



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**CRESTAMENTO BACTERIANO DO FEIJOEIRO NO BRASIL:
DISTRIBUIÇÃO, DIVERSIDADE E DETECÇÃO DE SEUS
AGENTES CAUSAIS *Xanthomonas* spp.**

BRUNA ALÍCIA RAFAEL DE PAIVA

BRASÍLIA-DF

2018

Bruna Alícia Rafael de Paiva

**CRESTAMENTO BACTERIANO DO FEIJOEIRO NO BRASIL:
DISTRIBUIÇÃO, DIVERSIDADE E DETECÇÃO DE SEUS
AGENTES CAUSAIS *Xanthomonas* spp.**

Tese apresentada à
Universidade de Brasília como
requisito parcial para a
obtenção do título de Doutora
em Fitopatologia pelo
Programa de Pós-Graduação
em Fitopatologia

Orientadora

Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira, Dra.

Co-orientadora

Adriane Wendland, Dra.

Brasília

Distrito Federal-Brasil

2018

Dedicatória

Dedico aos meus amados pais, Sonia e
Wilmer por todo amor e carinho.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, por estar sempre ao meu lado guiando meu caminhos, me dando força nos momentos difíceis, coragem e sabedoria.

Agradeço a toda minha família, pela compreensão, pelos abraços cheios de amor, pela dedicação, por acreditar em todos os meus sonhos e estarem presentes em todos os momentos. Em especial ao meu sobrinho Arthur, pelo amor puro e radiante, cheio de alegria.

À Dra. Adriane Wendland, por todos os anos de confiança e amizade.

À professora Marisa Ferreira, pela orientação, dedicação e por todo conhecimento transmitido.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da UnB por todo conhecimento adquirido.

Aos pesquisadores que colaboraram com coletas e envio de isolados: Prof. Ricardo Magela de Souza e Eliane A. de Souza (UFLA), Dra Abi Marques (Embrapa), Dr. Marie-Agnès Jacques (INRA, França) e Dra Suzete Destefano (IBSBF, Campinas SP)

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Agrícola da Embrapa pela convivência agradável. Em especial às colegas Nara Cristina e Maythisulene por todo auxílio dado a mim durante meus “primeiros passos” na técnica LAMP.

Às amigas, Amanda, Leilane, Renata, Thaty, Marina, Adriana e Bárbara, pelas fofocas diárias, pelo compartilhamento das boas histórias e também das lamentações. Pelos lanches deliciosos todas as manhãs e fins de tarde, regados a muito café.

Ao querido amigo e parceiro de trabalho Ronair, pela amizade sincera ao longo dos anos, pelo auxílio em cada etapa do meu trabalho, pelo imenso carinho e preocupação.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para meu trabalho.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação da Professora **Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira** e co-orientação da Doutora **Adriane Wendland**, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Crestamento bacteriano do feijoeiro no Brasil: distribuição, diversidade e detecção de seus agentes causais *Xanthomonas* spp.

Bruna Alcía Rafael de Paiva

TESE APROVADA EM __/__/__

Professor, Doutor Dirceu Macagnan (Instituto Federal de Brasília)
Examinador Externo

Pesquisador, Ph.D. Carlos Alberto Lopes (Embrapa Hortaliças)
Examinador Externo

Professor, Ph.D. Adalberto Corrêa Café-Filho (Universidade de Brasília)
Examinador Interno

Professor, Dr. Maurício Rossato (Universidade de Brasília)
Suplente

Professora, Doutora Marisa Álvares da Silva Velloso Ferreira (Universidade de Brasília)
Orientadora (Presidente)

Brasília – Distrito Federal
2018

Sumário

Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras	iii
Resumo Geral	vi
General Abstract	viii
Introdução Geral e Revisão de Literatura	1
A cultura do feijoeiro comum	1
Crestamento bacteriano comum	2
Histórico, distribuição e importância	2
Etiologia	3
Sintomatologia	5
Epidemiologia	7
Deteção e Diagnose	8
Controle	10
Justificativa	11
Objetivo Geral	13
Objetivos específicos	13
Fluxograma de Trabalho	25
Capítulo 1. Caracterização dos agentes causais do crestamento bacteriano comum do feijoeiro no Brasil: identificação molecular, filogenia e patogenicidade.....	27
Resumo	28
Introdução	29
Material e Métodos	31
Resultados	37
Discussão	42
Referências	66
Capítulo 2. Perfis de virulência em cultivares de feijoeiro e diversidade de efetores tipo III em <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i> e <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	74
Resumo	75
Introdução	76
Material e Métodos	79
Resultados	82
Discussão	84
Referências	103
Capítulo 3. Transmissão planta-semente de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i> e <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> em cultivares de feijoeiro	108
Resumo	109
Introdução	110
Material e Métodos	112
Resultados	116
Discussão.....	118
Referências	126

Capítulo 4. Detecção rápida de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i> e <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> em feijoeiro comum por amplificação isotérmica mediada por Loop	131
Resumo	132
Introdução.....	132
Material e Métodos	135
Resultados	140
Discussão	142
Referências	153
Conclusões Gerais	159
Perspectivas Futuras	160

Lista de Tabelas

Introdução Geral e Revisão de Literatura

Tabela 1. Resumo do histórico da classificação taxonômica de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> e <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	5
---	---

Capítulo 1

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados no trabalho.....	46
Tabela 2. Identificação, procedência, ano de coleta, cultivar de origem, identificação molecular, determinação da espécie e linhagem genética de isolados de <i>Xanthomonas</i> do feijoeiro	47
Tabela 3. Caracterização dos isolados de <i>Xanthomonas cannabis</i> pv. <i>phaseoli</i> , coletados no ano de 2014 em Água Fria de Goiás.....	52
Tabela 4. Relação dos tipos de sintomas observados nas plantas de feijoeiro da cultivar BRS Ártico inoculada com os isolados de <i>Xanthomonas cannabis</i> pv. <i>phaseoli</i> sob diferentes métodos de inoculação e submetidos a duas condições ambientais diferentes.....	53
Tabela 5. Relação dos tipos de sintomas observados nas plantas de feijoeiro da cultivar BRS Ártico inoculadas com os isolados de <i>Xanthomonas cannabis</i> pv. <i>phaseoli</i> , por meio do método de aspersão sem fermento sob temperatura de 28-30°C e 100% de umidade	54

Capítulo 2

Tabela 1. Designação e espécie dos isolados causadores do crestamento bacteriano do feijoeiro, origem geográfica, ano de isolamento e patogenicidade na cultivar BRS Ártico.....	87
Tabela 2. Sequências de iniciadores dos genes efetores tipo III (ET3), com respectivos tamanhos de fragmento esperado e temperatura de anelamento (T. a. °C).....	89
Tabela 3. Análise de variância da reação de severidade de 15 genótipos de feijoeiro comum aos dois isolados de <i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> e quatro isolados de <i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i>	91
Tabela 4. Severidade da doença obtida por meio do cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de cada isolado inoculado em 15 genótipos de feijoeiro.....	92

Capítulo 3

Tabela 1. Cultivares e linhagens genéticas de feijoeiro utilizadas nos ensaios, com descrição da genealogia das linhagens e o tipo de grão.....	119
Tabela 2. Desdobramentos das interações significativas da análise de variância referente à população bacteriana presente nas sementes de 24 genótipos de feijoeiro e severidade do crestamento bacteriano comum avaliadas em duas gerações, sob infecção natural de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	120
Tabela 3. Desdobramentos das interações significativas da análise de variância referente à população bacteriana presente na semente e severidade da doença, avaliadas em duas gerações, para os 24	121

genótipos de feijoeiro sob inoculação artificial de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*.

Capítulo 4

Tabela 1. Iniciadores usados neste estudo.....	144
Tabela 2. Limite de detecção de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> por LAMP e PCR convencional.....	145
Tabela 3. Detecção de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> em folhas de feijoeiro sintomática e assintomáticas.....	146

Lista de Figuras

Introdução Geral e Revisão de Literatura

Figura 1. Sintomas de cretamento bacteriano comum observados no limbo foliar de feijoeiro comum 6

Capítulo 1

Figura 1. Produtos da PCR multiplex separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) obtidos com os isolados de *Xanthomonas* do feijoeiro. Colunas 1 e 6: *X. phaseoli* pv. *phaseoli*; Colunas 2-5 e 7-17: *X. citri* pv. *fuscans*; Coluna 18: Controle negativo (água). O tamanho dos fragmentos corresponde aos amplicons obtidos com os pares de iniciadores X4c/X4e (730 pb), X1/Xf2 (450 pb), Am2F/R (394 pb) e Am1F/R (257 pb)..... 55

Figura 2. Pigmentação produzida por isolados da linhagem genética *fuscans* de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (à esquerda) comparada com a uma linhagem não *fuscans* de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. A: Coloração das colônias após 3 dias de crescimento em meio de cultura YDC a 28 °C. B: Coloração das colônias após 5 dias de crescimento em meio de cultura YDC a 28 °C 56

Figura 3. Amplificação dos genes *housekeeping gyrB* e *rpoD* para os isolados de *Xanthomonas* do feijoeiro separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%). M: marcador molecular de 100 pb (Ludwig®); Colunas 1 a 6: fragmentos gerados para o gene *gyrB* (1050 pb) ; Colunas 7-19: fragmentos gerados para o gene *rpoD* (1300 pb) 57

Figura 4. Árvore filogenética gerado pelo método da máxima verossimilhança, a partir do concatenamento das sequências dos genes *gyrB* e *rpoD* (1.746 pb). A confiança nos nós foi testada com 1000 repetições pela análise de bootstrap. A identificação NF1, corresponde a linhagem genética não *fuscans* 1 (*X. phaseoli* pv. *phaseoli*), NF2, corresponde a linhagem genética não *fuscans* 2 (*X. citri* pv. *fuscans*) e NF3, corresponde a linhagem genética não *fuscans* 3 (*X. citri* pv. *fuscans*)..... 58

Figura 5. Produtos da PCR duplex separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) obtidos com os isolados de *Xanthomonas* sp. Colunas 1: *X. phaseoli* pv. *phaseoli*; Colunas 3 - 9: *Xanthomonas* sp; Coluna 10: branco. O tamanho dos fragmentos corresponde aos iniciadores X4c/X4e (730 pb) e X-gumD F7/R7 (402 pb)..... 59

Figura 6. Reação de hipersensibilidade induzida em tomate cv. Santa Clara, observada após 24 horas de infiltração. A: Controle positivo que corresponde a um isolado *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (BRM 48904). B: Isolado de *Xanthomonas* sp (BRM 48956)..... 60

Figura 7. Sintomas observados em plantas de feijoeiro da cultivar BRS Ártico 10 dias após a inoculação via método de incisão foliar com tesoura dos isolados. A: BRM 48948 (*Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*.); B: BRM 25305 (*X. phaseoli* pv. *phaseoli*); C: BRM 25308 (*X. citri* pv. *fuscans* – Linhagem *fuscans*)..... 61

Figura 8. Sintomas observados em feijoeiro cultivar BRS Ártico após 10 62

dias da inoculação com isolados de *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*. A: Manchas com bordo amarelado. B: Morte do ápice dos trifólios. C: Encarquilhamento do trifólio. D: Pintas brancas espalhadas pelo limbo do trifólio.....

Figura 9. Árvore filogenética gerada com o método da máxima verossimilhança, a partir do concatenamento das sequências dos genes *gyrB* e *rpoD* (1.862 pb) dos isolados de *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*. A confiança nos nós foi testada pela análise de bootstrap com 1000 repetições..... 63

Capítulo 2

Figura 1. Dendrograma gerado por meio do coeficiente de Jaccard para o repertório de genes efetores tipo III entre os isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*..... 93

Figura 2. Distribuição dos efetores (T3E) entre as espécies *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, *X. citri* pv. *fuscans* e *X. cannabis* pv. *phaseoli*. Retângulos azuis representam a presença do gene correspondente, e retângulos brancos representam a ausência do gene. 94

Figura 3. Distribuição dos efetores (T3E) entre os isolados da espécie *X. cannabis* pv. *phaseoli*. Isolados em cinza são representantes de cada haplótipo obtido para as espécies *X. phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans*. Retângulos azuis representam a presença do gene correspondente, e retângulos brancos representam a ausência do gene..... 97

Figura 4. Média geral da severidade dos sintomas causados por dois isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (NF1) e quatro de *X. citri* pv. *fuscans* (NF2 e *fuscans*) quando inoculados em 15 genótipos de feijoeiro comum. A testemunha foi inoculada com água estéril..... 99

Figura 5. Curva do progresso da doença para os 15 genótipos de feijoeiro comum quando inoculados com *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*, isolados BRM 25302 (NF1), BRM 25305 (NF1), BRM 32202 (NF2), BRM 48898 (NF2), BRM 25304 (*fuscans*) e BRM 32185 (NF2), avaliados aos 5, 8 e 11 dias após a inoculação (dai)..... 100

Capítulo 3

Figura 1. População de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* expressa em Log (ufc/g de semente) detectada em sementes de 24 genótipos de feijoeiro avaliados ao longo de duas gerações sob condições de ocorrência natural de crestamento bacteriano comum. Letras iguais indicam que as médias não diferem entre si, entre as duas gerações sucessivas de plantio (Scott-Knott 5%)..... 122

Figura 2. População de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* expressa em Log (ufc/g de semente) detectada em sementes de 24 genótipos de feijoeiro inoculados artificialmente em condições de campo e avaliados ao longo de duas gerações. Letras iguais indicam que as médias não diferem entre si, entre as duas gerações sucessivas de plantio (Scott-Knott 5%)..... 123

Capítulo 4

Figura 1. Sensibilidade LAMP avaliada por meio de diluição em série do DNA bacteriano do isolado BRM 25302 (100 ng – 0,01 fg) e diluição em série da suspensão de células bacterianas (10^8 – 1 ufc/mL). N: controle negativo..... 147

Figura 2. Detecção específica de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans* por meio de LAMP. (a): Xpp, *X. phaseoli* pv. *phaseoli*; Xcf, *X. citri* pv. *fuscans*; Xag, *X. axonopodis* pv. *glycines*; Xam, *X. axonopodis* pv. *manihotis*; Xg, *X. gardneri*; Xcc, *X. campestris* pv. *campestris*.(b): Xpp, *X. phaseoli* pv. *phaseoli*; Xcf, *X. citri* pv. *fuscans*; Cff, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; Fs, *Fusarium solani*; Fop, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*; Cl, *Colletotrichum lindemuthianum*; Mp, *Macrophomina phaseolina*; Pg, *Pseuercospora griseola*. (c): Xcp, *X. phaseoli* pv. *phaseoli*; Xcf, *X. citri* pv. *fuscans*; 1-5, microbiota da folha; bean, DNA da folha do feijão. N: controle negativo..... 148

Figura 3. Detecção de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* por LAMP em folhas sintomáticas e assintomáticas por meio de inoculação artificial. Tubo 1 = 5 dias após a inoculação (dai); 2 = 4 dai; 3 = 3 dai; 4 = 2 dai; 5 = 1 dai; 6 = 4 horas após a inoculação; 7 = 1 dia antes da inoculação; 8= 10 dai; 9 = 15 dai. P= controle positivo; N= controle negativo. As reações foram repetidas duas vezes. 149

Figura 4. Detecção de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* por LAMP em lotes de sementes. (a) Sementes mantidas por 1 hora de repouso em solução salina. Tubos 1, 2 e 3, lotes de sementes contaminadas; Tubo 4, lote de semente sadia. (b) Sementes mantidas por 4 horas de repouso em solução salina. Tubos 1, 2 e 3, lotes de sementes contaminadas; Tubo 4, lote de semente sadia. (c) Parte dos lotes submetidos à 1 hora de repouso em solução salina Tubos 1-7, diferentes lotes de sementes contaminadas. P: controle positivo. N: controle negativo 150

Resumo Geral

Paiva, Bruna Alicia Rafael. **Crestamento bacteriano do feijoeiro no Brasil: distribuição, diversidade e detecção de seus agentes causais (*Xanthomonas* spp.)**. 2018. 160 p. Doutorado em Fitopatologia – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O crestamento bacteriano comum (CBC) é a doença de origem bacteriana mais importante do feijoeiro comum. É causado por quatro linhagens genéticas pertencentes a duas espécies do gênero *Xanthomonas*, *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*, Xcf (linhagem fuscans, NF2 e NF3) e *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, Xpp (NF1). Os objetivos deste estudo foram: i) validar a PCR multiplex com todos os iniciadores específicos já disponíveis para a detecção simultânea das duas espécies; ii) a partir de uma coleção representativa caracterizar a coleção de isolados quanto às linhagens genéticas e à diversidade dos genes efetores tipo III; iii) avaliar a virulência de isolados, representativos dos diferentes perfis de efetores, em genótipos de feijoeiro; vi) avaliar a transmissão dos patógenos planta-semente ao longo de duas gerações; v) desenvolver um método LAMP para identificação rápida e sensível de Xpp e Xcf em sementes e folhas de feijoeiro. A metodologia empregada incluiu testes de patogenicidade na cultivar BRS Ártico, técnicas moleculares (PCR multiplex, amplificação de genes efetores tipo III, validação de ensaio LAMP, e sequenciamento dos genes *gyrB* e *rpoD*), ensaios de virulência em casa de vegetação e ensaios de transmissão para a semente em campo. A identidade de 117 isolados da coleção foi confirmada como fuscans (55 isolados) e não fuscans (62 isolados) pela patogenicidade na cultivar BRS Ártico, e PCR multiplex com iniciadores específicos. Isolados de *Xanthomonas* coletados em Goiás em 2014, não foram enquadrados em nenhuma das duas espécies, no entanto, sua

patogenicidade foi confirmada via inoculação por aspersão sem ferimentos na cultivar BRS Ártico sob condições de alta temperatura e umidade. A análise filogenética permitiu discriminar os isolados nas quatro linhagens genéticas das espécies Xpp e Xcf, e identificar a ocorrência da espécie *X. cannabis* pv. *phaseoli* (Xcp) no Brasil. Uma sub-amostra de 42 isolados de Xpp e Xcf foi avaliada quanto à presença de 15 genes efetores tipo III, e verificou-se a ocorrência de 6 haplótipos (perfis distintos). *X. cannabis* pv. *phaseoli* apresentou apenas cinco efetores tipo III. Entre os isolados da linhagem fuscans apenas um haplótipo foi identificado, enquanto para as demais linhagens os perfis de efetores foram variáveis. Um isolado representante de cada haplótipo foi inoculado em 15 cultivares de feijoeiro revelando variabilidade na virulência entre as linhagens genéticas, sendo a linhagem fuscans (Xcf) a mais virulenta, seguida da linhagem NF1 (Xpp) e depois NF2 (Xcf). Houve interação significativa entre os isolados e genótipos, indicando a possível ocorrência de raças do patógeno. A transmissão do patógeno pela semente foi avaliada em 24 genótipos de feijoeiro em campo durante duas gerações. Observou-se que a redução da severidade da doença não implica na redução da população bacteriana na semente, e que a transmissão plantamente não é influenciada pelo genótipo da hospedeira. Por fim, foi desenvolvido um método LAMP para a detecção de Xcf e Xpp nas sementes e parte aérea, que se mostrou específico e sensível, além de reduzir significativamente o tempo da diagnose, em função da detecção visual dos produtos da amplificação.

General Abstract

Paiva, Bruna Alícia Rafael. **Common bacterial blight in Brazil: Distribution and diversity of its causal agents (*Xanthomonas* spp.)**. 2018. 160 p. Doctorate in Plant Pathology – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Common bacterial blight (CBB) is the most important bacterial disease of common bean. It is caused by four genetic lineages belonging to two species of the genus *Xanthomonas*, *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (lineage *fuscans*, NF2 and NF3) and *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (NF1). The objectives of this thesis were: i) to validate a multiplex PCR protocol with specific primers for the simultaneous detection of the two species; ii) to identify the genetic lineages present in the collection of Brazilian isolates and to determine the diversity of the type III effector genes; iii) to evaluate the virulence of isolates, representatives of the different profiles of effectors, by inoculating genotypes of common bean; iv) to evaluate the transmission of pathogens to the seed over two generations; v) to develop a LAMP assay for fast and sensitive identification of Xpp and Xcf in bean seeds and leaves. The methodology employed included pathogenicity tests on the susceptible cultivar BRS Ártico, molecular techniques (multiplex PCR, amplification of type III effector genes validation of LAMP assay, and sequencing of *gyrB* and *rpoD* genes), greenhouse virulence assays and seed transmission assays in the field. The identity of 117 isolates was determined as *fuscans* (55 isolates) and non *fuscans* (62 isolates) by pathogenicity testing and multiplex PCR with specific primers. Isolates of *Xanthomonas* collected in Goiás in 2014 could not be assigned to either species, however, their pathogenicity was confirmed by inoculation by spraying without wounds in the cultivar BRS Ártico under conditions of high temperature and humidity. The phylogenetic analysis allowed to discriminate the isolates in the four genetic lineages of the

species Xpp and Xcf, and to confirm the occurrence of the species *X. cannabis* pv. *phaseoli* (Xcp) in Brazil. A sub-sample of 42 Xpp and Xcf isolates was evaluated for the presence of 15 type III effector genes, and 6 haplotypes (distinct profiles) were found. *X. cannabis* pv. *phaseoli* presented only five type III effectors. Among isolates of the fuscans lineage only one haplotype was identified, while for the other strains the profiles of effectors were variable. A representative isolate of each haplotype was inoculated on 15 common bean cultivars revealing variability in virulence among the genetic lineages, with the fuscans line (Xcf) being the most virulent, followed by the NF1 line (Xpp) and NF2 (Xcf). The interaction between isolates and genotypes was significant indicating the possible occurrence of races of the pathogen. Seed transmission of the pathogen was evaluated in 24 genotypes of common bean during two field generations. It was observed that reduced disease severity was not correlated with a reduction of the bacterial population in the seeds, and that plant to seed transmission was not affected by the host genotype. Lastly, a LAMP method was developed for the detection of Xcf and Xpp in bean seeds and aerial parts, which proved to be specific and sensitive, while significantly reducing the time for diagnosis, due to the visual detection of amplification products.

