

IDENTIFICAÇÃO de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR*

BERNARDO A. HALFELD-VIEIRA**, RICARDO M. SOUZA, ANTÔNIA R. FIGUEIRA & ALESSANDRA DE JESUS BOARI

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 37, CEP 37200-000, Lavras, MG, e-mail: halfeld@alunos.ufv.br

(Aceito para publicação em 03/09/2001)

Autor para correspondência: Ricardo Magela de Souza

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.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo verificar a viabilidade de utilização da técnica de PCR, usando primers considerados específicos, para identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), visando criar bases para sua utilização em diagnose rotineira e em programas de certificação de sementes. Foram incluídos no estudo 42 isolados da bactéria provenientes de locais distintos, além de outros gêneros, espécies e patovares, para ser verificada a especificidade dos primers. Os

resultados obtidos permitem concluir que os primers utilizados são adequados para identificação de Xap e Xapf, embora dois isolados patogênicos não tenham sido amplificados. Foi observada também a amplificação de uma banda fraca para *X. axonopodis* pv. *vitians*, com o mesmo número de pares de bases, o que sugere existir homologia entre estes patovares, na região amplificada.

Palavras-chave adicionais: *Phaseolus vulgaris*, crestamento bacteriano do feijoeiro, caracterização molecular.

ABSTRACT

Identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* through the PCR technique

The objective of this study was to determine the availability of PCR technique as a tool for *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf) identification. The specificity of the primers was tested based on the DNA amplification of 42 isolates of

bacteria collected at several locations. The primers were capable of identifying Xap and Xapf, although two virulent isolates were not detected. The amplification of a weak band, which was observed for *X. axonopodis* pv. *vitians*, suggests homology between these pathovars, in the same region.

INTRODUÇÃO

O crestamento bacteriano é uma das principais doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil (Mohan & Mohan, 1983), podendo ser causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith, 1897) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 (Xap) ou pela sua variante *fuscans* (Xapf). Estes patógenos são diferenciáveis somente em laboratório devido à capacidade da variante, de produzir melanina *in vitro* (Burkholder & Bullard, 1946). Um dos principais problemas fitossanitários é que as sementes infetadas constituem uma importante forma de disseminação do patógeno (Weller & Saettler, 1980; Zapata *et al.*, 1985;

Balardin, 1992), sendo facilmente transportadas pelo homem, além de aumentar o inóculo inicial a cada ciclo da cultura, o que torna o uso de sementes certificadas de extrema importância como medida de controle.

Apesar de existirem métodos de diagnose baseados no uso de meios semi-seletivos (Velásquez & Trujillo, 1984a, b) e dupla difusão em gel de agar (Maringoni *et al.* 1994), existe uma grande dificuldade em suas aplicações, devido ao tempo de execução que demandam, além de serem variáveis quanto a sensibilidade, especificidade e complexidade (Valarini & Menten, 1992).

Neste contexto, técnicas moleculares em procedimentos rotineiros de detecção de patógenos vêm sendo cada vez mais estudadas como ferramentas promissoras devido à sua maior precisão em caracterizar organismos, apresentar resultados mais rápidos no processo de identificação (Louws *et al.* 1994), além de não serem influenciadas pelo ambiente,

* Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal de Lavras

** Bolsista do CNPq

como na produção de proteínas, carboidratos e lipídeos (Gilbertson *et al.*, 1989).

Com o objetivo de verificar a eficiência da técnica de PCR na identificação de isolados de Xap e Xapf, provenientes de diferentes regiões produtoras de feijão do Brasil, foram utilizados dois primers considerados específicos para este patógeno (Audy *et al.*, 1994; Audy *et al.*, 1996), visando sua posterior adequação a um sistema de rotina de diagnose.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação dos isolados

Colônias de 42 isolados de Xap e Xapf, e outros patovares e espécies de fitobactérias, foram cultivadas por 24 h a 28 °C, em meio 523 de Kado & Heskett (Kado & Heskett, 1970). Estas culturas foram repicadas para 5,0 ml do mesmo meio líquido, em tubos de ensaio e incubadas pelo mesmo período, à mesma temperatura, em incubadora do tipo B.O.D.

As culturas foram utilizadas diretamente na PCR sem passar pelo processo de extração de DNA. Testes preliminares mostraram que a supressão desta etapa não afeta a eficiência da reação. O protocolo utilizado para extração de DNA foi o descrito por Wang *et al.* (1993).

