais importante do que a sensibilidade da técnica, BIO-PCR não é recomendado (8). Sendo assim, fica evidente que as técnicas de detecção de bactérias em sementes devem se adequar ao objetivo do estudo, considerando sempre, sensibilidade, eficiência, rapidez e custo.

Com relação à sensibilidade das técnicas de obtenção de células bacterianas, alguns métodos de obtenção das células bacterianas foram eficientes, sendo confirmado pela amplificação de DNA da bactéria com 306 pb pela técnica de PCR (Figura 2). Para as técnicas de extrato bruto de sementes e extrato concentrado em membrana milipore, não foi possível detectar a presença da bactéria *Cff*, independente da quantidade de sementes inoculada artificialmente. Prosen et al. (7) relataram a detecção de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, Dye & Wilkie em extratos de sementes de feijão contendo 1 semente inoculada artificialmente em 2.000 consideradas sadias. A partir da extração do DNA de seis lotes testados, dois lotes não apresentaram amplificações, sendo possível que a semente infectada adicionada a esses lotes apresentou baixa população do patógeno. Estes mesmos autores relataram que o limite de detecção para esses extratos foi de 10-20 u.f.c./mL e que a possibilidade de epífitas presentes até concentrações $\geq 10^4$ u.f.c./mL não interferiu na detecção, mesmo quando o patógeno estava presente em concentrações ≤ 30 u.f.c./mL.

Porém, para a técnica de extrato concentrado por centrifugação no volume de 20 mL foi possível detectar a presença da bactéria somente na proporção de 2 sementes inoculadas artificialmente em 998 sadias. Para o volume de 80 mL detectou-se a bactérias tanto na proporção 1

semente inoculada artificialmente para 999 sadias quanto para 2 sementes inoculadas artificialmente para 998 sadias. A Bio-PCR teve o mesmo comportamento do extrato concentrado por centrifugação no volume de 80 mL.

Detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em lotes comerciais de sementes de feijão

Foram testados 17 lotes comerciais de sementes de feijão, provenientes Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina e Distrito Federal. Desses, 12 lotes apresentaram a presença da bactéria, sendo confirmada pela presença de bandas com 306 pb.

Portanto, as técnicas moleculares surgem como ferramentas importantes para a detecção da bactéria *Cff*, principalmente quanto se têm disponíveis *primers* específicos que detectam eficientemente o patógeno alvo, sem detectar os patógenos geneticamente próximos. Isso é o que se observa quando se utilizam os *primers* desenvolvidos por Tegli et al. (13).

Portanto, neste trabalho foi possível otimizar um método de obtenção de células bacterianas para detecção de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão tanto pela concentração de extrato por centrifugação com volume de 80 mL quanto pela BIO-PCR, para posterior detecção pela técnica de PCR utilizando-se *primers* desenvolvidos por Tegli et al. (13).

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido para a realização do curso.

À Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do Projeto (CAG-1603/06).

E aos pesquisadores que disponibilizaram os isolados de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e também os lotes de sementes de feijão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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, p.361-366, 1996.
2. Behlau, F.; Leite, R.P. Estabelecimento de metodologia para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.28, p.301, 2003.
3. European and Mediterranean Plant Pathology Organization. **Phytosanitary procedure: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens***, Paris, 1994. p.329-331. (Bulletin 24).
4. Guimarães, P.M.; Palmano, S.; Smith, J.J.; Sá, M.F.G.; Saddler, G.S. Development of a PCR test for detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Holanda, v.80, p.1-10, 2001.
5. Lazo, G.R.; Gabriel, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, p.448-453, 1987.
6. Neergaard, P. **Seed Pathology**. 5.ed. London: Mac Milan, 1979. 839p.
7. Prosen, D.; Hatziloukas, E.; Schaad, N.W.; Panopoulos, N.J. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of phaseolotoxin gene region. **Phytopathology**, Saint Paul, v.83,

- p.965-970, 1993.
8. 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, p.243-248, 1995.
 9. 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: Progress Towards the 21st Century**. Cambridge: Cab International, 1997. p.159-164.
 10. Souza, V.L.; Maringoni, A.C.; Krause-Sakate, R. Detecção via PCR de isolados de *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*. **Summa Phythopatologica**, Botucatu, v.30, p.89, 2004.
 11. Schaad, N.W.; Jones, J. B.; Chun, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathology Society, 2001. 373p.
 12. Schuster, M.L.; Sayre, R.M. A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and others leguminosae. **Phytopathology**, Saint Paul, v.57, p.1064-1066, 1967.
 13. Tegli, S.; Sereni, A.; Surico, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens* in bean seeds. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.35, p.331-337, 2002.
 14. Wang, Z.K.; Comstock, J.C.; Hatziloukas, E.; Schaad, N.W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the agent of leaf scald sugarcane. **Plant Pathology**, Saint Paul, v.48, p.245-252, 1999.