Introdução Geral e Revisão de Literatura

A cultura do feijoeiro-comum

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é historicamente um dos principais alimentos consumidos e produzidos no Brasil. A cultura do feijoeiro é um fator de segurança alimentar e nutricional e de importância cultural na culinária de diversos países (Barbosa e Gonzaga, 2012). Apresenta uma ampla adaptação edafoclimática permitindo o seu cultivo no Brasil durante o ano todo. A cultura pode ser explorada em três épocas diferentes: a safra “das águas” ou 1º safra, cujo plantio é feito entre agosto e dezembro, com predominância na Região Sul; a safra “das secas” ou 2º safra, realizada durante os meses de janeiro a abril, abrangendo todos os estados produtores; e a safra de “inverno” ou 3º safra, realizada entre maio e agosto na região Centro-Oeste (Moreira et al., 2003). O Estado de Goiás figura entre os maiores produtores nas três safras, sendo o plantio concentrado na safra das “águas” e “seca”, de outubro a março (Silva e Wander, 2013).

De acordo com dados do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola para a safra 2017, a produção nacional de feijão foi de 3,3 milhões de toneladas, considerando as três safras do produto, sendo que a 1ª safra participa com 46,8% da produção nacional, a 2ª safra com 35,7% e a 3ª safra com 16,9%. Estima-se que haja um aumento de 5,6% na produção em 2018. Nesse levantamento, os maiores produtores, somadas as três safras são, Paraná com 22%, Minas Gerais com 16,4% e Goiás com 9,8% de participação na produção nacional (IBGE, 2018).

Embora a produção nacional tenha tido um aumento nos últimos anos, ainda é insuficiente para atender a demanda interna, que é de 15 kg/habitante/ano (CONAB, 2018). Produtividades baixas são observadas, em função da tecnologia utilizada, das variações climáticas e do esgotamento progressivo da fertilidade do solo. No entanto, produtividades elevadas são alcançadas com a adoção de tecnologias como o uso de cultivares melhoradas, preparo adequado do solo, adubação equilibrada, técnicas avançadas de irrigação, e controle de pragas, doenças e plantas daninhas (Zucareli, 2005).

Diversos fatores contribuem para a baixa produtividade do feijoeiro, dentre eles destaca-se a incidência de doenças (Sartorato, 2006). Mesmo com a adoção de medidas de controle, perdas de 15% no rendimento devido às doenças fúngicas, bacterianas e virais são estimadas (Manten, 2008). Dentre as principais doenças que acometem o feijoeiro comum, destacam-se o crestamento bacteriano comum, a murcha de *Curtobacterium*, a antracnose, a mancha angular, o mofo branco e a murcha de *Fusarium* (Paula Júnior e Wendland, 2012).

Crestamento bacteriano comum (CBC)

Histórico, distribuição geográfica e importância

O crestamento bacteriano comum (CBC) foi inicialmente observado em Nova York em 1892 por Beach e foi relatada pela primeira vez em 1897 (Gilbertson e Maxwell, 1992). No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez no Estado do Pará, por Caldeira e Vieira em 1938 (Robbs, 1954), sendo

posteriormente, determinada a presença da linhagem fuscans no estado de São Paulo (Paradela Filho et al., 1967).

A doença tem ampla distribuição mundial e apresenta grande importância econômica para a produção de feijão em muitos países e, em particular, na Argentina, Brasil, Colômbia, México, Uganda, Zâmbia, Zimbábue, África do Sul, Estados Unidos e Irã (Fourie, 2002, Lak et al., 2002, Harveson, 2009, Karavina et al., 2011). É relatado na África perdas de até 40% do rendimento de grãos (Opio et a., 1996).

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* (Young et al., 1978), posteriormente reposicionadas dentro da espécie *X. axonopodis* após o estudo de reclassificação do gênero empregando a homologia de DNA e testes fenotípicos (Vauterin et al., 1995). A patovar *phaseoli* agrupava, segundo esses autores, todas as estirpes de *Xanthomonas* patogênicas ao feijoeiro, no entanto, determinou-se posteriormente tratar-se de uma patovar geneticamente diversa (Mkandawire et al., 2004, Alavi et al., 2008), que hoje sabe-se que compreende quatro linhagens genéticas distintas. Uma dessas linhagens corresponde à “variante” fuscans que produz um pigmento marrom em meio de cultura, resultado da secreção e oxidação de ácido homogentísico, um intermediário da via catabólica da tirosina (Burkholder, 1930; Goodwin & Sopher, 1994). Posteriormente, a “variante” fuscans foi classificada em uma espécie distinta,

X. fuscans subsp. *fuscans* (Xff) com base em homologia de DNA, sequenciamento do DNA ribossomal e AFLP (Schaad et al., 2005).

Estudos mais recentes reposicionaram algumas espécies do gênero *Xanthomonas*, empregando uma caracterização polifásica (Ah-You et al., 2009) e análises simultâneas de sequências de genes (multilocus sequence analysis) (Constantin et al., 2016). Assim, atualmente a etiologia do CBC é complexa e atribuída a duas espécies de *Xanthomonas*, contendo linhagens *fuscans* e não *fuscans*. A linhagem *fuscans* e as linhagens não *fuscans* 2 (NF2) e 3 (NF3) pertencem à espécie *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (Xcf). A linhagem não *fuscans* 1 (NF1) é classificada como *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (Xpp) (Rademaker et al., 2005, Constantin et al., 2016). Um breve histórico da classificação taxonômica dessas duas espécies está descrito na Tabela 1.

As bactérias causadoras do CBC são baciliformes (0,4-0,9 x 0,6-2,6 µm), gram-negativas, móveis por um flagelo, estritamente aeróbias e possuem crescimento ótimo a 25 °C. Em meio nutriente ágar contendo glicose ou sacarose, as colônias apresentam crescimento com bordo liso, convexas, e cor amarelo brilhante (Ferreira e Salgado, 1995).

Os genomas de todas as linhagens genéticas já foram sequenciados. Primeiramente foi sequenciado o genoma da estirpe 4834-R, pertencente a *X. citri* pv. *fuscans* (*fuscans*) (Darrasse et al., 2013), revelando genes compartilhados com outras *Xanthomonas* que incluem seis tipos de sistemas de secreção, além de múltiplos efetores. Mais tarde foi sequenciado o genoma de 9 isolados de Xpp e 13 isolados da linhagem *fuscans* identificando eventos de transferência horizontal envolvendo mais de 100 genes (Aritua et al., 2015). Por último, Ruh et al. (2017) sequenciaram isolados de todas as linhagens

genéticas (NF1, NF2, NF3 e fuscans) e concluíram que os genes efetores TAL são capazes de contribuir para adaptação na hospedeira quando transferidos horizontalmente entre as linhagens.

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 et al. (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 et al. (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>
Schaad et al. (2005), (2006)	2 espécies: <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> (Xap) e <i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> (Xff)
Rademaker et al. (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>)
Alavi et al. (2008)	4 linhagens genéticas dentro de 2 espécies: linhagem <i>fuscans</i> (Xff); Xap GL1; Xap GL2 e Xap GL3
Constantin et al. (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>)

Sintomatologia

As diferentes linhagens genéticas envolvidas na ocorrência de CBC causam sintomas indistinguíveis no feijoeiro (Mutlu et al., 2008). Em todos os casos a bactéria penetra nos tecidos da hospedeira pelos estômatos ou por ferimentos invadindo os espaços intercelulares, causando a dissolução gradual da lamela média (EPPO, 2008). Os sintomas manifestam-se em toda a parte aérea da planta (Bianchini et al. 1997), podendo-se observar inicialmente pequenas lesões encharcadas nas folhas, que posteriormente tornam-se secas e quebradiças com bordo amarelo (Figura 1). As lesões podem estar esparsas no limbo, ou nas margens das folhas (Saettler, 1991).

Nas vagens, surgem pequenas manchas aquosas, que aumentam progressivamente de tamanho, tornando deprimidas e ligeiramente avermelhadas. A infecção da vagem frequentemente ocorre pelo sistema vascular, alcançando a semente pelo funículo (Gilbertson e Maxwell, 1992). Nas sementes, o patógeno permanece tanto externa quanto internamente e pode causar ou não sintomas, que podem ser desde a ligeira descoloração no hilo até presença de manchas e enrugamentos (Wallen e Sutton, 1965).



Figura 1. Sintomas de cretamento bacteriano comum observados no limbo foliar de feijoeiro comum.

Epidemiologia

As bactérias causadoras do CBC do feijoeiro podem sobreviver como epifíticas na superfície da hospedeira ou de plantas daninhas (Pernezny & Jones 2002). Em condições favoráveis, podem penetrar no tecido da hospedeira e colonizar, multiplicando-se exponencialmente (fase patogênica). A idade da planta, a idade do tecido, a resistência e o vigor do hospedeiro são fatores que influenciam o crescimento bacteriano e a resposta à doença (Belete & Bastas, 2017).

A sobrevivência no solo ou nos restos de cultura pode ser influenciada pela área geográfica, tipo de solo, clima, e práticas culturais (Karavina et al. 2008). No entanto, essa sobrevivência não apresenta importância na maioria das principais áreas de cultivo de feijão do mundo onde o período de decomposição do material vegetal é rápido (Akhavan et al, 2013).

Muitas hospedeiras além do feijoeiro comum são conhecidas, como a soja, mucuna, outras espécies de *Phaseolus*, e várias espécies de *Vigna* (Bradbury, 1986). As hospedeiras naturais conhecidas são: *Beta vulgaris*, *Calopogonium* sp., *Dolichos lablab*, *Euphorbia heterophylla*, *Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Lupinus polyphyllus*, *Mucuna deeringiana*, *Macroptilium lathyroides*, *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus*, *P. acutifolius* var. *acutifolius*, *P. acutifolius* var. *latifolius*, *P. coccineus*, *Vigna aconitifolia*, *V. angularis*, *V. mungo*, *V. radiata*, *V. umbellata*, *V. unguiculata*, *Pisum sativum*, *Pueraria* sp., *Strophostyles helvola* e *Solanum nigrum* (Bradbury, 1986, Vidaver, 2012, Akhavan et al., 2013). Segundo Schuster et al (1973), os restos de cultura colonizados também servem como fonte de inóculo de um ano para o outro, e são mais eficientes na superfície do solo do que enterrados.

Em geral, condições de alta pluviosidade e umidade associadas a, temperaturas elevadas (25 - 35 ° C) são ideais para o desenvolvimento do CBC (Saettler, 1989, Gilbertson e Maxwell, 1992). A irrigação por aspersão, assim como a precipitação aumentam o tamanho da população no campo e facilitam a dispersão bacteriana (Akhavan et al., 2013, Akhavan et al., 2009), tendo em vista que respingos de água, contendo o patógeno, associados ao vento são responsáveis por dispersar a bactéria para plantas vizinhas saudáveis (Lindemann e Upper, 1985).

O inóculo é transportada tanto interna quanto externamente na semente do feijoeiro e pode sobreviver por períodos de até cinco anos, quando armazenada em condições adequadas, mantendo as populações bacterianas elevadas e com capacidade de causar doença em plântulas emergentes (Marques et al., 2005). A semente é um importante veículo de disseminação a

curtas e a longas distâncias, representando potencial para introdução do patógeno em áreas em que a doença ainda não existia (Sartorato e Rava, 1994). Nas sementes, a presença da bactéria é observada desde o tegumento até as superfícies dos embriões (Darrasse et al., 2018). A infecção pode ocorrer por meio do sistema vascular da planta mãe, onde a transmissão para a planta jovem ocorre através das lesões cotiledonares após a germinação (Akhavan et al., 2013), ou ainda por meio do contato da bactéria ao estigma da flor.

Detecção e Diagnose

A precisão da diagnose é fundamental para a tomada de decisões, quanto às medidas de controle que devem ser empregadas, que podem incluir até mesmo a condenação de um lote de sementes. A detecção de fitopatógenos via PCR é um método rápido, específico e sensível, e dependendo dos iniciadores específicos, pode-se detectar um único patógeno ou vários membros de um grupo de patógenos relacionados em uma mesma amostra (Berg et al., 2006, Robène-Soustrade et al., 2010). Para a detecção de Xpp e Xcf por PCR, estão disponíveis os iniciadores X4c/X4e (Audy et al., 1994), Xf1/Xf2 (Toth et al., 1998), Am1F/Am1R e Am2F/Am2R (Boureau et al., 2013).

Os iniciadores específicos X4c/X4e desenvolvidos por Audy et al. (1994) são derivados de uma sequência do DNA plasmidial do patógeno, que amplificam um fragmento de 730 pb, porém sem a capacidade de distinção consistente entre a linhagem fuscans e não fuscans, e com ocorrência de falsos negativos. Halfeld-Vieira et al., (2001) demonstraram a ocorrência de

falsos negativos usando os iniciadores X4c/X4e em uma coleção de isolados brasileiros. Os iniciadores Xf1/Xf2 foram desenvolvidos a partir de uma sequência de região conservada amplificada (SCAR), derivada da análise de RAPD do patógeno *X. citri* pv. *fuscans* (linhagem *fuscans*), e amplificam um fragmento do DNA de 450 pb para esta linhagem (Toth et al., 1998). A partir dos genes de efetores *avrBst* e *xopL*, Boureau et al. (2013) desenvolveram os iniciadores Am1F/R e Am2F/R, que amplificam fragmentos de 257 pb e 394 pb, respectivamente, e quando usados em conjunto com os iniciadores X4c/X4e para compor uma reação multiplex diminuem o risco de falsos negativos.

Diversas técnicas foram desenvolvidas e adaptadas com a finalidade de detectar a presença de Xpp e Xcf em sementes de feijão, tais como o uso de bacteriófagos, meios semisseletivos, testes sorológicos como ELISA, microscopia de imunofluorescência, imunodifusão em ágar e PCR (Clafflin et al., 1987, Tebaldi et al., 2007, Popović et al., 2010, Tebaldi et al., 2010, Denardin et al., 2013). No entanto, para a quantificação da bactéria, o método de cultivo do extrato (ou lavado) de sementes em meios de cultura semisseletivo é o mais adequado (Chang et al., 1991).

Controle

O controle do CBC, assim como outra doença de etiologia bacteriana, apresenta limitações e as medidas disponíveis são aquelas baseadas nos princípios de exclusão e, eventualmente, de erradicação (Agrios, 2005). Em áreas com histórico de ocorrência da doença, o sistema de rotação de culturas ou o consórcio com o milho, por exemplo, auxiliam na redução das fontes de inóculo para o controle da doença (Fininsa, 2003). Outra prática cultural

importante é a eliminação, por meio de queima, aração ou remoção de plantas daninhas, restos de cultura e outras hospedeiras potenciais (Saettler, 1989, Gilbertson et al., 1990, Moreno e Mora, 1984).

O controle químico pode ser usado como uma ferramenta que, somada a outras medidas de controle, como o uso de cultivares resistentes, ajuda a manter a população bacteriana abaixo do limiar necessário para o desenvolvimento da doença e disseminação do patógeno (Gilbertson e Maxwell, 1992). São comumente usados os produtos químicos à base de sulfato de cobre, hidróxido de cobre e potássio ditiocarbamato de metila (Belete e Bastas, 2017). No AGROFIT estão registrados seis produtos químicos para o controle da doença, sendo quatro produtos a base de cobre, e dois produtos que apresentam como ingrediente ativo o acibenzolar-S-metil (MAPA, 2018).

As sementes constituem a principal fonte de inóculo primário da doença, e o uso de semente sadia e certificada é tido como o principal e mais eficiente método de controle, principalmente se aliado ao uso de cultivares resistentes, que é o método mais econômico e tecnicamente prático (Popović et al., 2012). Porém, a herança da resistência a esse patógeno é geneticamente complexa, descrita como oligogênica ou poligênica (Kelly et al., 2003, Santos et al., 2003, Manzanera et al., 2006). Essa herança complexa é resultado da ocorrência de efeitos aditivos e não aditivos, que resultam em baixa disponibilidade de genótipos resistentes (Marquez et al., 2007, Ribeiro et al., 2017). Ainda é observada uma interação diferencial entre a resistência nas vagens e nas folhas, demonstrando que os genes que controlam a resistência foliar não são os mesmos que controlam a resistência nas vagens (Alladassi et al., 2017).

De acordo com o catálogo de cultivares da EMBRAPA, apenas a cultivar carioca BRS Notável e a cultivar preta BRS Esplendor são resistentes ao CBC (EMBRAPA, 2018). Os catálogos do Instituto Agrônomo de Campinas e Instituto Agrônomo do Paraná não incluem cultivares resistentes ao CBC.

Justificativa

O crestamento bacteriano comum merece destaque, devido à sua ampla distribuição, capacidade de reduzir a produção de forma significativa, capacidade de transmissão dos patógenos por sementes, baixa eficiência do controle químico, e dificuldade de obtenção de cultivares comerciais resistentes (EPPO, 2011; Bianchini, 1997). Dentro das estratégias do manejo integrado da doença, a mais eficaz, economicamente viável e ambientalmente segura é o uso de cultivares resistentes (Trindade et al., 2015). Contudo, para que a resistência genética seja duradoura e de amplo espectro é necessário tanto o conhecimento das fontes de resistência na espécie hospedeira como da diversidade genética e patogênica na população do patógeno (Nakatani, 2009), para o melhor entendimento da dinâmica de epidemias.

A variação quanto à virulência, muitas vezes ligada à origem geográfica dos isolados dificulta o desenvolvimento de variedades resistentes à doença (Bianchini et al., 1997). Diversos cultivares de feijão apresentam diferentes níveis de resistência à bacteriose, confirmando a natureza quantitativa da resistência do feijoeiro ao crestamento bacteriano comum. Nesse contexto, estudos sobre a diversidade genética e patogênica de seus agentes causais são essenciais para o manejo do CBC pela resistência genética.

Todas as linhagens ou grupos genéticos de *Xanthomonas* patogênicos ao feijoeiro aparentemente ocorrem em todas as regiões de ocorrência da doença, no entanto, estudos sugerem que na África a linhagem fuscans é predominante (Mkandawire et al., 2004; Opio et al., 1996). Diferenças na eficiência da transmissão pela semente poderiam talvez explicar a predominância do grupo fuscans sobre as linhagens não-fuscans em algumas regiões. Não existem na literatura dados que demonstrem uma ligação entre a estrutura da população nas sementes com a reação da doença em diferentes genótipos de feijoeiro.

A identificação das espécies e/ou linhagens causadoras do crestamento bacteriano comum por meio de técnicas moleculares mais simples, com menos etapas, mas que proporcionem alta especificidade, sensibilidade e rapidez são desejáveis, principalmente se aplicadas à detecção nas sementes. Se puderem ser usados diretamente com extratos de plantas ou sementes, pode se tornar uma metodologia eficiente para a identificação rápida da presença do patógeno no campo, além de auxiliar os trabalhos quarentenários e rotinas de detecção, no intuito de reduzir o tempo e aumentar a precisão dos resultados.

Objetivos

Objetivo Geral: Caracterizar isolados de *Xanthomonas* patogênicos ao feijoeiro coletados ao longo de nove anos em diversas regiões produtoras no Brasil, por meio de estudos filogenéticos, da diversidade dos efetores e da virulência, e eficiência de transmissão por sementes em condições de campo,

além de desenvolver um método de detecção específica dos patógenos por LAMP.

Objetivos específicos:

- Coletar, isolar e caracterizar uma coleção de isolados associados aos sintomas de crestamento bacteriano do feijoeiro comum, provenientes das principais regiões produtoras no Brasil;
- Validar a PCR multiplex com iniciadores específicos para a detecção simultânea das duas espécies, e empregá-la para identificar a espécie (Xpp ou Xcf) predominante na coleção de isolados;
- Caracterizar a coleção de isolados quanto às linhagens genéticas presentes por meio do sequenciamento de genes de *housekeeping gyrB* e *rpoD*, e determinar a diversidade dos genes efetores tipo III na coleção;
- Determinar a virulência de isolados representativos dos perfis de efetores presentes na coleção, em cultivares/genótipos de feijoeiro com diferentes níveis de resistência;
- Quantificar a população presente nas sementes originadas de diferentes genótipos de feijoeiro ao longo de duas gerações, com o objetivo de investigar a eficiência de transmissão da bactéria planta-semente em diferentes materiais genéticos;

- Desenvolver uma técnica de amplificação isotérmica mediada por Loop (LAMP) para identificação rápida e sensível de Xpp e Xcf, com o objetivo de identificar a bactéria em infecções latentes e sintomáticas na parte aérea e em sementes contaminadas.

Literatura Citada

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press. San Diego.

Ah-You, N., Gagnevin, L., Grimont, P. A., Brisse, S. Nesme, X., Chiroleu, F., Bui Thi Ngoc, L., Jouen, E., Lefeuvre, P., Vernière, C. and Pruvosto, O. 2009. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 306-18.