PCR com primers específicos

As amplificações foram conduzidas em volume total de 50 µl, consistindo de 5 µl de tampão de PCR 10x; 3 µl de MgCl₂ 25 mM; 1 µl de dNTP mix 10 mM; 1 µl de cada primer (X4c (GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG) 62,89 nmoles/ml e X4e (CGC CGG AAG CAC GAT CCT CGA AG) 66,59 nmoles/ml); 0,5 µl de *Taq* DNA polimerase 5 u/µl; 5 µl da cultura em meio 523 de Kado & Heskett (Kado & Heskett, 1970) líquido e 33,5 µl de água Milli-Q. O controle negativo conteve, ao invés da cultura bacteriana, água Milli-Q. Estas misturas foram submetidas a 25 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (94 °C/1 min, 55 °C/2 min, 72 °C/2 min, respectivamente e uma extensão final a 72 °C/10 min, em termociclador (MJ research, modelo PTC-100). Para confirmar os resultados obtidos para dois dos isolados, foi reduzida somente a temperatura de anelamento, para 50 e 45 °C (adaptado de Audy *et al.*, 1994).

Eletroforese e fotodocumentação

Os produtos da amplificação foram detectados por eletroforese de 5 µl de cada amostra, acrescida de 2 µl do corante azul de bromofenol, em gel de agarose 0,8%, preparado com tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5 x. O marcador utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados foi de 1 kb (GIBCO) e o gel foi submetido a coloração com brometo de etídio 0,5 mg/l por 10 min, para a visualização das bandas e fotodocumentação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O par de primers utilizado apresentou-se eficiente na identificação de Xap e Xapf (Figura 1), após a adaptação do

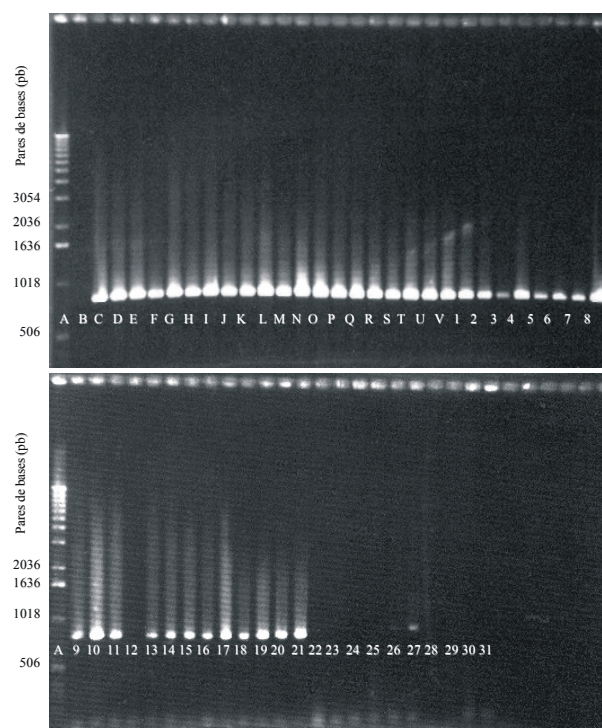


FIG. 1 - Fragmentos de DNA amplificados por PCR, utilizando-se os primers X4c e X4e, e a temperatura de anelamento de 55 °C. A= Marcador de 1 kb (GIBCO); B= isolado Xap 1; 12= isolado Xapf 6; B a V= *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*; 1 a 21= *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*; 22= *X. campestris* pv. *campestris*; 23= *X. campestris* pv. *passiflorae*; 24 a 26= *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*; 27= *X. axonopodis* pv. *vitians*; 28= *Pseudomonas cichorii*; 29= *Erwinia* sp.; 30= *Ralstonia solanacearum*; 31= Controle negativo.

protocolo utilizado por Audy *et al.* (1994), uma vez que a temperatura de anelamento a 65 °C, utilizada pelos autores, não permitiu a repetibilidade dos resultados, ora havendo amplificação, ora não.

Por outro lado, ao ser reduzida a temperatura de anelamento para 55 °C, verificou-se a amplificação do fragmento com 0,73 kb (Figura 1), obtendo-se repetibilidade dos resultados, com eficiência tanto nas reações com DNA extraído como nas reações diretamente de colônias crescidas em meio líquido. Este fato permitiu a supressão da etapa de extração de DNA, agilizando o processo sem perder eficiência.

Estas adaptações se mostraram necessárias, já que as condições de reação e os isolados utilizados são distintos dos utilizados pelos autores que desenvolveram os primers. A temperatura de anelamento elevada aumenta a especificidade dos primers, mas exige um alto grau de homologia com o DNA bacteriano (Audy *et al.*, 1996). Este efeito da temperatura na capacidade de amplificação foi observado por Audy *et al.* (1996) e demonstrado neste estudo, para o isolado

Xap 1 (Figura 2). Para nenhum isolado da variante *fuscans*, foi verificada a banda de 0,55 kb (Figura 1), constatada por Audy *et al.* (1994) em alguns casos, sendo mais um indicativo da variabilidade desta bactéria. O aparecimento de uma banda fraca para *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians* (Brown 1918) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 (Xavit), com o mesmo número de pares de bases, demonstra haver homologia entre estes patovares, na mesma região (Figura 1). Gilbertson *et al.* (1989) fizeram esta observação para *X. hortorum* pv. *carotae* (Kendrick 1934) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, 1995 e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, 1995 (Xav), fato não observado neste trabalho para isolados de Xav. Curiosamente, Audy *et al.* (1994) também utilizaram dois isolados de Xavit, que não sofreram amplificação. Outro resultado verificado foi a ausência de bandas para dois dos isolados, um de Xap (Xap 1) e outro de Xapf (Xapf 6).