Akhavan, A., Bahar, M., Saeidi, G., Lak, M. 2009. Factors affecting epiphytic population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in epidemiology of bean common blight. J sci. Technol. Agric. Nat.13: 265-77.

Akhavan, A., Bahar, M., Askarian, H., Lak, M. R., Nazemi, A., Zamani, Z. 2013. Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. SpringerPlus. 2: 41-42.

Alavi, S. M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C., Poussier, S. 2008. 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. Appl. Environ. Microbiol. 74: 3295-3301.

- Alladassi, B. M., Nkalubo, S. T., Mukankusi, C., Mwale, E. S., Gibson, P., Edema, R. Urrea, C. A., Kelly, J. D. Rubaihayo, P. R. 2017. Inheritance of resistance to common bacterial blight in four selected common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. J. Plant Breed. Crop Sci. 9: 71-8.
- Aritua, V., Harrison, J., Sapp, M., Buruchara, R., Smith, J., Studholme, D. J. 2015. Genome sequencing reveals a new lineage associated with lablab bean and genetic exchange between *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. Front Microbiol. 6: 1080.
- Barbosa, F., Gonzaga, A. 2012. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira. Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, Brasil.
- Belete, T., Bastas, K. 2017. Common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) of beans with special focus on ethiopian condition. J. Plant Pathol. Microbiol. 8: 2.
- Berg, T., Tesoriero, L., Hailstones, D. 2006. A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. Lett. Appl. Microbiol. 42: 624-30.
- Bianchini, A., Maringoni, A., Carneiro, S. M. 1997. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). páginas 353- 375. in: Kimati, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A., Rezende, J. A. M. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Editora Ceres, São Paulo.
- Bradbury, J. F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International Mycological Institute. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=BYDmOwAACAAJ>>
- Burkholder, W. H. 1930. The bacterial diseases of the bean: a comparative study. 1° ed.: Cornell University. 93 p. Disponível em:

<<http://books.google.com.br/books?id=ECInAQAAMAAJ>>.

CONAB. 2018. Acompanhamento da safra brasileira de grãos- Safra 17/18. V 9. Disponível em: <https://www.conab.gov.br>.

Chang, C., Donaldson, R., Crowley, M., Pinnow, D. 1991. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology* 81:449-453.

Claflin, L., Vidaver, A., Sasser, M. 1987. MXP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Phytopathology* 77: 730-4.

Constantin, E., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghen, C., De Vos, P., and Cottyn, B. 2016. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathol.* 65:792-806.

Darrasse, A., Carrère, S., Barbe, V., Boureau, T., Arrieta-Ortiz, M. L., Bonneau, S., Briand, M., Brian, C., Cociancich, S. Durand, K. 2013. Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. *BMC Genomics.* 14: 76.

Darrasse, A., Barret, M., Cesbron, S., Compant, S., Jacques, M-A. 2018. Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. *Plant Soil.* 422: 115-28.

Denardin, N. D. Á. Agostini, V. A. 2013. Detection and quantification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and its variant *fuscans* in common bean seeds. *J. Seed Sci.* 35: 428-34

EMBRAPA. 2018. Catálogo de cultivares de feijoeiro comum- Safra 2016/2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/>.

- Ferreira, L. P., Salgado, C. L. 1995. Bactérias. In: Bergamin Filho, a., Kimati, H., Amorim, L (Ed.) Manual de Fitopatologia. São Paulo: Ceres, v. 1, 1995. p. 919. 5 cap. 3°
- Fininsa, C. 2003. Relationship between common bacterial blight severity and bean yield loss in pure stand and bean-maize intercropping systems. Int. J. Pest. Manag. 49: 177-85.
- Fourie, D. 2002. Distribution and severity of bacterial diseases on dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. J. Phytopathol. 150: 220-6.
- Gilbertson, R. L., Maxwell, D. P. 1992. Common bacterial blight of bean. Pages 18-39 in: Chaube, H. S., Kumar, J., Mukhopadhyay, A. N., Singh, U. S., ed. Plant diseases of international importance. New Jersey.
- Gilbertson, R., Rand, R., Hagedorn, D. 1990. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic strains of *X. campestris* in bean debris. Plant Dis. 74, 322-7.
- Goodwin, P., Sopher, C. 1994. Brown pigmentation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* associated with homogentisic acid. Can. J. Microbiol. 40: 28-34.
- Halfeld-Vieira, B. A., Souza, R. M., Figueira, A.R., Boari, A. J. 2001. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. Fitopatol. Bras. 26: 4.
- Harveson, R. M, 2009. Common bacterial blight of dry beans in Nebraska. Disponível em: <<http://ianrpubs.unl.edu/epublic/live/g1956/build/g1956.pdf>>
- IBGE, 2018. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em:<ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola >

- Karavina, C., Mandumbu, R., Parwada, C., Zivenge, E. 2011. Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (EF Sm). Journal Anim Plant Sci. 9: 1161-8.
- Karavina, C., Tigere, T. A., Chihya, J. 2008. The contribution of soil and crop debris inocula to the outbreak of bacterial common blight in field beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under Zimbabwean conditions. J Sustainable Dev Africa. 10: 221.
- Kelly, J., Gepts, P., Miklas, P., Coyne, D. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. Field Crops Res. 82: 135-54.
- Lak, M., Shamsbakhsh, M., Bahar, M. 2002. Identification of the bacterial agent of bean leaf and pod blight in Markazi province. J Sci & technol Agric & natur Rsour. 6: 231-43.
- Lindemann, J., Upper, C. 1985. Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1229-32.
- Manten, J. 2008. Importância de novos defensivos agrícolas no manejo de doenças no feijoeiro. Proceedings of the Anais do Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão, Campinas. 957-60.
- MAPA. 2018. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 02 de junho de 2018.
- Manzanera, A. S., Carmen, M., Asensio, C., Singh, S. P. 2006. Gamete selection for resistance to common and halo bacterial blights in dry bean intergene pool populations. Crop Sci. 46: 131-5.
- Marques, A. S. D. A., Guimarães, P. M., dos Santos, J. P., Vieira, T. M. 2005. Sobrevivência e viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em

sementes de feijão armazenadas sob condições controladas. Fitopatol. Bras. 30: 527.

Marquez, M. L., Terán, H., Singh, S. P. 2007. Selecting common bean with genes of different evolutionary origins for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Crop Sci 47, 1367-74.

Mkandawire, A. B., Mabagala, R. B., Guzmán, P., Gepts, P., Gilbertson, R. L. 2004. Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. Phytopathology 94: 593-603.

Moreira, J. A., Stone, L., Biava, M. 2003. Feijão: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Coleção Criar, Plantar, ABC, 500P.

Moreno, R. Mora, L. 1984. Cropping pattern and soil management influence on plant diseases: II. Bean rust epidemiology. Turrialba 34: 41-5.

Mutlu, N., Vidaver, A., Coyne, D., Steadman, J., Lambrecht, P., Reiser, J. 2008. Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. Plant Dis. 92: 546-54.

Nakatani, A. K., Lopes, R., Camargo, L. E. 2009. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Summa Phytopathol. 35: 116-20.

Opio, A., Allen, D. J., Teri, J. 1996. Pathogenic variation in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, the causal agent of common bacterial blight in *Phaseolus* beans. Plant Pathol. 45: 1126-33.

Paradela Filho, O., Carvalho, A., Pompeu, A. 1967. Occurrence of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burk.) Starr & Burk, in dry beans in the State of São Paulo. Bragantia. 26: 1-4.

- Paula Júnior, T., Wendland, A. 2012. Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças. Epamig, Viçosa, Brasil.
- Pernezny, K. and Jones, J. B. 2002. Common bacterial blight of snap bean in Florida. University of Florida Cooperative Extension. Service Plant Path Fact Sheet 6.
- Popović, T., Balaž, J., Nikolić, Z., Starović, M., Gavrilović, V., Aleksić, G., Vasić, M., Živković, S. 2010. Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. Afr. J. Agric. Res. 5:2730-2736.
- Popovic, T., Starovic, M., Aleksic, G., Zivkovic, S, Josic, D, Ignjatov, M, Milovanovic, P. 2012. Response of different beans against common bacterial blight disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Bulg. J. Agri. Sci. 18: 701-7.
- Rademaker, J., Louws, F., Schultz, M., Rossbach, U., Vauterin, L., de Bruijn, F. J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. Phytopathology. 95:1098-111.
- Ribeiro, T., Azevedo, C. V. G., Esteves, J. D. F., Carbonell, S. M., Ito, M. F., Chiorato, A. F. 2017. Reaction of common bean lines to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Crop Breed. App. Biotechnol. 17: 40-6.
- Robbs, C. 1954. A bacteriose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Distrito Federal. Agronomia. 12: 445-8.
- Robène-Soustrade, I., Legrand, D., Gagnevin, L., Chiroleu, F., Laurent, A., Pruvost, O. 2010. Multiplex nested PCR for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* from onion seeds. Appl. Environ. Microbiol. 76: 2697-703.

- Ruh, M., Briand, M., Bonneau, S., Jacques, M-A., Chen, N. W. 2017. *Xanthomonas* adaptation to common bean is associated with horizontal transfers of genes encoding TAL effectors. BMC Genomics. 18: 670.
- Saettler, A. W. 1989. Common bacterial blight. In: Schwartz, H. F., Pastor-Corrales, M. A. (editors). Bean production problems in the tropics. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 261–283.
- Santos, A. S., Bressan-Smith, R. E., Pereira, M. G., Rodrigues, R., Ferreira, C. F. 2003. Genetic linkage map of *Phaseolus vulgaris* and identification of QTLs responsible for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Fitopatol. Bras. 28: 5-10.
- Sartorato, A. 2006. Desafios no controle de doenças na cultura do feijoeiro na região Centro-Oeste. VI Seminário sobre pragas, doenças e plantas daninhas do feijoeiro. 15-7.
- Sartorato, A., Rava, C. A. 1994. Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Documentos Embrapa.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. Syst App Microbiol 28:494-518.

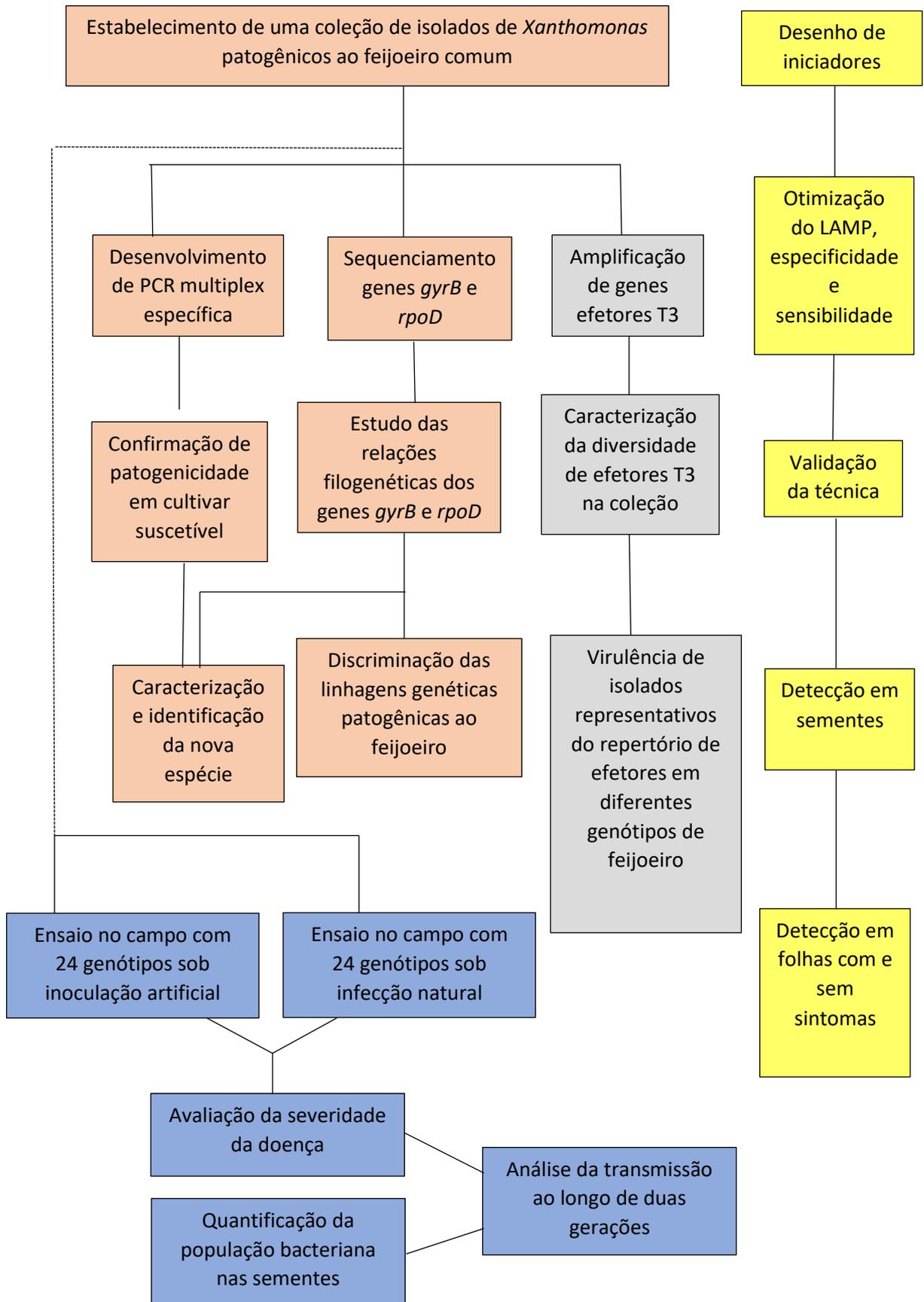
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy G, Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst App Microbiol* 29: 690-695.
- Schuster, M., Coyne, D., Hoff, B. 1973. Comparative virulence of *Xanthomonas phaseoli* strains from Uganda, Colombia, and Nebraska. *Plant Dis Rep.* 57: 74-75.
- Silva, O. F., Wander, A. E. 2013. O feijão comum no Brasil passado, presente e futuro. Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 287.
- Tebaldi, N. D., Souza, R. M., Machado, J. C. 2007. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi-seletivo. *Fitopatol. Bras.* 32:56-58
- Tebaldi, N. D., Peters, J., Souza, R. M. 2010. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry, immunostaining and direct viable counting. *Trop. Plant Pathol.* 35: 213-22.
- Trindade, R. D. S., Rodrigues, R., Júnior, A. T. D. A., Gonçalves, L. S. A., Viana, J. M. S., Sudré, C. P. 2015. Combining ability for common bacterial blight resistance in snap and dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Sci. Agron.* 37: 37-43.
- Toth, I., Hyman, L., Taylor, R., Birch, P. 1998. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv. *phaseoli*. *J. Appl. Microbiol.* 85: 327-36
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 45: 472-89.
- Vieira, C., Borém, A., Ramalho, M., Carneiro, J. D. S. 2005. Melhoramento do feijão. *Melhoramento de espécies cultivadas.* 2: 301-91.

Wallen, V., Sutton, M. 1965. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh. on field bean in Ontario. Can. J. Bot. 43: 437-46.

Young, J., Dye, D., Bradbury, J., Panagopoulos, C., Robbs, C. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zeal. J. Agr. Res. 21: 153-77

Zucareli, C. 2005. Adubação fosfatada, produção e desempenho em campo de sementes de feijoeiro cv. Carioca Precoce e IAC Carioca Tybatã. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas. 183 f.

Fluxograma do Trabalho



Capítulo 1

Caracterização dos agentes causais do cretamento bacteriano comum do feijoeiro no Brasil: identificação molecular, filogenia e patogenicidade

Resumo

O crestamento bacteriano comum do feijoeiro é causado por quatro linhagens genéticas pertencentes a duas espécies do gênero *Xanthomonas*, *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (linhagem fuscans, NF2 e NF3) e *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (NF1). Uma coleção de 179 isolados de *Xanthomonas* patogênicas ao feijoeiro comum procedentes de regiões produtoras do Brasil, coletados entre 2007 e 2016 foi estabelecida. Para identificação/confirmação das espécies foram realizados testes de patogenicidade nas cultivares suscetíveis BRS Ártico, PCR multiplex com um conjunto de 4 pares de iniciadores específicos e análise filogenética com os genes *gyrB* e *rpoD*. Dos 179 isolados obtidos, 62 foram distribuídos entre as linhagens não fuscans (NF1, NF2 e NF3) e 55 pertencem a *X. citri* pv. *fuscans* (linhagem fuscans). Contudo, 62 não puderam ser classificados em nenhuma das espécies pelos testes realizados. PCR com iniciadores para os genes da goma xantana, testes de reação de hipersensibilidade em tomateiro e testes de patogenicidade em feijoeiro revelaram se tratar de outra espécie de *Xanthomonas*. A análise filogenética das sequências de 20 desses isolados mostrou que essas são relacionados ao isolado referência (estirpe Nyagatare) da espécie *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*, relatada em Ruanda, em 2015. Trata-se, portanto do primeiro relato da ocorrência dessa espécie no Brasil.

Palavras-chave: Multiplex-PCR; *Phaseolus vulgaris*; linhagens genéticas, *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*, *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*

Introdução

O crestamento bacteriano comum (CBC) é uma das principais doenças bacterianas da cultura do feijão em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Valarini et al., 1996). No Brasil, o patógeno encontra-se amplamente disseminado, situação decorrente da combinação de fatores tais como a suscetibilidade das cultivares e o uso de sementes contaminadas, aliados às condições climáticas favoráveis à doença (Torres et al., 2009). A doença assume grande importância principalmente na “safra das águas”, época em que as condições ambientais são favoráveis para o seu desenvolvimento.

A etiologia do CBC é complexa e atribuída a duas espécies do gênero *Xanthomonas* contendo linhagens fuscans e não fuscans (Schaad et al., 2005, Schaad et al., 2006, Alavi et al., 2008). A linhagem fuscans e as linhagens não fuscans 2 (NF2) e 3 (NF3) pertencem à espécie *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (anteriormente *X. fuscans* subsp. *fuscans* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* grupo 9.6 por rep-PCR). A linhagem não fuscans 1 (NF1) é classificada como *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (anteriormente *X. axonopodis* pv. *phaseoli* grupo 9.4 por rep-PCR) (Rademaker et al., 2005, Constantin et al., 2016).

Recentemente, Aritua et al. (2015) relataram a ocorrência de uma nova espécie de *Xanthomonas* (estirpe “Nyagatare”), como uma ameaça grave para os cultivos de feijoeiro em Ruanda, no continente africano. Os autores isolaram a bactéria de material com sintomas foliares de cor acastanhada com bordo amarelo, além de manchas brancas, enrolamento das folhas superiores e murcha. Após o sequenciamento completo do genoma, concluíram que a estirpe Nyagatare não está filogeneticamente relacionada a nenhuma das duas espécies associadas ao CBC no feijoeiro. Posteriormente uma proposta de

classificação como *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli* foi sugerida, devido à sua estreita relação filogenética com *X. cannabis* (Jacobs et al., 2015).

O novo relato mostra a natureza diversa desses patógenos, indicando que o crestamento bacteriano comum pode ser causado por um complexo de espécies, assim como ocorre com outras doenças de etiologia bacteriana, como a mancha bacteriana do tomate (Jones et al., 2004) e murcha bacteriana causada por *Ralstonia spp.* (Meng, 2013).

Diferentes técnicas de detecção podem ser empregadas para demonstrar a presença da bactéria na hospedeira. A PCR é amplamente utilizada com múltiplas aplicações em diagnóstico de doenças de plantas (Vincelli & Tisserat, 2008) incluindo várias doenças bacterianas (Louws et al., 1999, Halfeld-Vieira et al., 2001, López et al., 2006, Mahuku et al., 2006).

A detecção de patógenos via PCR é um método rápido, específico e sensível. Dependendo dos iniciadores específicos, pode-se detectar um único patógeno ou vários membros de um grupo de patógenos relacionados. Para detecção dos agentes causais do CBC estão descritos na literatura três conjuntos de iniciadores específicos, X4c/X4e (Audy et al., 1994), Xf1/Xf2 (Toth et al., 1998) e Am1/Am2 (Boureau et al., 2013). Apenas os pares Xf1/Xf2 são capazes de diferenciar a linhagem fuscans das linhagens não fuscans.

Os iniciadores específicos X4c/X4e desenvolvidos por Audy et al. (1994) são derivados de uma sequência do DNA plasmidial do patógeno, que amplificam um fragmento de 730 pb. Apresentam como limitação a ocorrência de falsos negativos, conforme relatado por Halfeld-Vieira et al. (2001), pois não amplificaram DNA de dois isolados da coleção estudada. Os iniciadores Xf1/Xf2 foram desenvolvidos a partir de uma sequência de região conservada

amplificada (SCAR), derivada da análise de RAPD do patógeno *X. citri* pv. *fuscans* (linhagem *fuscans*), e amplificam um fragmento do DNA de 450 pb para esta linhagem.

A partir dos genes de proteínas efetoras *avrBst* e *xopL*, Boureau et al. (2013) desenvolveram os iniciadores Am1F/R e Am2F/R, que amplificam um fragmento de 257 pb e 394 pb, respectivamente. Quando usados em conjunto com os iniciadores X4c/X4e para compor uma reação multiplex, diminuem o risco de falsos negativos e permitem a diferenciação de isolados patogênicos daqueles não patogênicos, apresentando-se como uma alternativa aos testes de patogenicidade. Embora os autores sugiram a realização de testes de patogenicidade para aqueles resultados ambíguos.

A técnica MLSA (multilocus sequence analysis) tem sido aplicada em estudos filogenéticos de espécies procariontas, dentre elas as pertencentes ao gênero *Xanthomonas* (Parkinson et al., 2007, Ah-You et al., 2009, Hajri et al., 2009, Constantin et al., 2016). A técnica MLSA baseia-se na análise simultânea das sequências de nucleotídeos de vários genes de *housekeeping*. Tais genes são conservados e essenciais para a manutenção de funções celulares básicas encontradas em procariontas (Marcelletti et al., 2010). Para o gênero *Xanthomonas*, os genes *gyrB* (DNA girase subunidade β) e *rpoD* (RNA polimerase subunidade sigma 70) são confiáveis para discriminar espécies dentro do gênero (Constantin et al., 2016).

No Brasil, alguns estudos foram desenvolvidos para otimizar a técnica de detecção das bactérias por PCR empregando somente os iniciadores propostos Audy et al (1994), X4c/X4 (Halfeld-Vieira et al., 2001, Silva et al.,

2013) ou ainda para aprimorar técnicas de detecção nas sementes (Denardin & Agostini, 2013, Tebaldi et al., 2007, Torres et al., 2009, Tebaldi et al., 2010).

Com base no exposto acima, o objetivo do trabalho foi estabelecer uma coleção de isolados de *Xanthomonas* patogênicas ao feijoeiro comum procedentes de regiões produtoras do Brasil, coletados ao longo de vários anos, e determinar a identidade, distribuição e prevalência das espécies na coleção, por meio da identificação molecular, caracterização da patogenicidade e estudos filogenéticos.

Material e Métodos

Coletas, isolamento, cultivo e preservação dos isolados

A coleção foi composta por isolados mantidos na Embrapa Arroz e Feijão desde 2007, provindos dos estados de São Paulo, Goiás, Paraná e Rio Grande do Sul, e isolados obtidos por meio de coletas realizadas entre 2014 e 2016, em lavouras dos estados do Paraná, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso. Cada amostra coletada foi representada por folhas de uma planta, com sintomas visíveis de cretamento bacteriano comum. O material coletado foi conduzido até o Laboratório de Microbiologia Agrícola da Embrapa Arroz e Feijão, onde foi feito isolamento da bactéria.

O isolamento foi realizado segundo protocolo proposto por Romeiro (2005). Após 24 horas de incubação, colônias amarelas típicas do gênero *Xanthomonas* foram purificadas em meio 523 (Kado & Heskett, 1970). Os isolados foram preservados em papel filtro, em água e congelamento a -80°C para manutenção da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa

Arroz e Feijão, e uma replicata de cada isolado foi mantida na coleção de trabalho.

Pigmentação da colônia

Para verificar a produção de pigmentação marrom em meio de cultura, característico da linhagem fuscans, foi realizado o cultivo dos isolados em meio YDC (Schaad et al., 2001) e 523. As placas foram mantidas por 5 dias em câmara de crescimento B.O.D a 26°C para observação da coloração das colônias. A coloração marrom esperada para a linhagem fuscans é em decorrência da secreção, acumulação e oxidação de ácido homogentísico (intermediário da via catabólica da tirosina) que alteram a coloração do meio de cultivo da bactéria (Goodwin & Sopher, 1994).

Teste de patogenicidade

Todos os isolados foram testados para patogenicidade na cultivar BRS Ártico, suscetível ao cretamento bacteriano. Plantas com dez dias de idade após a semeadura, cultivadas em copos descartáveis com capacidade para 500 mL, em casa de vegetação, foram submetidas à inoculação utilizando-se o método de incisão das folhas (Rava et al., 1988). O método consiste em realizar dois cortes perpendiculares à nervura central, sem atingí-la, distanciados apenas dois centímetros um do outro, com auxílio de uma tesoura previamente imersa na suspensão bacteriana, cuja concentração bacteriana foi ajustada para 10^7 UCF/mL ($OD_{540} = 1,0$). Para cada isolado nove plantas foram

inoculadas. A severidade dos sintomas foi avaliada dez dias após a inoculação, por meio de uma escala de notas de 0 a 6 (Rava et al., 1988) atribuindo: nota 0 para ausência de sintomas; nota 1 para pequenos amarelecimentos no corte; nota 2 para o amarelecimento que se estende para a região entre cortes; nota 3 para necrose leve na região de corte; nota 4 para necrose na região de corte e amarelecimento na região entre os cortes; nota 5 para o mesmo aspecto observado na nota anterior, mas com amarelecimento que se estende na região acima do corte superior e abaixo do corte inferior; e nota 6 para folha completamente necrosada. Isolados considerados patogênicos foram aqueles que receberam notas médias a partir de 2.

PCR-Multiplex específica

Foi otimizado um protocolo de PCR-multiplex com os iniciadores X4c/X4e, Xf1/Xf2, Am1F/Am1R e Am2F/Am2R (Tabela 1) para detecção simultânea de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans*. A reação foi preparada com o Kit de PCR multiplex (QIAGEN®) em volume final de 10 µL contendo: 5 µL da solução master mix; 1 µL de Q-solution; 1 µL do mix dos iniciadores (10 µM); e 2 µL de lisado de células bacterianas após fervura a 95°C por 5 min (10^7 ufc/ µL). Controles positivos [DNA de cultura de referência BRM 25302 (Xpp) e BRM 25304 (Xcf)] e negativos (reação sem DNA, com água) foram incluídos em todos os ensaios. As reações foram submetidas ao seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial a 94° C/15 min; 35 ciclos de desnaturação 94° C/30 seg; anelamento 65° C/45 seg; extensão 72° C/90 seg; e extensão final 72° C/10 min.

Produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, preparado em Tris base- ácido bórico -EDTA (TBE) 1 X e corado com GelRed 2X por 30 min, para a visualização das bandas e fotodocumentação.

PCR específica para o gênero *Xanthomonas*

A amplificação do gene *gumD*, parte do sistema de síntese da goma xantana, foi realizada com os iniciadores X-gumD F7 e X-gumD R7 (Tabela 1), descritos por Adriko et al. (2014). Para isto, realizou-se uma PCR duplex com os iniciadores X4e/X4c (específicos para Xpp e Xcf) e X-gumD F7/D7, com reações de amplificação em um volume total de 10 µL, contendo 1X de PCR Buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 1X de Q-Solution, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Qiagen®), 2 µL de lisado de células bacterianas (10⁷ ufc/mL). O programa utilizado para as amplificações constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C/3 min; seguido de 30 ciclos a 95 °C/20 seg, 60 °C/15 seg e 72 °C/15 seg; e um ciclo de extensão final a 72 °C/3 min.

Produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, preparado em Tris base- ácido bórico -EDTA (TBE) 1 X e corado com GelRed 2X por 30 min, para a visualização das bandas e fotodocumentação.

Indução de reação de hipersensibilidade (HR) em tomateiro

Isolados coletados no estado de Goiás (Tabela 3) em lavouras de feijão que exibiram características culturais semelhantes àquelas do gênero

Xanthomonas, porém apresentaram resultados negativos para PCR específica, foram submetidos ao teste de infiltração em planta não hospedeira para verificação da indução da reação de hipersensibilidade, como um método adicional para confirmação da patogenicidade dos isolados.

Os testes de infiltração foram realizados em tomateiro (cv. Santa Clara) com as folhas totalmente expandidas, usando-se suspensões bacterianas preparadas a partir de culturas puras com 48 h calibradas pela escala 7 de McFarland ($\sim 10^9$ ufc/mL). Uma seringa foi utilizada para infiltração da suspensão nos espaços intercelulares da face abaxial das folhas. O mesmo procedimento foi realizado com água destilada (controle). As plantas foram avaliadas de 24 h a 96 h após a infiltração, observando-se o desenvolvimento de necrose localizada e dessecamento.

Teste de patogenicidade dos isolados de *Xanthomonas* sp. em feijoeiro

Foram testados diferentes métodos de inoculação com o objetivo de verificar a patogenicidade dos isolados semelhantes à *Xanthomonas*, que apresentaram PCR negativo. Os métodos testados foram: (a) método padrão da incisão da folha com a tesoura; (b) método da tesoura modificado, em que após os cortes, as folhas foram imersas em suspensão bacteriana (10^7 ufc/mL) por 5 segundos; (c) perfuração com agulha contaminada com a bactéria (He & Munkvold, 2012); (d) método da imersão do primeiro trifólio foliar (Grimault et al., 2014); (e) aspersão das folhas com ferimentos e (f) aspersão das folhas sem ferimentos (Jacques et al., 2005).

Com o método de inoculação (c), uma agulha estéril contaminada com a bactéria crescida por 48h foi inserida no nó principal da planta em um ângulo

de 45° aproximadamente. Com o método (d), o trifólio foliar foi imerso em uma suspensão bacteriana a 10^7 ufc/mL por 30 segundos, e com os métodos (e) e (f), as plantas foram inoculadas por aspersão da suspensão bacteriana a 10^7 ufc/mL até o ponto de escorrimento. Para indução de ferimentos utilizou-se jato de areia antes da aspersão da suspensão bacteriana.

Após as inoculações, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 horas e depois mantidas durante todo o ensaio em casa de vegetação. Os ensaios foram realizados sob duas condições de umidade: umidade alta (100 %) e baixa (60 %), e temperatura média de 25 °C. Ensaio com o método mais eficiente de inoculação foram realizados também a temperatura de 30 °C.

Para todos os ensaios, o aparecimento dos sintomas foi monitorado diariamente. E aos 10 dias após a inoculação folhas com sintomas foram coletadas para reisolamento, a fim de concluir os postulados de Koch.

Análise de sequências parciais dos genes *gyrB* e *rpoD*

A amplificação de sequências parciais dos genes *housekeeping*, *gyrB* e *rpoD* (Tabela 1), foi realizada com o Kit de PCR multiplex (QIAGEN®) em volume final de 30 µL, contendo: 15 µL da solução mastermix; 3 µL de Q-solution; 0,25 µM de cada iniciador *gyrB* F/R e *rpoD* F/R, e 5 µL de lisado de células de uma suspensão (10^7 ufc/mL) aquecida a 96 °C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento na Macrogen (Seul, Coréia do Sul). Edição das sequências e geração das sequências consenso foram realizadas com o software Geneious 11.0.4 (Kearse et al., 2012). As sequências obtidas foram alinhadas às sequências disponíveis de isolados pertencentes às espécies *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, CFBP 6164 (*gyrB*: HQ

591248; *rpoD*: CP020967) e CFBP 6546 (*gyrB*: HQ591285; *rpoD*: HQ591333), *X. citri* pv. *fuscans* NF2, CFBP 6990 (*gyrB*: HQ591301; *rpoD*:CP020983) e CFBP 6991 (*gyrB*: HQ591302; *rpoD*: CP021015), *X. citri* pv. *fuscans* NF3, CFBP 6996 (*gyrB*: HQ591306; *rpoD*: CP020989) e CFBP 6994 (*gyrB*: HQ591305; *rpoD*: CP020987), *X. cannabis* pv. *phaseoli*, estirpe Nyagatare (*gyrB*: JRQI01000041.1 *rpoD*: JRQI01000054.1). Como outgroup foi selecionado o isolado LMG490 de *Xanthomonas albilineans* (*gyrB*:AB248383; *rpoD*: AB248394). A partir do alinhamento múltiplo das sequências foi construída a árvore filogenética pelo método da máxima verossimilhança (Maximum Likelihood) baseado no modelo de Tamura e Nei (1993), com o software MEGA 7 (Kumar et al., 1994). A robustez dos agrupamentos formados foi estimada pelo mesmo programa por meio de análise de “bootstrap” com 1.000 repetições.

Resultados

Identificação dos isolados

Foram obtidos 179 isolados que apresentaram características culturais semelhantes ao gênero *Xanthomonas*. A PCR multiplex permitiu discriminar 117 isolados nas espécies em função dos fragmentos amplificados (Tabela 2). Os isolados patogênicos pertencentes à linhagem genética *fuscans*, pertencente à espécie *X. citri* pv. *fuscans*, apresentaram a amplificação simultânea de quatro fragmentos, com os quatro pares de iniciadores, X4c/X4e (730 pb), Xf1/Xf2 (450 pb), Am2F/R (394 pb) e Am1F/R (297 pb). Os isolados pertencentes às demais linhagens genéticas (NF1, NF2 e NF3) apresentaram

apenas três fragmentos (Figura 1). Todos isolados pertencentes à Xcp e Xpp foram patogênicos ao feijoeiro (cv. BRS Ártico), e apresentaram amplificação dos dois genes de virulência com os pares de iniciadores Am1 (*xopL*) e Am2 (*avrBst*).

A produção de pigmentos de cor marrom nas colônias e no meio confirmou os resultados obtidos com a PCR Multiplex. Todos os isolados Xcf (linhagem fuscans) apresentaram pigmentação marrom após 5 dias de crescimento, enquanto os demais isolados permaneceram com a pigmentação amarela. O cultivo em meio de cultura YDC também permitiu confirmar as características culturais das colônias, que se apresentaram lisas, mucoides, convexas e brilhantes, para todos os 179 isolados, congruentes com as características típicas para o gênero *Xanthomonas* (Figura 2).

Em resumo, do total de 179 isolados caracterizados, 62 isolados foram distribuídos entre as linhagens não fuscans (NF1, NF2 e NF3), 55 pertencem a *X. citri* pv. *fuscans* (linhagem fuscans), e 62 pertencem a *Xanthomonas*, mas a identificação ao nível de espécies não foi possível pelos protocolos de PCR utilizados.

Na cultivar suscetível BRS Ártico, foi possível comprovar a patogenicidade de todos aqueles isolados identificados como *X. phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans* (Tabela 2). Os demais isolados da coleção (n=62) que apresentaram resultado negativo para PCR multiplex, apresentaram notas 0 e 1 por meio do método padrão de teste de patogenicidade e foram submetidos a novos ensaios de patogenicidade com outros métodos de inoculação.

Discriminação das linhagens NF1, NF2 e NF3

Todos isolados não fuscans (PCR negativa com os iniciadores específicos Xf1/Xf2 para a linhagem fuscans, e ausência de pigmento marrom em meio de cultura) foram submetidos à reação de PCR para amplificação parcial dos genes *gyrB* e *rpoD*. A amplificação gerou produtos de aproximadamente 1050 pb para o gene *gyrB* e 1300 pb para o gene *rpoD* (Figura 3), que foram submetidos ao sequenciamento. O comprimento das sequências consenso geradas após edição e alinhamento foi 944 pb e 807 pb, para os genes *gyrB* e *rpoD* respectivamente.

As sequências obtidas dos isolados em estudo foram alinhadas às sequências de referência disponíveis no GenBank para cada linhagem genética (NF1, NF2, NF3 e fuscans). O alinhamento consistiu das sequências de 62 isolados pertencentes às linhagens não fuscans, dois pertencentes à linhagem fuscans e dois isolados de referência, IBSBF 253 e IBSBF 1346. A árvore gerada método da máxima verossimilhança para as sequências concatenadas mostrou valores de bootstraps consistentes, indicando um alto nível de confiança nos agrupamentos. Foi verificada a existência de quatro grupos filogenéticos (Figura 4). Os três primeiros grupos reúnem isolados pertencentes à espécie *X. citri* pv. *fuscans*, sendo que no primeiro grupo foram reunidos 32 isolados com os isolados de referência (CFBP 6090 e CFBP 6091) pertencentes à linhagem genética NF2. O segundo ramo agrupou 4 isolados com os de referência (CFBP 6994 e CFBP 6996) pertencentes à linhagem genética NF3. O terceiro reuniu os isolados da linhagem genética fuscans. Em um clado separado foram agrupados 26 isolados da espécie *X. phaseoli* pv. *phaseoli* linhagem genética NF1.

As análises conjuntas das sequências concatenadas dos dois genes (1.746 pb) revelaram valores de identidade entre 99,4%-100% dentro de cada linhagem genética, valores entre 99,0 %- 99,2 % entre as linhagens genéticas da mesma espécie (NF2, NF3 e fuscans), e o valor mínimo de 95% entre as duas espécies (*X. citri* pv. *fuscans* e *X. phaseoli* pv. *phaseoli*).

PCR para o gênero *Xanthomonas*

Os isolados cujo DNA não pode ser amplificado com nenhum dos quatro pares de iniciadores usados na PCR multiplex foram submetidos a PCR específica para o gênero *Xanthomonas*, para confirmação da identificação (Tabela 3). Todos os 62 isolados foram positivos para amplificação de um fragmento de 402 pb referente ao gene *gumD*, que é responsável pela produção de goma xantana, uma característica presente na maioria das espécies do gênero (Figura 5).

Indução de reação de hipersensibilidade (HR) em tomateiro

Todos isolados obtidos a partir de plantas de feijoeiro com sintomas de CBC, que não foram identificados como Xpp ou Xcf, incitaram HR tomate entre 24- 48 horas após infiltração (Figura 6), confirmando a natureza patogênica dos isolados. Simultaneamente, os isolados foram testados na planta hospedeira de origem.

Teste de patogenicidade dos isolados de *Xanthomonas* sp. em feijoeiro

A relação dos isolados e métodos de inoculação testados para essa espécie de *Xanthomonas* estão listados nas Tabela 4 e 5.

Do total de 62 isolados identificados como pertencentes ao gênero *Xanthomonas* por amplificação do gene *gumD* e cuja patogenicidade foi verificada pela reação de hipersensibilidade positiva em tomateiro, 20 isolados foram selecionados e caracterizados quanto à patogenicidade em feijoeiro. Inicialmente foi testado o método padrão (a), no entanto, nenhum dos isolados de *Xanthomonas sp.* induziram sintomas na cultivar suscetível BRS Ártico (Figura 7). Em função desse resultado, outros métodos foram testados para a comprovação da patogenicidade dos isolados (Tabela 4).

Dos outros cinco métodos testados, nenhum sintoma foi observado com os métodos (c) e (d). Os demais métodos testados mostraram melhores resultados, com a ocorrência de sintomas para alguns isolados. Porém os mais promissores foram (e) e (f) em condições de elevada umidade (100% U). Nas plantas que foram mantidas sob umidade mais baixa (60%U), os sintomas iniciaram como manchas brancas nos trifólios, mas sem evolução. No momento em que as plantas foram mantidas sob alta umidade e 25°C, foram verificados sintomas semelhantes ao CBC, com lesões arredondadas de bordo amarelado esparsas pelo limbo foliar. Contudo, este resultado não foi constatado para todos isolados inoculados.

Com os métodos (e) e (f), as plantas foram mantidas sob temperaturas elevadas (28-30°C) além da alta umidade (100%), e todos os isolados testados causaram sintomas na cultivar suscetível (Tabela 5). Além dos sintomas típicos de doença, também observou-se sintomas atípicos, como manchas brancas pelo limbo foliar dos trifólios, encarquilhamento dos trifólios e seca das pontas

dos ramos (Figura 8). Para todos os tipos de sintoma observados, a bactéria foi reisolada e confirmada a presença do gene *gumD* por PCR.

Filogenia dos isolados de *Xanthomonas* sp. baseada nas sequências dos genes *gyrB* e *rpoD*

A análise filogenética para os genes *gyrB* e *rpoD* mostrou que os isolados de *Xanthomonas* sp. coletados no estado de Goiás, Brasil, são filogeneticamente relacionados ao isolado de referência (estirpe Nyagatare) da espécie *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli* (Figura 9). As análises conjuntas das sequências dos dois genes (1.862 pb) revelaram valores de identidade entre 98,3%-100% entre os isolados em estudo e o isolado de referência da espécie *X. cannabis* pv. *phaseoli*. Os valores de identidade genética entre os isolados da coleção e os isolados de referência dos outros agentes causais do CBC (*X. citri* pv. *fuscans* e *X. phaseoli* pv. *phaseoli*) foram entre 90 - 91%, mostrando maior distância genética entre essas espécies e a nova espécie detectada no Brasil.

Discussão

As técnicas moleculares constituem uma ferramenta que podem auxiliar na detecção e identificação de microrganismos de forma rápida e segura. Audy et al. (1994) desenvolveram o conjunto de iniciadores X4c/X4e que apresenta especificidade para ambos os agentes causais do CBC, *X. citri* pv. *fuscans* e *X. phaseoli* pv. *phaseoli*. Toth et al. (1998) desenvolveram o conjunto de iniciadores Xf1/Xf2 que apresentam especificidade apenas para a linhagem *fuscans*. O presente trabalho demonstrou a utilização combinada desses

iniciadores com os iniciadores Am1 F/R e Am2 F/R (Boureau et al. 2013), que amplificam sequências de efetores importantes para a virulência dessas espécies.

Halfeld-Vieira et al. (2001) demonstraram a ocorrência de falsos negativos usando os iniciadores X4c/X4e em uma coleção de isolados brasileiros. Essa é uma limitação desses iniciadores, e por isso, a presença simultânea no gel dos fragmentos referentes aos genes de virulência, juntamente com o fragmento referente aos iniciadores X4c/X4e reduz os riscos de falsos positivos na detecção das bactérias causadoras de CBC em amostras (Boureau et al. 2013). No presente trabalho, foram acrescentados à reação multiplex os iniciadores específicos para a linhagem fuscans Xf1/Xf2, com objetivo de detecção e identificação, em uma única etapa, dos dois agentes causais do CBC, conferindo agilidade ao diagnóstico. Foi possível separar com clareza em gel de agarose a 1,5% os quatro fragmentos de DNA para os isolados da linhagem fuscans, contra três fragmentos para aqueles isolados pertencentes às linhagens não fuscans.