Observa-se que para estes mesmos isolados, reduzindo-se a temperatura de anelamento para 50 °C e 45 °C, não houve amplificação da banda característica com 0,73 kb (Figura 2). Somente Xap 1 sofreu uma tênue amplificação, porém resultando em uma banda com 0,396 kb não característica. Apesar de haver observações relacionando patogenicidade e especificidade dos primers, ficou constatado neste trabalho, que embora patogênicos, dois dos isolados não foram amplificados. Ainda que um deles (Xap 1) tenha sido o menos virulento dentre todos (Halfeld-Vieira & Souza, 2000), o que poderia estar associado a este fator, o outro (Xapf 6) foi

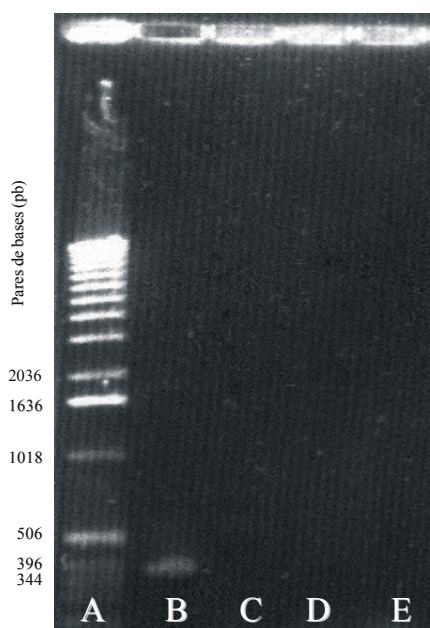


FIG. 2 - Produtos de amplificação por PCR utilizando o par de primers X4c e X4e e temperaturas de anelamento reduzidas. A= Marcador de 1 kb (GIBCO); B e C= temperatura de anelamento a 45 °C; D e E= temperatura de anelamento a 50 °C; B e D= isolado Xap 1; C e E= isolado Xapf 6.

bastante virulento, fugindo às expectativas.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que estes primers apresentam boa capacidade para identificação de Xap e Xapf, embora dois dos isolados aqui estudados não tenham sido detectados. O fato destes, embora patogênicos, não terem sido amplificados, demonstra que pode não existir relação entre esta propriedade e a presença de banda, como sugerido por Audy *et al.* (1994).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUDY, P., LAROCHE, A., SAINDON, G., HUANG, H.C. & GILBERTSON, R.L. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* pv. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. *Phytopathology* 84:1185-1192. 1994.
- 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* 86:361-366. 1996.
- BALARDIN, R.S. Doenças do feijoeiro. In: EPAGRI A Cultura do Feijão no Estado de Santa Catarina. Florianópolis. EPAGRI. 1992. pp. 195-225.
- BURKHOLDER, W.H. & BULLARD, E.T. Varietal susceptibility of beans to *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. *Plant Disease Reporter* 30:446-448. 1946.
- GILBERTSON, R.L., MAXWELL, D.P., HAGEDORN, D.J. & LEONG, S.A. Development and application of a plasmid DNA probe for detection of bacteria causing common bacterial blight of bean. *Phytopathology* 79:518-524. 1989.
- 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.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-976. 1970.
- LOUWS, F.J., FULBRIGHT, D.W., STEPHENS, C.T. & BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2286-2295. 1994.
- MARINGONI, A.C., KIMATI, H. & KUROSZAWA, C. Variabilidade sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Summa Phytopathologica* 20:164-167. 1994.
- MOHAN, S.T. & MOHAN, S.K. Novas linhagens do feijoeiro resistentes ao crestamento bacteriano comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 18:1117-1120. 1983.
- VALARINI, P.J. & MENTEN, J.O.M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: método para detecção em sementes de feijão. *Fitopatologia brasileira* 17:373-383. 1992.
- VELÁSQUEZ, N.C. & TRUJILLO, G.E. Comparacion de

- metodologias para la deteccion de la infeccion de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) com la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. *Agronomia Tropical* 34:29-41. 1984a.
- VELÁSQUEZ, N.C. & TRUJILLO, G.E. Evaluacion de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. en lotes de semilla de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante la tecnica combinada del medio semi-selectivo e inmunodifusion en agar. *Agronomia Tropical* 34:59-67. 1984b.
- WANG, H., QI, M. & CUTLER, A.J. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acid Research* 21:4153-4154. 1993.
- WELLER, D.M. & SAETTLER, A.W. Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and seedborne *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. *Phytopathology* 70:148-152. 1980.
- ZAPATA, M., FREYTAG, G.F. & WILKINSON, R.E. Evaluation for bacterial blight resistance in beans. *Phytopathology* 75:1032-1039. 1985.
-