A PCR multiplex também tem sido usada para detecção de outros complexos de patógenos bacterianos como, por exemplo, aqueles envolvidos na mancha bacteriana do tomate (Araújo et al., 2012), mancha foliar e podridão negra das brássicas (Berg et al., 2006), ou ainda para diferentes patógenos relacionados às sementes do tomate (Özdemir, 2009).

Tendo em vista que a PCR multiplex não diferencia as linhagens não fuscans, a MLSA com base nos genes *housekeeping gyrB* e *rpoD* foi a ferramenta utilizada para discriminar os isolados, entre as linhagens NF1, NF2 e NF3. A MLSA é um método robusto para a diferenciação de *Xanthomonas*

sp. (Young et al., 2008), pois possui alta correlação com os agrupamentos gerados pela reassociação de DNA-DNA (Vauterin et al., 1995), AFLP (Rademaker et al., 2000) e rep-PCR (Rademaker et al., 2005) e pode, portanto, oferecer um método refinado para diferenciação de espécies. Os genes *gyrB* (Parkinson et al., 2007, Parkinson et al., 2009) e *rpoD* (Ferreira-Tonin et al., 2012) são frequentemente usados como marcadores moleculares para identificação, diferenciação e análises filogenéticas de algumas espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas*.

De acordo com a análise filogenética simultâneas dos genes *gyrB* e *rpoD* da coleção de isolados brasileiros estudada, observou-se que esta é altamente diversa, sendo composta de todas as linhagens genéticas descritas para as espécies *X. citri* pv. *fuscans* e *X. phaseoli* pv. *phaseoli*. Embora em muitos trabalhos (Young et al., 2008, Ah-You et al., 2009, Rodriguez et al., 2012, Constantin et al., 2016) um número maior de genes *housekeeping* tenha sido usado para inferir relações taxonômicas em *Xanthomonas*, e nos grupos polifiléticos como o patovar *phaseoli*, foi possível diferenciar as linhagens genéticas usando apenas os genes *rpoD* e *gyrB*. Parkinson et al. (2007), afirmam que as sequências parciais do gene *gyrB* são suficientemente distintas para a discriminação da maioria das espécies de *Xanthomonas*.

Após a discriminação dos isolados Xpp e Xcf nas quatro linhagens genéticas, foi possível observar que a linhagem *fuscans* é predominante, representando 47% da coleção (55/117). Embora haja essa predominância sobre as demais linhagens (NF1, NF2 e NF3), não é possível afirmar que esta é a linhagem prevalente nas regiões, pois as coletas não foram homogêneas entre as regiões produtoras e nem todas as regiões produtoras foram

amostradas. A prevalência dessa linhagem ocorre na África (Mkandawire et al., 2004, Opio et al., 1996), onde a doença também apresenta grande importância para o cultivo de feijoeiro. Conhecer a prevalência de uma espécie, ou linhagem genética de um patógeno em uma região é importante para a seleção apropriada de isolados a serem testados nos programas de melhoramento genético para a resistência (Mkandawire et al., 2004)

Ainda que, não seja possível concluir sobre a linhagem genética prevalente nas regiões, nota-se que a linhagem fuscans está presente em todas as regiões amostradas no trabalho. Isso talvez seja devido ao fato desta linhagem ser mais virulenta (Opio et al., 1996, Ekpo & Saettler, 1976) que as demais, conferindo maior vantagem competitiva.

Foi observada uma tendência de algumas linhagens se agruparem por região. Para a linhagem NF2, a maioria dos isolados (30) foram coletados em Santo Antônio de Goiás, e todos os isolados NF3, em Cristalina-GO. Provavelmente, esse agrupamento por região é devido à mesma origem de sementes contaminadas, uma vez que, os isolados NF3 são procedentes de uma única cultivar (BRS Esplendor), e os isolados NF2 são provenientes de apenas quatro cultivares (BRS Esplendor, BRS Executivo, BRS Estilo e BRS Embaixador). Contudo, para determinar a associação de algumas linhagens com regiões geográficas, é necessária uma amostragem mais completa e equilibrada entre regiões.

O presente trabalho também relata a ocorrência de uma nova espécie relacionada ao CBC no Brasil, *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*. As análises conjuntas das sequências dos dois genes revelaram valores de identidade entre 98,3%-100% entre os isolados em estudo e o isolado de referência da

espécie *X. cannabis* pv. *phaseoli* (Xcp). A similaridade acima de 98,3% confirma a classificação dos isolados dentro da espécie. De acordo com Young et al. (2008), valores de similaridade acima de 96% indicam classificação dentro da mesma espécie.

O primeiro relato da bactéria foi no ano de 2013 na província de Nyagatare em Ruanda na África, causando severos danos às lavouras de feijão da região, trazendo preocupação aos agricultores em relação à disseminação do novo patógeno (Aritua et al., 2015). No Brasil, os isolados de Xcp foram obtidos no ano de 2014 na safra das águas, em uma lavoura localizada no município de Água Fria de Goiás. Porém, é possível que o patógeno já esteja distribuído por todas as regiões produtoras do país e que tenha sido ao longo dos anos confundido com Xpp e Xcf, ou ainda com outros fitopatógenos, pela capacidade de induzir sintomas não típicos, como encarquilhamento das folhas, seca da ponta dos ramos e manchas brancas. Adicionalmente, o método de PCR usado com frequência para identificar as bactérias do CBC (Xpp e Xcf) não é aplicável a essa bactéria, o que pode ter levado, por muito tempo, a possíveis ocorrências de Xcp terem sido descartadas pelo PCR negativo. Sugere-se, portanto, que a PCR multiplex seja combinada ao teste de patogenicidade aplicável a esta espécie, até que se tenha um método rápido de detecção de Xcp.

Foi demonstrado que as condições climáticas são um fator limitante para a multiplicação de Xcp no feijoeiro, sendo essencial a ocorrência de altas temperaturas (30°C). Assim como a temperatura, a umidade também se torna um fator fundamental para o estabelecimento da espécie, seja limitando sua capacidade de causar doença a temperatura e umidade mais baixas, seja pela

aceleração de seu crescimento a maiores temperaturas e umidade. De acordo com Duveiller et al. (1997), a umidade contribui para a colonização e invasão do tecido foliar pela bactéria, e ainda facilita a dispersão e aumento no número de lesões.

Por fim, os resultados deste capítulo mostram que a PCR multiplex apresenta-se como uma técnica prática de detecção e identificação simultânea de Xpp e Xcf, que pode ser aplicada na diagnose de amostras vindas do campo. As análises filogenéticas dos isolados revelaram que o cretamento bacteriano comum no Brasil é causado por um complexo de pelo menos três patógenos. Deve-se ressaltar, contudo, a necessidade de coletas mais abrangentes em todas as áreas produtoras de feijão, para conclusões mais robustas sobre a prevalência das linhagens genéticas e da ocorrência e distribuição no país da nova espécie de *Xanthomonas* patogênica ao feijoeiro comum.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores utilizados neste trabalho

Iniciadores	Sequência	Referência
X4c	5'- GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG- 3'	Audy et al., 1994
X4e	5'- CGC CGG AAG CAC GAT CCT CGA AG- 3'	
Xf1	5' -ACG CAA GAC CCA TCG TCA TTC – 3'	Toth et al., 1998
Xf2	5' - ATG GCT CAA GGA AAA ACT TTC AGG -3'	
Am1F	5'-CCA TGC TGA GCA CGG TCA TT-3'	Boureau et al., 2013
Am1R	5'-CGC CTT CCA GTT GCT GAC AT-3'	
Am2F	5'-ACG AGC CCT TCC CAA ACT AGC-3'	Boureau et al., 2013
Am2R	5'-TAC CAA CAT CGT ACG CTT CCC-3'	
<i>gyrB</i> -F	5'- TGC GCG GCA AGA TCC TCA AC-3'	Mhedbi-Hajri et al., 2013
<i>gyrB</i> -R	5'- GCG TTG TCC TCG ATG AAG TC-3'	
<i>rpoD</i> -F	5'- ATG GCC AAC GAA CGT CCT GC-3'	Mhedbi-Hajri et al., 2013
<i>rpoD</i> -R	5'- AAC TTG TAA CCG CGA CGG TAT TCG-3'	
X-Gum D F7	5'- GGC CGC GAG TTC TAC ATG TTC AA3'	Adriko et al., 2014
X- GumD R7	5'-CAC GAT GAT GCG GAT ATC CAG CCA CAA-3'	

Tabela 2. Identificação, procedência, ano de coleta, cultivar de origem, identificação molecular, determinação da espécie e linhagem genética de isolados de *Xanthomonas* do feijoeiro no Brasil

Identificação	Procedência	Ano	Cultivar de Origem	PCR Multiplex			Patogenicidade (Nota ²)	Espécie	Linhagem genética
				X4c/X4e	Xf1/Xf2	Am1 e Am2	BRS Ártico		
IBSBF 1346	Brasil	1998	ni ¹	+	+	+	3	<i>X. citri. pv. fuscans</i>	Fuscans
IBSBF 253	Brasil	1975	Ni	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25304	Ponta Grossa-PR	2007	P.216 T 46	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25351	Ponta Grossa-PR	2011	Diamante Negro	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25352	Ponta Grossa-PR	2011	CNFC 10429	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25353	Ponta Grossa-PR	2011	CNFC 11985	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25354	Ponta Grossa-PR	2011	CNFC 11994	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25355	Ponta Grossa-PR	2011	BRS Supremo	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25356	Ponta Grossa-PR	2011	CNFP 11976	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48910	Ponta Grossa-PR	2016	BRS Supremo	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25308	Castro-PR	2007	IAC 81	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25357	Castro-PR	2011	Valente	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25359	Castro-PR	2011	Vereda	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25350	Araucária-PR	2011	CNFC 11959	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25347	Cândido de Abreu-RS	2010	IPR Colibri	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25348	Cândido de Abreu-RS	2010	IPR Colibri	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25346	Caralzinho-RS	2010	Criolo	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25343	Floriano Peixoto-RS	2010	Cavalinho	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25334	Angatuba-SP	2009	CNFP 11979	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48916	Ribeirão Preto-SP	2015	ni	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48917	Ribeirão Preto-SP	2015	ni	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48911	Cárceres – MT	2016	Pérola	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48919	Guaxupé-MG	1995	ni	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans

BRM 48921	Lavras-MG	1995	ni	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48920	Lavras- MG	1995	ni	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48915	Lavras- MG	2016	ni	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48918	Lavras- MG	2016	ni	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48912	Uberlândia-MG	2016	ni	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48913	Uberlândia-MG	2016	ni	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25315	Santo Antônio de Goiás	2007	CNFC 10444	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25316	Santo Antônio de Goiás	2007	Uirapuru	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25349	Santo Antônio de Goiás	2010	ni	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 32181	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Esplendor	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 25310	Anápolis-GO	2007	CVD 5070	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 27255	Anápolis-GO	2011	CNFC 0011008	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 27257	Nova Veneza-GO	2011	ni	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48922	Água Fria de Goiás	2014	BRS Estilo	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48923	Água Fria de Goiás	2014	BRS Estilo	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48924	Água Fria de Goiás	2014	BRS Estilo	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48925	Água Fria de Goiás	2014	BRS Pérola	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48926	Água Fria de Goiás	2014	BRS Ametista	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48939	Água Fria de Goiás	2014	BRS Estilo	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48940	Água Fria de Goiás	2014	BRS Estilo	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48941	Água Fria de Goiás	2014	BRS Estilo	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48927	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48928	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48929	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48930	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48931	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48932	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48933	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans

BRM 48934	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48935	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48936	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48937	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48938	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 48914	Cristalina-GO	2016	BRS Estilo	+	+	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	Fuscans
BRM 32182	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Esplendor	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32183	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Esplendor	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32185	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Esplendor	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32186	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Esplendor	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32192	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Estilo	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32193	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Estilo	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32194	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Estilo	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32196	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Estilo	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32197	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Estilo	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32198	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Embaixador	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32199	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Embaixador	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32200	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Embaixador	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32201	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Embaixador	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32202	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Embaixador	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32203	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Embaixador	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32204	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Embaixador	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32207	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Executivo	+	-	+	3	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32208	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Executivo	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32209	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Executivo	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32210	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Executivo	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32211	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Executivo	+	-	+	3	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32212	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Executivo	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2

Continuação Tabela 2

BRM 32214	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Esplendor	+	-	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32215	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Esplendor	+	-	+	3	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32216	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Esplendor	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32217	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Esplendor	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32218	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Esplendor	+	-	+	3	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32219	Santo Antônio de Goiás	2014	BRS Esplendor	+	-	+	3	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32220	Santo Antônio de Goiás	2014	Waf 75	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 32224	Santo Antônio de Goiás	2014	Waf 75	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 48906	Brasília-DF	2014	BRS Estilo	+	-	+	3	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 48898	Cárceres – MT	2016	Pérola	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF2
BRM 48899	Cristalina-GO	2016	BRS Esplendor	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF3
BRM 48900	Cristalina-GO	2016	BRS Esplendor	+	-	+	4	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF3
BRM 48901	Cristalina-GO	2016	BRS Esplendor	+	-	+	5	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF3
BRM 48902	Cristalina-GO	2016	BRS Esplendor	+	-	+	6	<i>X. c. pv. fuscans</i>	NF3
BRM 25297	Prudentópolis- PR	2007	Tijuco	+	-	+	6	<i>X. phaseoli. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25300	Ponta Grossa-PR	2007	IAPAR 81	+	-	+	4	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25301	Ponta Grossa-PR	2007	CNFC 10429	+	-	+	6	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25302	Ponta Grossa-PR	2007	Uirapuru	+	-	+	5	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25303	Ponta Grossa-PR	2007	BRS Grafite	+	-	+	4	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25305	Ponta Grossa-PR	2007	P 2635	+	-	+	5	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25306	Ponta Grossa-PR	2007	CNFC 1044	+	-	+	6	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25307	Ponta Grossa-PR	2007	IAPAR 81	+	-	+	6	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25314	Ponta Grossa-PR	2007	ni	+	-	+	6	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25321	Guarapuava-PR	2008	CHINOOK	+	-	+	6	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25322	Realeza-PR	2008	Rio Negro	+	-	+	3	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25311	Passo Fundo-RS	2007	Uirapuru	+	-	+	4	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25313	Passo Fundo-RS	2007	CNFC 0794	+	-	+	5	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1

BRM 25319	Vacaria-RS	2008	CNFC 10793	+	-	+	5	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25320	Vacaria-RS	2008	BRS Cometa	+	-	+	5	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25342	Floriano Peixoto-RS	2010	Chumbinho	+	-	+	4	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25344	São Valentim-RS	2010	Criolo	+	-	+	3	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25345	Nonai-RS	2010	Criolo	+	-	+	3	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25333	Angatuba-SP	2009	BRS Supremo	+	-	+	6	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25336	Paranapanema-SP	2009	Pérola	+	-	+	2	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25337	Buri-SP	2009	Pérola	+	-	+	4	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 48904	Lavras- MG	2016	ni	+	-	+	4	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25326	Anápolis-GO	2008	ni	+	-	+	6	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25328	Rio Verde-GO	2008	BRS Supremo	+	-	+	6	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25329	Inhumas-GO	2009	ni	+	-	+	4	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1
BRM 25331	Inhumas-GO	2009	CNFC 10729	+	-	+	3	<i>X. p. pv. phaseoli</i>	NF1

¹ não informado

² média das notas obtidas de 9 plantas inoculadas por incisão foliar com tesoura, segundo avaliação com escala diagramática de Rava et al., (1988).

Tabela 3. Caracterização dos isolados de *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*, coletados de plantas de feijoeiro comum no ano de 2014 em Água Fria de Goiás, GO

Isolado	Cultivar de Origem	PCR Multiplex ¹	HR Tomateiro	PCR <i>gumD</i>	Patogenicidade ²
BRM 48942	BRS Estilo	-	+	+	+
BRM 48943	BRS Estilo	-	+	+	+
BRM 48944	BRS Estilo	-	+	+	+
BRM 48945	BRS Estilo	-	+	+	+
BRM 48946	BRS Estilo	-	+	+	+
BRM 48947	BRS Estilo	-	+	+	+
BRM 48948	BRS Estilo	-	+	+	+
BRM 48949	BRS Estilo	-	+	+	+
BRM 48950	BRS Estilo	-	+	+	+
BRM 48951	BRS Estilo	-	+	+	+
BRM 48952	BRS Estilo	-	+	+	+
BRM 48953	BRS Pérola	-	+	+	+
BRM 48954	BRS Pérola	-	+	+	+
BRM 48955	BRS Pérola	-	+	+	+
BRM 48956	BRS Pérola	-	+	+	+
BRM 48957	BRS Pérola	-	+	+	+
BRM 48958	BRS Pérola	-	+	+	+
BRM 48959	BRS Pérola	-	+	+	+
BRM 48960	BRS Ametista	-	+	+	+
BRM 48961	BRS Pérola	-	+	+	+

¹ PCR multiplex específica com os iniciadores X4c/X4e, Xf1/Xf2, Am2 F/R e Am1 F/R

² Sintomas observados em plantas da cultivar BRS Ártico inoculadas pelo método aspersão sem ferimento e avaliadas 10 dias após a inoculação. Patogenicidade comprovada pelo reisolamento da bactéria.

Tabela 4. Relação dos tipos de sintomas observados nas plantas de feijoeiro da cultivar BRS Ártico inoculadas com isolados de *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli* sob diferentes métodos de inoculação e submetidos a duas condições ambientais diferentes

Isolados	T média 25°C; U média 60%		T média 25 °C; U 100%		
	Tesoura	Aspersão sem ferimento	Tesoura	Aspersão sem ferimento	Aspersão com ferimento
BRM 48942	- ²	Murcha ¹	Mancha branca	Mancha amarela	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48943	-	Mancha branca	Mancha amarela	-	-
BRM 48944	-	Mancha branca	Mancha amarela	Manchas brancas	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48945	-	Mancha branca	-	Mancha amarela	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48946	-	Mancha branca	-	-	-
BRM 48947	-	Encarquilhamento	Mancha branca/mancha amarela	-	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48948	-	Encarq./Mancha branca	Mancha amarela	Mancha amarela	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48949	-	Encarq./Mancha branca	Mancha amarela	Mancha amarela	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48950	Mancha branca	Mancha branca	-	-	-
BRM 48951	Mancha branca	Murcha	Mancha amarela	-	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48952	-	Mancha branca	-	-	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48953	Mancha branca	Mancha branca	Mancha amarela	-	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48954	-	Mancha branca	-	-	-
BRM 48955	-	Mancha branca	-	-	-
BRM 48956	-	Mancha branca	Mancha amarela	Mancha amarela	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48957	-	Mancha branca	-	-	-
BRM 48958	-	Encarq./Mancha branca	-	-	-
BRM 48959	-	Mancha branca	Mancha amarela	Murcha	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48960	Mancha branca	-	Mancha amarela	-	Mancha branca/mancha amarela
BRM 48961	-	Mancha branca	Mancha amarela	-	Mancha branca/mancha amarela

¹ Foram considerados apenas os sintomas dos quais foi possível reisolar a bactéria. ² (-), ausência de sintomas.

Tabela 5. Tipos de sintomas observados em plantas de feijoeiro da cultivar BRS Ártico inoculadas com os isolados de *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*, pelo método de aspersão sem fermento sob temperatura de 28-30°C e 100% de umidade

Isolados	Manchas amarelas¹	Outros tipos de sintomas¹
BRM 48942	+	Encarquilhamento/seca da ponta dos ramos
BRM 48943	+	Seca da ponta dos ramos
BRM 48944	+	Encarquilhamento
BRM 48945	+	Encarq./Seca da ponta dos ramos/mancha branca
BRM 48946	+	Encarq./Seca da ponta dos ramos
BRM 48947	+	Encarq./Seca da ponta dos ramos/mancha branca
BRM 48948	+	Encarq./Seca da ponta dos ramos
BRM 48949	+	Encarq./Seca da ponta dos ramos/mancha branca
BRM 48950	+	não identificado
BRM 48951	+	não identificado
BRM 48952	+	não identificado
BRM 48953	+	Seca da ponta dos ramos
BRM 48954	+	não identificado
BRM 48955	+	Encarquilhamento/seca da ponta dos ramos
BRM 48956	+	não identificado
BRM 48957	+	Seca da ponta dos ramos
BRM 48958	+	Encaquilhamento
BRM 48959	+	não identificado
BRM 48960	+	Encarquilhamento/seca da ponta dos ramos
BRM 48961	+	Encarq./Seca da ponta dos ramos/mancha branca

¹ Foi reisolada a bactéria para todos os isolados e sintomas encontrados.

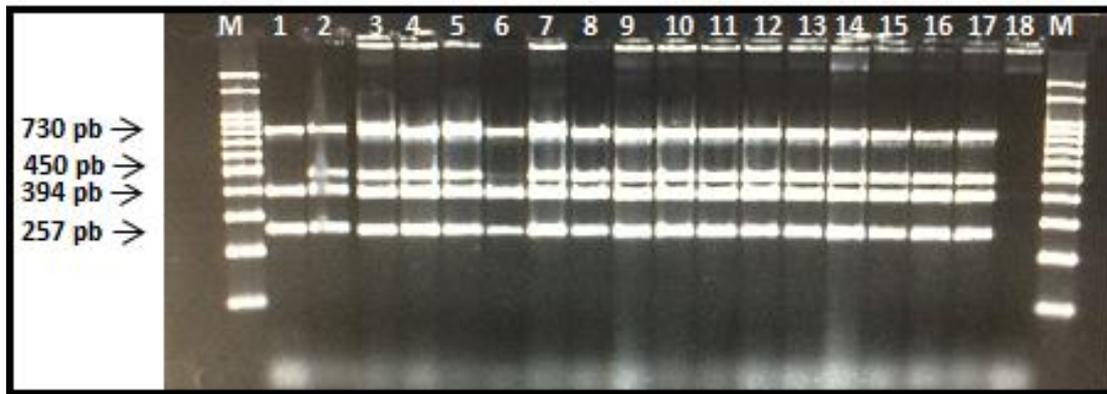


Figura 1. Produtos da PCR multiplex separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) obtidos com os isolados de *Xanthomonas* do feijoeiro. Colunas 1 e 6: *X. phaseoli* pv. *phaseoli*; Colunas 2-5 e 7-17: *X. citri* pv. *fuscans*; Coluna 18: Controle negativo (água). O tamanho dos fragmentos corresponde aos amplicons obtidos com os pares de iniciadores X4c/X4e (730 pb), X1/Xf2 (450 pb), Am2F/R (394 pb) e Am1F/R (257 pb).



Figura 2. Pigmentação produzida por isolados da linhagem genética fuscans de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (à esquerda) comparada com a uma linhagem não fuscans de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. A: Coloração das colônias após 3 dias de crescimento em meio de cultura YDC a 28 °C. B: Coloração das colônias após 5 dias de crescimento em meio de cultura YDC a 28 °C.

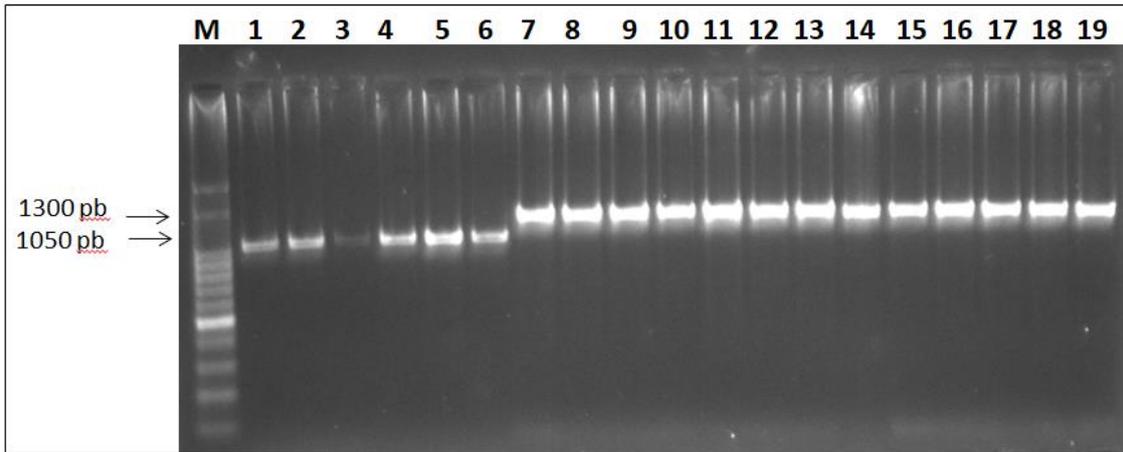


Figura 3. Produtos da amplificação parcial dos genes *housekeeping gyrB* e *rpoD* dos isolados de *Xanthomonas* do feijoeiro, separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%). M: marcador molecular de 100 pb (Ludwig®); Colunas 1 a 6: fragmentos gerados para o gene *gyrB* (1050 pb) ; Colunas 7-19: fragmentos gerados para o gene *rpoD* (1300 pb);

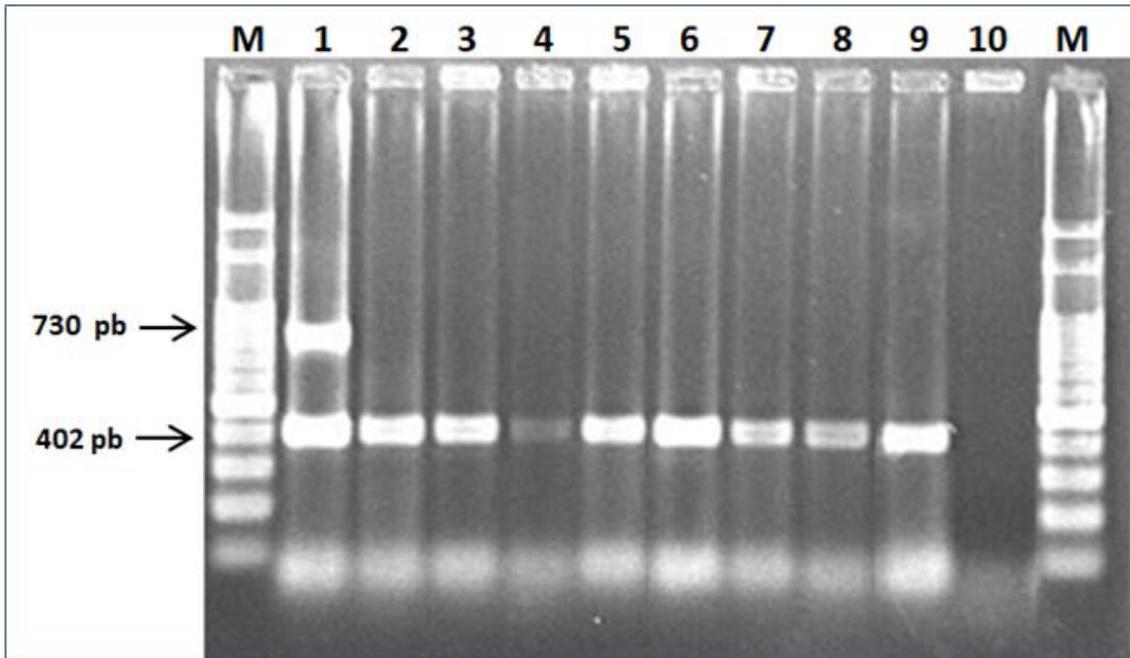


Figura 5. Produtos da PCR duplex separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) obtidos com os isolados de *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*. Colunas 1: *X. phaseoli* pv. *phaseoli*; Colunas 2 - 9: *Xanthomonas* sp; Coluna 10: branco. O tamanho dos fragmentos corresponde aos iniciadores X4c/X4e (730 pb) e X-gumD F7/R7 (402 pb).



Figura 6. Reação de hipersensibilidade induzida em tomate cv. Santa Clara, observada após 24 horas de infiltração. A: Controle positivo que corresponde a um isolado *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (BRM 48904). B: Isolado de *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli* (BRM 48956).

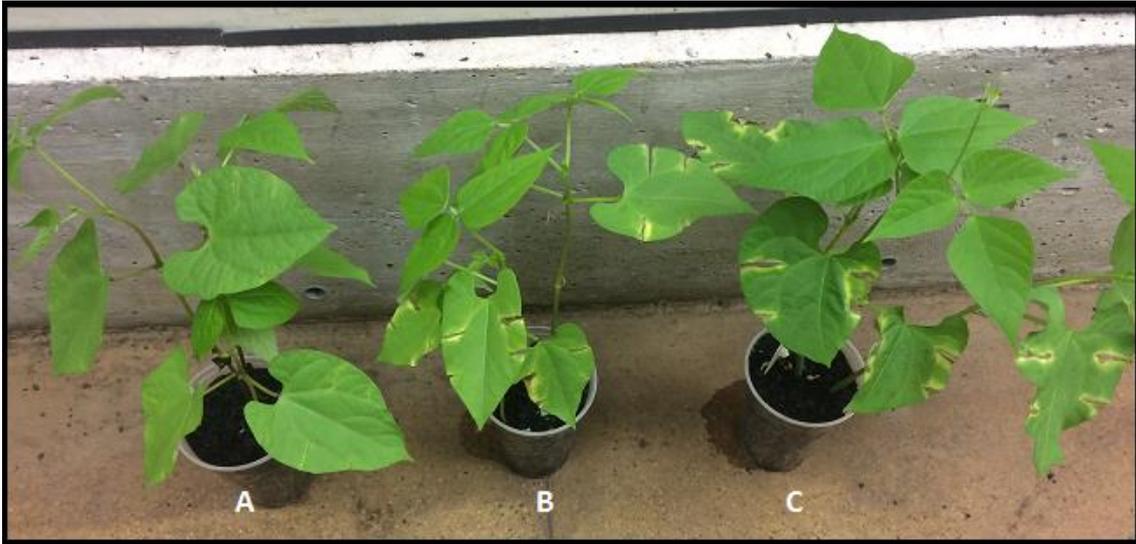


Figura 7. Sintomas observados em plantas de feijoeiro da cultivar BRS Ártico 10 dias após a inoculação via método de incisão foliar com tesoura dos isolados. A: BRM 48948 (*Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*.); B: BRM 25305 (*X. phaseoli* pv. *phaseoli*); C: BRM 25308 (*X. citri* pv. *fuscans* – Linhagem *fuscans*).

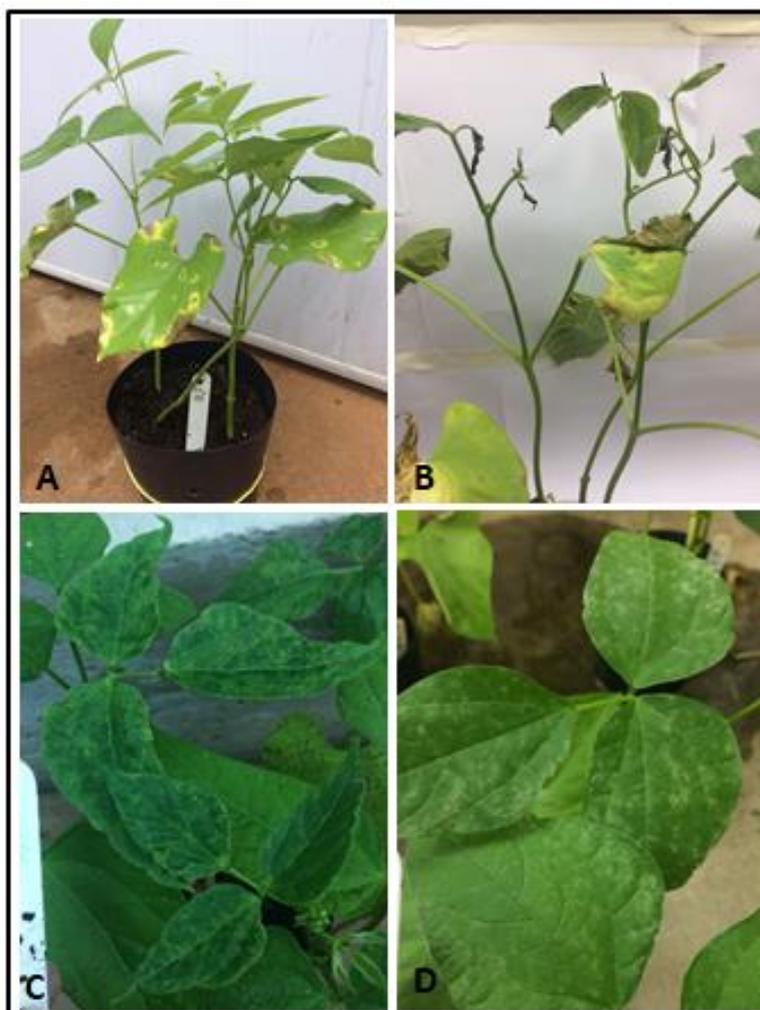


Figura 8. Sintomas observados em feijoeiro cultivar BRS Ártico após 10 dias da inoculação com isolados de *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*. A: Manchas com bordo amarelado. B: Morte do ápice dos trifólios. C: Encarquilhamento do trifólio. D: Pintas brancas espalhadas pelo limbo do trifólio.

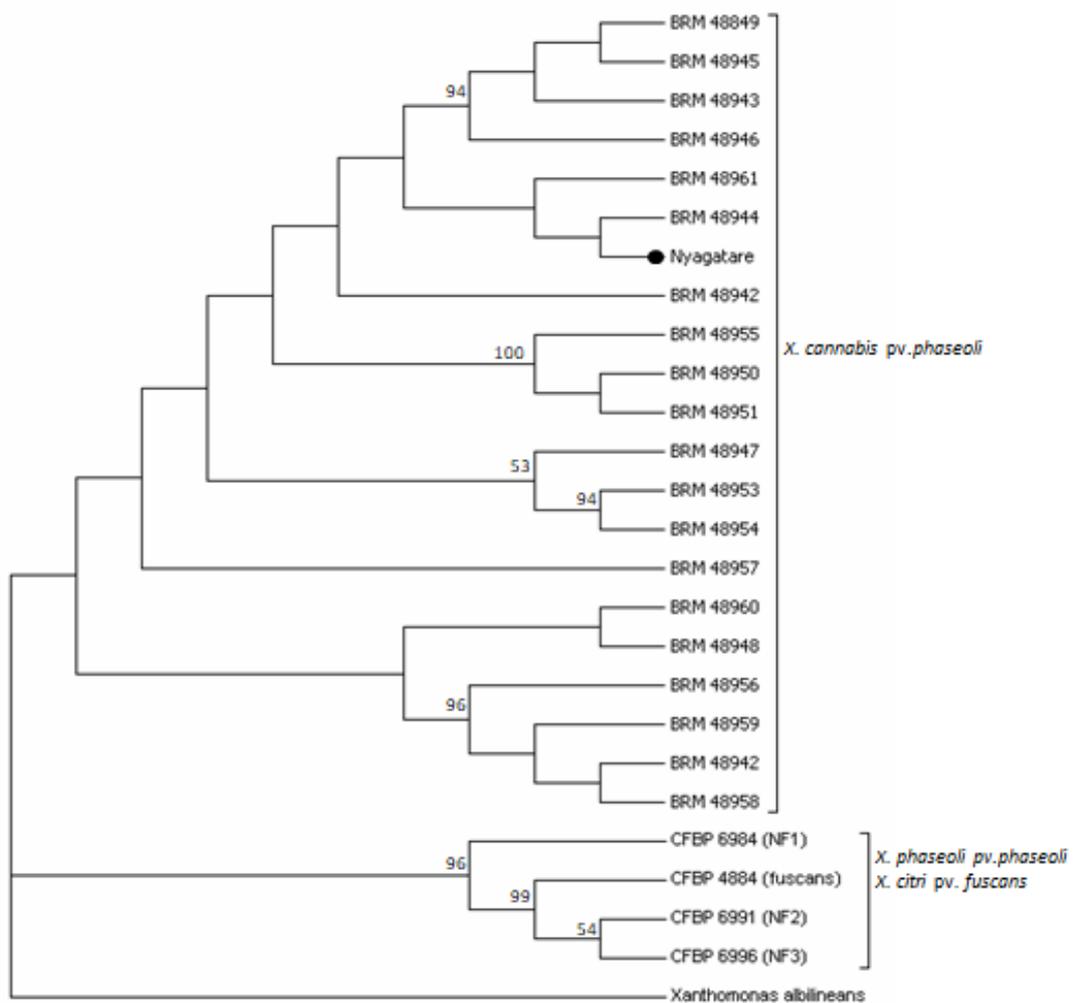


Figura 9. Árvore filogenética gerada com o método da máxima verossimilhança, a partir do concatenamento das sequências dos genes *gyrB* e *rpoD* (1.862 pb) dos isolados de *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*. A confiança nos nós foi testada pela análise de bootstrap com 1000 repetições.

Literatura Citada

- Adriko, J., Mbega, E. R., Mortensen, C. N., Wulff, E. G., Tushemereirwe, W. K., Kubiriba, J. and Lund, O. S. 2014. Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas*. Eur. J. Plant Pathol. 138: 293-306.
- Ah-You, N., Gagnevin, L., Grimont, P. A., Brisse, S. Nesme, X., Chiroleu, F., Bui Thi Ngoc, L., Jouen, E., Lefeuvre, P., Vernière, C. and Pruvosto, O. 2009. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 306-18.
- Alavi, S. M., Sanjari, S., Durand, F., Brin C, Manceau, C and Poussier, S. 2008. 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. Appl. Environ. Microbiol. 74: 3295-301.
- Araújo, E., Costa, J., Ferreira, M. A. V. and Quezado-Duval, A. 2012. Simultaneous detection and identification of the *Xanthomonas* species complex associated with tomato bacterial spot using species-specific primers and multiplex PCR. J. Appl. Microbiol. 113: 1479-90.
- Aritua, V., Musoni, A., Kato, F., Abang, M. M., Buruchara, R., Sapp, M., Harrisom, J., Studholme, D. J., and Smith, J. 2015. The draft genome sequence of *Xanthomonas* species strain Nyagatare, isolated from diseased bean in Rwanda. FEMS Microbiol. Lett. 362:4
- Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H. C., and Gilbertson, R. L. 1994. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. Phytopathology. 84:1185-92.

- Berg, T., Tesoriero, L., and Hailstones D. 2006. A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 624-30.
- Boureau, T., Kerkoud, M., Chhel, F., Hunault, G., Darrasse, A., Brin, C., Durand, K., Hajri, A., Poussier, S., Manceau, C., Lardeux, S., Saubion, S., and Jaques, M.-A. 2013. A multiplex-PCR assay for identification of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *J. Microbiol. Methods.* 92:42-50.
- Constantin, E., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghen, C., De Vos, P., and Cottyn, B. 2016. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathol.* 65:792-806.
- Dalla Pria, M., Christiano, R., Furtado, E. L., Amorim, L., and Bergamin Filho, A. 2006. Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. *Plant Pathol.* 55: 657-63.
- Denardin, N. D. Á., and Agostini, V. A. 2013. Detection and quantification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and its variant *fuscans* in common bean seeds. *J. Seed Sci.* 35: 428-34.
- Duveiller, E., Fucikovsky, L., and Rudolph, K., (eds). 1997. The bacterial diseases of wheat: concepts and methods of disease management. México, D.F.CIMMYT.
- Ekpo, E. and Saettler, A. 1976. Pathogenic variation in *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. *Plant Dis Rep* 60: 80-3.
- EPPO. 2011. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/XANTPH>. Acessado em maio de 2018.

- Ferreira-Tonin, M., Rodrigues-Neto, J., Harakava, R., and Destéfano SaL. 2012. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial rpoB gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1419-24.
- Goodwin, P. and Sopher, C. 1994. Brown pigmentation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* associated with homogentisic acid. *Can.J. Microbiol.* 40: 28-34.
- Grimault, V., Olivier, V., Rolland, M., Darrasse, A., and Jacques, M-A. 2014. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris* (bean). *International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods.* 7-021:1-20.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G, Lardeux, F. Lemaire, C., Manceau, C., Boureau, T., and Poussier, S. 2009. A «repertoire for repertoire» hypothesis: Repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One.* 4: e6632.
- Halfeld-Vieira, B. A., Souza, R. M., Figueira, and A.R., Boari, A. J. 2001. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. *Fitopatol. Bras.* 26: 4.
- He, Y., and Munkvold, G. 2012. Comparison of extraction procedures for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in common bean seed. *Plant Pathol.* 61: 837-43.
- Jacobs, J. M., Pesce, C., Lefeuvre, P., and Koebnik, R. 2015. Comparative genomics of a cannabis pathogen reveals insight into the evolution of pathogenicity in *Xanthomonas*. *Front. Plant Sci.* 6: 431.
- Jacques, M-A., Josi, K., Darrasse, A., and Samson, R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm

population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2008-15.

Jones, J., Bouzar, H., Somodi, G, Stall, R. E., Pernezny, K., El-Morsy, G., and Scott, J. W. 1998. Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. *Phytopathology.* 88: 33-8.

Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E.,and Schaad, N. W. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 755-62.

Kado, C., and Heskett, M. 1970. Selective media for isolation of agrobacterium, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology.* 60:969-76.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., and Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 28: 1647-9.

Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. 1994. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Bioinformatics.* 10: 189-91.

López, R., Asensio, C., and Gilbertson, R. L. 2006. 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: 1204-13.

Louws, F., Rademaker, J., and de Bruijn, F. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 81-125.

- Mahuku, G., Jara, C., Henriquez, M., Castellanos, G., and Cuasquer, J. 2006. Genotypic Characterization of the Common Bean Bacterial Blight Pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR and PCR–RFLP of the Ribosomal Genes. *J. Phytopathol.* 154: 35-44.
- Mkandawire, A. B., Mabagala, R. B., Guzmán, P., Gepts, P., and Gilbertson. R. L. 2004. Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology.* 94: 593-603.
- Marcelletti, S., Ferrante, P., and Scortichini, M. 2010. Multilocus sequence typing reveals relevant genetic variation and different evolutionary dynamics among strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Diversity.* 2: 1205-22.
- Meng, F. 2013. *Ralstonia solanacearum* species complex and bacterial wilt disease. *J. Bacteriol. Parasitol.* 4: e119.
- Morales, G., Moragrega, C., Montesinos, E., and Llorente, I. 2018. Effects of leaf wetness duration and temperature on infection of *Prunus* by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *PLoS ONE.* 13: e0193813.
- Moriones, E., and Navas-Castillo, J. 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res.* 71: 123-34.
- Opio, A., Allen, D. J., and Teri, J. 1996. Pathogenic variation in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, the causal agent of common bacterial blight in *Phaseolus* beans. *Plant Pathol.* 45: 1126-33.

- Özdemir, Z. 2009. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* using pure cultures. J. Plant Pathol. 495-7
- Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J., and Stead, D. 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2881-2887.
- Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J., and Stead, D. 2009. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 264-74.
- Rademaker, J., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., and de Bruijn, F. J. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 665-77.
- Rademaker, J., Louws, F., Schultz, M., Rossbach, U., Vauterin, L., and de Bruijn, F. J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. Phytopathology. 95:1098-1111.
- Rava, C., and Romeiro, R. 1990. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* quanto a patogenicidade em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. Summa Phytopathol. 16: 225-232.
- Rava, C., Zimmermann, M., Rocha, M., and Yamada, T. (Eds). 1988. Crestamento bacteriano comum. Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo. Piracicaba, SP.
- Rodríguez-R, L. M., Grajales, A., Arrieta-Ortiz, M. L., Salazar, C., Restrepo, S., and Bernal, A. 2012. Genomes-based phylogeny of the genus *Xanthomonas*. BMC Microbiol. 12: 43.

- Romeiro, R. D. S. 2005. Bactérias fitopatogênicas. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society. St. Paul, USA.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 28:494-518.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy G, Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. Syst App Microbiol 29: 690-695.
- Silva, F. C., Souza, R. D., Zacaroni, A. B., Lelis, F. M. V., and Figueira, A. D. R. 2013. Otimização da técnica de PCR para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. Summa Phytopathol. 39: 45-50.
- Tamura, K., and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 10: 512-26.

- Tebaldi, N. D., Souza, R. M., and Machado, J. C. 2007. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi-seletivo. *Fitopatol. Bras.*32: 56-8.
- Tebaldi, N. D., Peters, J., and Souza, R. M. 2010. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry, immunostaining and direct viable counting. *Trop. Plant Pathol.* 35: 213-22.
- Torres, J. P., Júnior, S., and Maringoni, A.C. 2009. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do Estado do Paraná, Brasil. *Summa Phytopathol.* 136-9.
- Toth, I., Hyman, L., Taylor, R., and Birch, P. 1998. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv. *phaseoli*. *J. Appl. Microbiol.* 85: 327-36.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of xanthomonas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 45: 472-89.
- Young, J., Park, D-C., Shearman, H., and Fargier, E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Aapp Microbiol* 31:366-77.

Capítulo 2

Perfis de virulência e diversidade de efetores tipo III em *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* e *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*

Resumo

O sistema de secreção tipo III (T3SS) é essencial para a patogenicidade em *Xanthomonas*, e funciona como uma “seringa molecular” que transporta proteínas diretamente dentro da célula da hospedeira. A deleção de um efetor pode apenas diminuir ou mesmo não alterar a virulência do patógeno, devido ao repertório de efetores secretados pelo patógeno com funções semelhantes. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade de 15 efetores T3 em isolados brasileiros de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (Xpp), *X. citri* pv. *fuscans* (Xcf) e *X. cannabis* pv. *phaseoli* (Xcp), e determinar sua relação com a virulência em cultivares de feijoeiro com níveis variados de resistência ao cretamento bacteriano comum (CBC). Foram utilizados 62 isolados representando as três espécies. Com base no repertório de efetores, determinado pela presença/ausência dos amplicons via PCR, um representante de cada grupo foi submetido ao ensaio de virulência em 15 cultivares de feijoeiro. Seis diferentes repertórios de efetores foram detectados entre os 62 isolados. Os genes *xopL*, *avrBst*, *avrXccE1* e *avrXacE1* estavam presentes em todos os isolados das espécies Xpp e Xcf, enquanto *xopX*, *avrXacE2*, *xopC*, *avrBs2* mostraram-se variáveis. Para os isolados de *X. cannabis* pv. *phaseoli*, observou-se a presença de apenas cinco T3Es. Uma relação entre linhagem genética e virulência nas diferentes cultivares, ficou evidente no ensaio. A linhagem *fuscans*, com todos os isolados testados apresentando o mesmo repertório de efetores, foi a mais virulenta, seguida da linhagem NF1 e depois a NF2. O grau de resistência varia de acordo com o genótipo analisado, sugerindo a existência de uma estrutura racial entre os isolados.

Palavras-chave: repertório de efetores, resistência genética, *Phaseolus vulgaris*

Introdução

Os patógenos foliares de plantas como *Xanthomonas* spp., colonizam as superfícies das folhas epifiticamente antes de invadirem o espaço intercelular e provocarem os sintomas característicos da doença. As aberturas naturais, tais como estômatos e hidatódios, ou ferimentos, sevem como porta de entrada do patógeno na hospedeira, que invadem e se multiplicam nos espaços intercelulares do tecido vegetal e / ou no xilema (Kay & Bonas, 2009).

Para se estabelecerem com sucesso em plantas hospedeiras, as bactérias fitopatogênicas devem aderir à superfície da hospedeira, invadir o espaço intercelular do tecido, adquirir nutrientes e neutralizar as respostas de defesa das plantas. Para que a infecção na planta seja bem sucedida, a bactéria depende de um sistema de secreção que secreta proteínas no meio extracelular ou transportam as proteínas diretamente para o citossol da célula hospedeira (Büttner & Bonas, 2010).

Vários patógenos usam uma combinação de diferentes sistemas de secreção de proteínas para garantir multiplicação bacteriana eficiente e estabelecimento da doença. *Xanthomonas* spp. possuem pelo menos seis tipos de sistema de secreção de proteínas, do tipo I ao tipo VI, que diferem significativamente na sua composição e função, e no reconhecimento de substratos de secreção (Gerlach & Hensel, 2007). O sistema de secreção tipo III (T3SS), essencial para a patogenicidade em *Xanthomonas*, é codificado pelos genes *hrp* (“hypersensitivity response and pathogenicity”), e funciona como uma “seringa molecular” que transporta Xops (*Xanthomonas* outer proteins) diretamente dentro da célula da hospedeira (Kay & Bonas, 2009). Quando dentro da célula da hospedeira, podem interferir nas respostas de

defesa da hospedeira, facilitando assim, o estabelecimento do patógeno (Büttner & He, 2009).

Os efetores T3, anteriormente designados de proteínas de avirulência (Avr), também podem induzir a imunidade da planta quando esta possui o gene de resistência (R) correspondente, responsável por desencadear a reação de hipersensibilidade (HR) que é a morte das células em torno do sítio de infecção impedindo a proliferação do patógeno. Alguns genes efetores têm um efeito pronunciado sobre a virulência somente quando presente em uma espécie bacteriana, patovar ou estirpe, que infecta uma determinada espécie ou variedade da hospedeira (White et al., 2000). Por isso, os genes associados à virulência heterogeneamente distribuídos entre as estirpes são bons candidatos para explicar a especificidade do hospedeiro (Hajri et al., 2009).

A gama de hospedeiros do complexo *Xanthomonas axonopodis*, que abrigava patovares hoje reclassificados em outras espécies como *X. citri* e *X. phaseoli*, está significativamente associada com o repertório de efetores. As estirpes filogeneticamente distintas que convergem para um hospedeiro comum apresentam efetores compartilhados (Hajri et al., 2009). O desenvolvimento da resistência genética depende do conhecimento de quais efetores estão presentes na população de patógenos, ou seja, buscar genes de resistência que reconheça os efetores conservados e presentes em todas as estirpes de um patógeno (Aritua et al., 2015).

O sequenciamento do genoma da estirpe 4834-R de *X. citri* pv. *fuscans*, um dos agentes causais do crestamento bacteriano do feijoeiro (CBC), revelou a presença de genes que codificam 30 efetores potencialmente secretados pelo sistema de secreção Tipo III (T3SS) (Darrasse et al., 2013). Segundo

Aritua et al. (2015) existe um conjunto principal de 12 efetores que estão presentes em todos os isolados sequenciados de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans*: *xopK*, *xopZ*, *xopR*, *xopV*, *xopE1*, *xopN*, *xopQ*, *xopAK*, *xopA*, *xopL*, *avrBs2* e *xopX*. Outros parecem estar limitados a apenas uma das três linhagens, por exemplo, *xopF2* é limitado a linhagem *fuscans*, *xopC2* é encontrado apenas na linhagem NF1 e *xopAI* é restrito às estirpes associadas ao feijão lablab (*Lablab purpureus*).

Apesar de sua importância para a colonização da hospedeira, a deleção de um efector pode apenas diminuir ou mesmo não alterar a virulência do patógeno, devido ao repertório de efetores secretados pelo patógeno com funções semelhantes. Por exemplo, na bactéria *X. campestris* pv. *vesicatoria* que infecta tomate e pimentão, os efetores *avrBs2*, *xopX* e *xopD* desempenham papel semelhante, agindo no desenvolvimento da lesão e crescimento na hospedeira (Kay & Bonas, 2009).

O conhecimento da virulência de um patógeno auxilia os programas de melhoramento na busca de fontes de resistência à doença. O melhoramento genético para a resistência de CBC é complexo, devido à resistência genética ser um caráter de herança oligogênica ou poligênica, como relatado por alguns autores (Coyne & Schuster, 1974; Santos et al., 2003). A ocorrência de interação diferencial entre isolados de Xpp e genótipos feijão foi relatada por alguns autores (Rodrigues et al., 1999, Trindade et al., 2015, Paiva et al., 2018) mostrando a existência de resistência vertical e horizontal para o patossistema.

A caracterização dos efetores dos patógenos causadores do CBC e suas reações diferenciais em cultivares de feijoeiro apresentam implicações nas estratégias de melhoramento para resistência à doença. Assim, o objetivo

do presente estudo foi avaliar a diversidade de efetores T3SS em uma coleção de isolados brasileiros, pertencentes às quatro linhagens genéticas das espécies *X. phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans* e determinar sua relação com níveis de virulência em diferentes cultivares de feijoeiro.

Material e Métodos

Isolados bacterianos

Foram utilizados 42 isolados neste estudo, sendo 13 isolados de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (NF1), 8 isolados de *X. citri* pv. *fuscans* (NF2) e 20 de *X. citri* pv. *fuscans* (linhagem *fuscans*). Os isolados foram selecionados com base na região geográfica de origem, ano de coleta e no grau de agressividade na cultivar BRS Ártico, estabelecido por escala de severidade de doença (Tabela 1). Foram incluídos ainda 20 isolados de *X. cannabis* pv. *phaseoli*, a fim de avaliar a relação entre as espécies com base no perfil de efetores.

Como controles no estudo de efetores foram usados dois isolados da coleção bacteriológica do Instituto Biológico de Campinas, IBSBF 1346 e IBSBF 253, pertencentes à espécie *X. citri* pv. *fuscans* (linhagem *fuscans*), e três isolados de outras espécies de *Xanthomonas* (*X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *glycines* e *X. axonopodis* pv. *manihotis*), cedidos pela Universidade Federal de Viçosa.

Construção dos iniciadores e PCR

Os genes de efetores utilizados no estudo foram selecionados com base no repertório de efetores conservados nas linhagens genéticas de

Xanthomonas do feijoeiro (Hajri et al., 2009, Aritua et al., 2015, Darrasse et al., 2013). Os iniciadores utilizados foram conforme descrição na literatura (Jaciani et al., 2012, Mokryakov et al., 2010) ou definidos com o auxílio do software online Primer3 Input (Untergasser et al., 2012), a partir das sequências nucleotídicas dos isolados 4834-R (número de acesso do *GenBank*: FO681494.1) e NCPPB 1680 (número de acesso do *GenBank*: CP020964.1). Os iniciadores otimizados possibilitam a amplificação de sequências parciais dos genes efetores (T3E), com exceção dos genes *xopX*, *xopAE*, *xopL* e *avrXccE1*, para os quais amplificam a sequência completa dos genes.

As reações de amplificação com os iniciadores foram realizadas em um volume total de 10 µL, contendo 1X de PCR Buffer, 1X de Q-Solution, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada primer, 2,5 U de taq DNA Polimerase (Qiagen®), 2 µL de lisado de células após fervura (10⁷ ufc/mL). O programa utilizado para as amplificações constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C/3 min; seguido de 35 ciclos a 94 °C/1 min, 52 °C-65 °C/1 min (dependendo do gene efector) e 72 °C/1 min; e um ciclo de extensão final a 72 °C/10 min. A temperatura de anelamento de cada iniciador está descrita na Tabela 2.

Os produtos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão TBE 1X, corado com gel Red 2X, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em sistema digital de fotodocumentação. A genotipagem da coleção de isolados foi realizada de acordo com a presença ou ausência do fragmento de tamanho esperado para cada gene T3E.

Virulência em cultivares de feijoeiro

De acordo com os resultados obtidos por meio da genotipagem (presença/ ausência de determinado efetor), os isolados foram agrupados com base no repertório de efetores encontrados, e um representante de cada grupo foi submetido ao ensaio de virulência em diferentes cultivares do feijoeiro. Foram selecionadas 15 cultivares de feijoeiro que apresentam níveis diferentes de resistência ao CBC. As plantas utilizadas foram cultivadas em casa de vegetação (temperatura média 25 °C e UR 60 %) em copos descartáveis de 500 mL contendo substrato Plantmax®. Doze dias após a semeadura, a suspensão bacteriana (10^7 ufc/mL) preparada para cada isolado foi imediatamente inoculada pelo método de incisão das folhas primárias (Rava et al., 1988), no qual foram realizados dois cortes paralelos e perpendiculares à nervura principal nos dois lados do limbo foliar de cada folha com a tesoura previamente mergulhada na suspensão bacteriana.

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado com três repetições, nos quais um copo com três plantas constituíram uma repetição. As plantas foram avaliadas aos 5, 8 e 11 dias após a inoculação, tomando-se como base a escala de notas definida por Rava et al. (1988) variando de 0 a 6.

Análises estatísticas

Para a análise de diversidade de efetores, a matriz de presença / ausência de genes T3E gerada para os 61 isolados de *Xanthomonas* patogênicas ao feijoeiro, foi construído um dendrograma usando distâncias de Jaccard e o método UPGMA. A análise de bootstrap foi realizada com 1.000

repetições para avaliar a robustez do dendrograma usando-se o software Darwin 5.0 (Perrier & Jaquemond-Collet, 2005).

Para o ensaio de virulência, o valor da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi submetido à análise de variância e a média comparada pelo teste de Scott-Knott (5%) pelo software Sisvar (Ferreira, 2011). Para melhor representação, as curvas de progresso da doença foram elaboradas por meio da representação cartesiana dos valores da severidade em função do tempo, com o software Microsoft Excel 2010[®].

Resultados

Repertório de efetores (T3E)

O repertório de efetores (T3E) obtidos tanto para Xpp quanto para Xcf mostrou-se mais diverso dentro das linhagens genéticas não fuscans (NF). De acordo com o dendrograma construído com base na matriz de presença/ausência de T3Es da coleção, observou-se a formação de seis grupos (Figura 1): cinco grupos dentro das linhagens não fuscans (NF1 e NF2), e apenas 1 grupo dentro da linhagem fuscans. Nenhum isolado da linhagem NF3 estava incluído nessa coleção e dentre os cinco grupos formados para as linhagens não fuscans, um grupo apresentou somente isolados NF1, e outros dois grupos apresentaram só isolados NF2, enquanto os outros dois compartilharam isolados das duas linhagens.

Do total de 15 genes efetores usados no estudo, quatro genes não foram detectados por PCR na coleção analisada, são esses: os genes, *xopD*, *avrXccA2*, *avrBs3* e *avrXacE2*. Contudo, a reação de amplificação foi positiva

para as outras espécies de *Xanthomonas* usadas como controle. Os genes *xopD* e *avrXccA2* estão presentes em *X. axonopodis* pv. *manihotis*, e os genes *avrBs3* e *avrXacE3* estão presentes em *X. axonopodis* pv. *glycines*. Ao contrário destes genes, outros quatro foram detectados em todos isolados, tanto Xcf quanto Xpp, e são esses os genes *xopL*, *avrBst*, *avrXccE1* e *avrXacE1*.

Dentre os 15 genes efetores selecionados, apenas cinco estão presentes na espécie *X. cannabidis* pv. *phaseoli*, são eles, *avrBst*, *xopL*, *xopX*, *avrXacE1* e *avrXccB*, e nenhum deles é conservado entre os isolados. A distribuição dos efetores dos isolados das espécies *X. phaseoli* pv. *phaseoli*, *X. citri* pv. *fuscans* e *X. cannabidis* pv. *phaseoli* está listada nas Figuras 2 e 3.

Virulência dos isolados em genótipos de feijoeiro

Os seis isolados selecionados com base no repertório de efetores, representando cada um dos seis haplótipos (Figura 1), quando inoculados em 15 genótipos de feijoeiro comum mostraram virulência variada. A análise de variância foi significativa para as seguintes fontes de variação: isolados, genótipos e a interação isolado*genótipos. Isso indica que houve diferença entre os níveis de virulência dos isolados e que esta reação não foi coincidente em todas as cultivares avaliadas (Tabela 3).

O isolado representante da linhagem *fuscans* (isolado BRM 25304) apresentou-se como o mais virulento, enquanto os representantes da linhagem NF2 foram menos virulentos (BRM 32202, BRM 48898 e BRM 32185) (Figura 3). Na análise da curva de progresso da doença observou-se a interação cruzada entre isolados e cultivares, como verificado para o isolado BRM 32185

que apresentou elevada virulência para as cultivares BRS Embaixador, IAC Formoso e BRS Ártico. Ao mesmo tempo, demonstrou ausência de virulência para as cultivares BRS Notável, Pérola, BRS Campeiro, BRS Pontal e IPR Campos Gerais. Apenas a cultivar BRS Notável apresentou reação de resistência ao isolado mais virulento (BRM 25304), quando avaliada 8 dias após a inoculação. Dentre os genótipos que mostraram reação moderada de resistência, as cultivares Pérola, IPR Campos Gerais e BRS Campeiro mostraram sintomas apenas para os isolados da linhagem NF1 e fuscans aos 8 dias. O genótipo CNFP 10120 apresentou-se suscetível apenas para a linhagem fuscans, e resistente para as demais linhagens (Figura 5).

Discussão

Neste estudo foi investigada a presença de 15 genes efetores (T3E) comumente encontrados no gênero *Xanthomonas*, nas espécies *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*, *X. citri* pv. *fuscans* e *X. cannabis* pv. *phaseoli*. Este é o primeiro estudo de diversidade de genes efetores em uma coleção composta exclusivamente por isolados brasileiros associados ao crestamento bacteriano comum do feijoeiro.

Os genes *xopL*, *avrBst*, *avrXccE1* e *avrXacE1* estão presentes em todos os isolados das espécies Xpp e Xcf, mostrando que são efetores conservados. De acordo com Alavi et al. (2008) o gene *avrBst* conservado em todos os isolados pertencentes a Xpp e Xcf, e deve desempenhar um papel importante na patogenicidade das espécies. Outros efetores (*xopX*, *avrXacE2*, *xopC*, *avrBs2*) aparecem como variáveis dentro das espécies, indicando que podem estar

envolvidos na diferença de virulência dos isolados. É descrito que para *Xanthomonas*, o gene *avrXacE1* suprime o processo de necrose no sítio de infecção permitindo o crescimento bacteriano e assegurando a colonização do patógeno (Dunger et al., 2012). Isolados mutantes nos genes *avrBs2* e *xopX*, mostram alteração na “fitness” e patogenicidade de patovares de *X. axonopodis* (Hajri et al., 2009).

O dendrograma construído com base na matriz de presença / ausência de T3Es, mostrou que o haplótipo que representa os isolados pertencentes à linhagem fuscans é o predominante na coleção e possui repertório de efetores idênticos, enquanto que para as demais linhagens genéticas (NF1 e NF2) houve variabilidade na presença de efetores. O repertório de efetores da linhagem fuscans, além de ser o predominante na coleção, também é o mais virulento e o mais antigo, visto que está presente em dois isolados dos anos de 1975 e 1998.

Quando analisado o repertório de efetores para os isolados de *X. cannabis* pv. *phaseoli*, observou-se que cinco T3Es foram encontrados, indicando a necessidade de identificação de novos efetores para esta espécie. De acordo com Aritua et al. (2015) o genoma da estirpe Nyagatare (*X. cannabis* pv. *phaseoli*) codifica um sistema de secreção tipo III aparentemente completo, mas possui homólogos para apenas três efetores conhecidos (*avrBs2*, *xopF1* e *avrXv4*). Uma prospecção de genes candidatos no genoma dessa estirpe poderá ser objeto de estudos futuros.

Outra patovar pertencente à mesma espécie, *Xanthomonas cannabis* pv. *cannabis*, não possui um sistema de secreção tipo III, não demonstrando a habilidade de secretar proteínas T3E (Jacobs et al., 2015). Os autores

levantam a hipótese de que os T3Es podem ter sido adquiridos por *X. cannabis* pv. *phaseoli* e não perdidos por *X. cannabis* pv. *cannabis*, uma vez que, a estirpe Nyagatare possui T3Es centrais localizados em uma ilha de patogenicidade flanqueada por elementos transponíveis. É possível que em *X. cannabis* pv. *phaseoli*, outras proteínas, além de poucas proteínas efetores T3, também estejam envolvidas na indução de sintomas no feijoeiro comum e HR em planta não hospedeira. Assim como ocorre em outras espécies de *Xanthomonas* que não possuem um sistema de secreção tipo III, como *Xanthomonas albilineans* (Pieretti et al., 2009) e *Xanthomonas sachari* (Studholme et al., 2011).

A resistência do feijoeiro ao CBC é geneticamente complexa, sendo relatada por diversos autores como poligênica (Coyne & Schuster, 1974, Coyne & Schuster, 1983, Kelly et al., 2003, Manzanera et al., 2006). Neste estudo foi observada variabilidade de virulência entre as linhagens genéticas. A linhagem fuscans, representada pelo isolado BRM 25304 foi a mais virulenta, seguida da linhagem NF1 e depois a NF2. A maior virulência da linhagem fuscans sobre as demais linhagens já foi descrita em outros trabalhos (Ekpo & Saettler, 1976, Opio et al., 1996). No capítulo anterior foi demonstrado que a linhagem fuscans é predominante na coleção e presente em todos estados amostrados neste trabalho. Essa predominância pode ser relacionada ao fato de a linhagem ser mais virulenta, conferindo maior vantagem competitiva e melhor adaptação às cultivares plantadas no Brasil.

A variabilidade na virulência de isolados de Xpp e Xcf foi descrita em alguns estudos (Halfeld-Vieira & Souza, 2000, Mkandawire et al., 2004, López et al., 2006, Fourie e Herselman, 2011). No presente ensaio conduzido com 15

cultivares de feijoeiro ficou evidente que as linhagens genéticas apresentam diferentes níveis de virulência. A análise de variância realizada confirmou que existe diferença entre os isolados e que a interação isolado*genótipo foi significativa, confirmando que o grau de resistência varia de acordo com o genótipo analisado. Para os genótipos considerados resistentes (Pérola, BRS Pontal, IPR Campos Gerais, BRS Campeiro e BRS Notável), a variabilidade em virulência entre as linhagens genéticas que possuem perfis de efetores distintos, torna-se mais evidente. Nas cultivares Pérola e BRS Campeiro, houve variação na severidade dos sintomas induzido pelos isolados muito virulentos (fuscans e NF1) e os menos virulentos (NF2). A interação cruzada entre isolados e cultivares resistentes neste estudo, apoia a existência de uma estrutura racial entre os isolados, que deve ser comprovada posteriormente, abrangendo o número de genótipos e isolado das linhagens genéticas desse patógeno. De acordo com Mutlu et al. (2008), para a identificação de raças é requerido um grande número de isolados de uma coleção diversificada.

Raças dos patógenos foram sugeridas baseadas nas reações em linhagens de feijão tepari (*P. acutifolius*) (Zaiter et al., 1989, Opio et al, 1996, Fourie e Herselman, 2011). Em trabalho conduzido na África, Opio et al. (1996), não detectaram uma interação específica em genótipos de feijoeiro comum inoculados com diferentes isolados de *X. campestris* pv. *phaseoli*. Entretanto, quando esses isolados foram inoculados em diferentes genótipos de feijão tepari, ocorreu interação diferencial com a identificação de 8 raças do patógeno. O contrário foi relatado por Maringoni (1998), que verificou a existência de interação entre isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *phaseoli*

e cultivares de feijoeiro comum, separando os isolados em três classes de virulência.

Por fim, a caracterização do repertório de T3E das linhagens genéticas realizada no presente trabalho fornece uma indicação sobre a diferença na virulência dessas linhagens. Embora, não seja possível identificar raças, é evidente que existe uma diferença na virulência entre elas e que esta virulência pode estar relacionada ao perfil de efetores. Na espécie *X. cannabis* pv. *phaseoli* o repertório de efetores tipo III não explicam sua patogenicidade. Portanto, é importante em estudos futuros, elucidar os repertórios de outros determinantes da patogenicidade para as três espécies (*Xpp*, *Xcf* e *Xcp*), principalmente para aqueles genes envolvidos na adesão, sistema de secreção tipo II e IV, formação de biofilme e *quorum sensing*. Deve-se ainda, aprofundar os estudos relacionados à virulência das linhagens genéticas, abrangendo o número de isolados inoculados para cada linhagem, a fim de melhor elucidar a possível ocorrência de raças dos patógenos.

Tabela 1. Designação e espécie dos isolados causadores do crestamento bacteriano do feijoeiro, origem geográfica, ano de isolamento e patogenicidade na cultivar BRS Ártico

Identificação	Espécie (linhagem genética)	Origem	Ano	Patogenicidade (Nota ¹) BRS Ártico
IBSBF 1346 ²	<i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Brasil	1998	3
IBSBF 253 ²	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Brasil	1975	6
BRM 25310	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Anápolis-GO	2007	4
BRM 25315	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Santo Antônio de Goiás	2007	4
BRM 25316	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Santo Antônio de Goiás	2007	6
BRM 25334	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Angatuba-SP	2009	4
BRM 25343	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Florianópolis-RS	2010	4
BRM 25347	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Cândido de Abreu-RS	2010	5
BRM 25348	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Cândido de Abreu-RS	2010	6
BRM 25349	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Santo Antônio de Goiás	2010	4
BRM 25353	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Ponta Grossa-PR	2011	6
BRM 25357	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Castro-PR	2011	4
BRM 25359	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Castro-PR	2011	4
BRM 27255	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Anápolis-GO	2011	6
BRM 25308	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Castro-PR	2007	6
BRM 48913	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Uberlândia – MG	2016	6
BRM 48914	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Cristalina-GO	2016	6
BRM 48915	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Lavras-MG	2016	4
BRM 48922	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Água Fria de Goiás	2014	6
BRM 48925	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Água Fria de Goiás	2014	5
BRM 48927	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Brasília-DF	2014	5
BRM 48935	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (Fuscans)	Brasília-DF	2014	4
BRM 32185	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (NF2)	Santo Antônio de Goiás	2014	5
BRM 32187	<i>X. p.</i> pv. <i>phaseoli</i> (NF2)	Santo Antônio de Goiás	2014	5
BRM 32202	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (NF2)	Santo Antônio de Goiás	2014	5
BRM 32209	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (NF2)	Santo Antônio de Goiás	2014	4
BRM 32211	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (NF2)	Santo Antônio de Goiás	2014	3
BRM 32217	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (NF2)	Santo Antônio de Goiás	2014	4
BRM 48898	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (NF2)	Cárceres – MT	2016	4
BRM 48906	<i>X. c.</i> pv. <i>fuscans</i> (NF2)	Brasília-DF	2014	3
BRM 25297	<i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> (NF1)	Prudentópolis- PR	2007	6
BRM 25300	<i>X. p.</i> pv. <i>phaseoli</i> (NF1)	Ponta Grossa-PR	2007	4
BRM 25302	<i>X. p.</i> pv. <i>phaseoli</i> (NF1)	Ponta Grossa-PR	2007	5
BRM 25305	<i>X. p.</i> pv. <i>phaseoli</i> (NF1)	Ponta Grossa-PR	2007	5
BRM 25313	<i>X. p.</i> pv. <i>phaseoli</i> (NF1)	Passo Fundo-RS	2007	5
BRM 25320	<i>X. p.</i> pv. <i>phaseoli</i> (NF1)	Vacaria-RS	2008	5
BRM 25326	<i>X. p.</i> pv. <i>phaseoli</i> (NF1)	Anápolis-GO	2008	6
BRM 25329	<i>X. p.</i> pv. <i>phaseoli</i> (NF1)	Inhumas-GO	2009	4

BRM 25331	<i>X. p. pv. phaseoli</i> (NF1)	Inhumas-GO	2009	3
BRM 25333	<i>X. p. pv. phaseoli</i> (NF1)	Angatuba-SP	2009	6
BRM 25336	<i>X. p. pv. phaseoli</i> (NF1)	Paranapanema-SP	2009	2
BRM 25342	<i>X. p. pv. phaseoli</i> (NF1)	Floriano Peixoto-RS	2010	4
BRM 25345	<i>X. p. pv. phaseoli</i> (NF1)	Nonai-RS	2010	3
Xan 1 ²	<i>X. campestris pv. campestris</i>	cedido por UFV	2013	-
Xan 2 ³	<i>X. axonopodis pv. glycines</i>	cedido por UFV	2013	-
Xan 3 ³	<i>X. axonopodis pv. manihotis</i>	cedido por UFV	2013	-

¹ Severidade média obtida pela inoculação dos isolados em BRS Ártico pelo método da tesoura (Rava, 1988)

² Isolados adquiridos da coleção de fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo;

³ Isolados adquiridos da coleção de fitobactérias do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Viçosa;

Tabela 2. Sequências de iniciadores dos genes efetores tipo III (ET3), com respectivos tamanhos de fragmento esperado e temperatura de anelamento (T. a. °C)

Gene efector	Primer	Sequência	Tamanho de fragmento (pb)	T. a. °C	Referência
<i>xopC</i>	XopC-F	GAGGTTATCGGCACATTAGGTT	852	65	Mokryakova et al., 2009
	XopC-R	CCGTTCTCAATCCAAGCGTC			
<i>xopD</i>	XopD-F	CCGACTCGCAGGTAGTGACCAT	316	57	Mokryakova et al., 2009
	XopD-R	TCGCCGCAGGAATAACCGTC			
<i>avrBs2</i>	avrBs2-F	CCGCTACCTAAGCAGAAGGA	1400	56	Jaciani et al., 2012
	avrBs2-R	CAGGACGGTTACGCCAGTA			
<i>avrXacE1</i>	avrXacE1-F	TGAACGATAGGCAGCTGTTC	1300	57	Este trabalho
	avrXacE1-R	GGAGAGCGACATGGGACTAT			
<i>avrXacE2</i>	avrXacE2-F	CCGCTACCTAAGCAGAAGGA	1400	56	Jaciani et al., 2012
	avrXacE2-R	CAGGACGGTTACGCCAGTA			
<i>avrXccA2</i>	avrXccA2-F	AACGCTATGTGCCGCTCAA	405	55	Mokryakova et al., 2009
	avrXccA2-R	CGCCCTGAATACTAACCTCAT			
<i>xopL</i>	Am1-F	CCATGCTGAGCACGGTCATT	257	60	Boureau et al., 2013
	AM1-R	CGCCTTCCAGTTGCTGACAT			
<i>avrBst</i>	AM2-F	ACGAGCCCTTCCCAAAGTAGC	393	60	Boureau et al., 2013
	AM2-R	TACCAACATCGTACGCTTCCC			
<i>avrXccB</i>	avrXccB-F	GTCATCGTTATCCGCCATC	192	65	Mokryakova et al., 2009

	avrXccB-R	CGTGGCAAGGTGTCCGTCT			
<i>avrXccE1</i>	avrXccE1-F	TACAGCCGCACGAAGTTCAG	193	52	Jaciani et al., 2012
	avrXccE1-R	GACATTGCCTCGTCCAAGGT			
<i>xopE2</i>	XopE2-F	ACGGTTGACGTTTCGATGTG	246	50	Este trabalho
	XopE2-R	ACCCTGCGGATTCTGTGAGT			
<i>xopAE</i>	XopAE-F	CAGGGCTTGCTGAGTCCTCT	1941	57	Este trabalho
	XopAE-R	TTCTGCCATCGGTAGGCTTT			
<i>xopX</i>	XopX-F	AGTTGGCATTGGCATTGTTG	250	55	Este trabalho
	XopX-R	TTGTCTGCGAAGGTCTTGGA			
<i>avrBs3</i>	avrBs3-F	CAATGCACGAGGGAGATCAG	250	57	Este trabalho
	avrBs3-R	TCATCTTGTTCCCGCATCAC			
<i>avrXacE3</i>	avrXacE3-F	AAATGATCAGCCGCTTGG	1500	50	Jaciani et al., 2012
	avrXacE3-R	TCCATCGTCACCAACTCAAG			

Tabela 3. Análise de variância da reação de severidade de quinze genótipos de feijoeiro comum aos dois isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* e quatro isolados de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*

FV	GL	SQ	QM	F
Isolado	5	4048,9	809,7	277,6*
Genótipo	14	5519,2	394,2	135,1*
Isolado*Genótipo	70	2823,5	40,3	13,8*
Erro	180	525,0	2,91	
Total corrigido	269	12916,8		
CV (%) =	10,94			
Média geral:	15,61			

*significativo a 5 % de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

Tabela 4. Severidade da doença (crestamento bacteriano comum) obtida por meio do cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de cada isolado de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* e *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* inoculado em 15 genótipos de feijoeiro comum

Cultivar	Isolados					
	BRM 25304	BRM 25305	BRM 25302	BRM 48898	BRM 32202	BRM 32185
BRS Notável	12,8 c ¹	11,1 c	10,6 c	4,6 b	6,0 b	1,6 a
IPR Campos Gerais	22,6 e	14,8 c	18,0 d	3,3 b	5,0 b	0,0 a
Pérola	24,0 c	19,1 b	18,0 b	3,6 a	3,3 a	0,8 a
BRS Campeiro	24,6 c	19,0 b	18,0 b	5,0 a	4,5 a	2,1 a
BRS Pontal	24,6 f	15,3 d	18,6 e	9,1 c	6,0 b	3,0 a
BRS Executivo	15,0 b	14,6 b	13,6 b	10,5 a	13,6 b	14,0 b
CNFP 10120	21,1 c	14,0 b	13,3 b	11,0 a	10,6 a	12,9 b
BRS Esteio	17,0 b	21,3 c	15,3 b	10,3 a	11,1 a	10,3 a
BRS Esplendor	22,6 c	14,6 b	13,3 a	15,0 b	17,3 b	12,1 a
BRS Estilo	21,3 c	18,3 b	18,0 b	12,0 a	13,3 a	12,6 a
IAC Alvorada	23,3 c	19,0 b	17,0 a	13,6 a	14,6 a	15,8 a
IAC Formoso	24,0 c	23,6 b	20,0 a	17,3 a	22,0 b	19,3 a
BRS Embaixador	24,6 b	20,3 a	21,0 a	21,0 a	22,3 b	19,0 a
BRS Ártico	27,3 c	22,6 b	23,3 b	22,3 b	22,6 b	18,0 a
BRS Radiante	25,3 b	23,3 b	21,3 a	22,0 a	24,3 b	24,3 b

¹ Teste de medias (Scott-Knott) a 5% de probabilidade, as médias de mesma letra na linha não diferem estatisticamente.

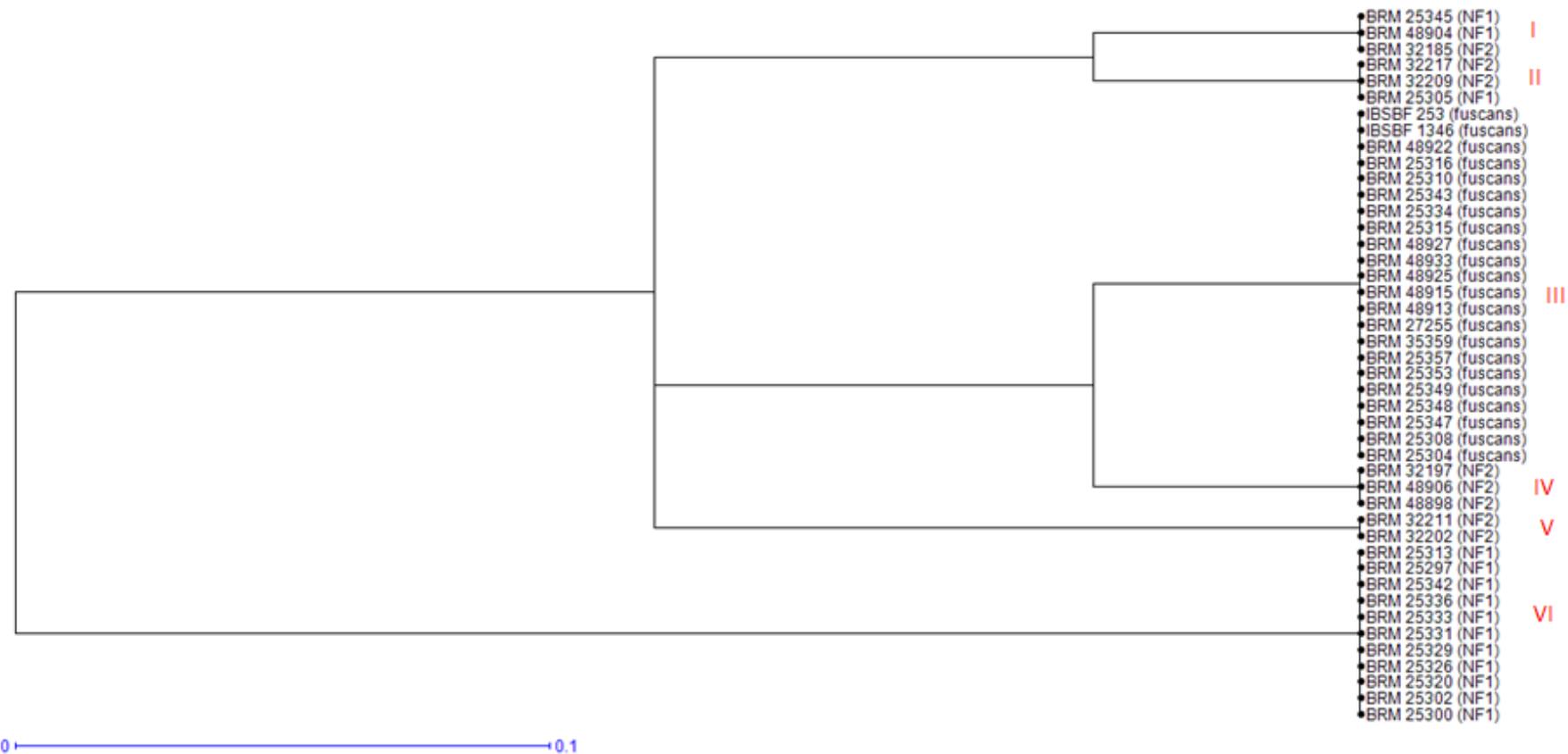


Figura 1. Dendrograma gerado por meio do coeficiente de Jaccard para o repertório de genes efetores tipo III entre os isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*.

Isolados / linhagem	Haplótipo	Genes efetores tipo III														
		<i>xopL</i>	<i>avrBst</i>	<i>xopC</i>	<i>xopD</i>	<i>avrBs2</i>	<i>avrXacE1</i>	<i>avrXacE2</i>	<i>avrXccA2</i>	<i>avrXccb</i>	<i>avrXccE1</i>	<i>xopE2</i>	<i>xopAE</i>	<i>xopX</i>	<i>avrBs3</i>	<i>avrXacE3</i>
BRM 25300 (NF1)	I															
BRM 25302 (NF1)	I															
BRM 25320 (NF1)	I															
BRM 25326 (NF1)	I															
BRM 25329 (NF1)	I															
BRM 25331 (NF1)	I															
BRM 25333 (NF1)	I															
BRM 25336 (NF1)	I															
BRM 25342 (NF1)	I															
BRM 25297 (NF1)	I															
BRM 25313 (NF1)	I															
BRM 25305 (NF1)	II															
BRM 32209 (NF2)	II															
BRM 32217 (NF2)	II															
BRM 32185 (NF2)	III															
BRM 48904 (NF1)	III															
BRM 25345 (NF1)	III															

BRM 32202 (NF2)	IV															
BRM 32211 (NF2)	IV															
BRM 48898 (NF2)	V															
BRM 48906 (NF2)	V															
BRM 32197 (NF2)	V															
BRM 25304 (fuscans)	VI															
BRM 25308 (fuscans)	VI															
BRM 25347 (fuscans)	VI															
BRM 25348 (fuscans)	VI															
BRM 25349 (fuscans)	VI															
BRM 25353 (fuscans)	VI															
BRM 25357 (fuscans)	VI															
BRM 35359 (fuscans)	VI															
BRM 27255 (fuscans)	VI															
BRM 48913 (fuscans)	VI															
BRM 48915 (fuscans)	VI															
BRM 48925 (fuscans)	VI															
BRM 48933 (fuscans)	VI															
BRM 48927 (fuscans)	VI															
BRM 25315 (fuscans)	VI															
BRM 25334 (fuscans)	VI															
BRM 25343 (fuscans)	VI															
BRM 25310 (fuscans)	VI															
BRM 25316 (fuscans)	VI															
BRM 48922 (fuscans)	VI															
IBSBF 1346 (fuscans)	VI															
IBSBF 253 (fuscans)	VI															

Xan1																	
Xan2																	
Xan3																	

Figura 2. Distribuição dos efetores (T3E) entre as espécies *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*. Retângulos azuis representam a presença do gene correspondente, e retângulos brancos representam a ausência do gene.

Isolados	Genes efetores tipo III														
	<i>xopL</i>	<i>avrBst</i>	<i>xopC</i>	<i>xopD</i>	<i>avrBs2</i>	<i>avrXacE1</i>	<i>avrXacE2</i>	<i>avrXccA2</i>	<i>avrXccb</i>	<i>avrXccE1</i>	<i>xopE2</i>	<i>xopAE</i>	<i>xopX</i>	<i>avrBs3</i>	<i>avrXacE3</i>
BRM 25300 (NF1)															
BRM 25305 (NF1)															
BRM 32185 (NF2)															
BRM 32202 (NF2)															
BRM 48898 (NF2)															
BRM 25304 (fuscans)															
BRM 48942															
BRM 48943															
BRM 48944															
BRM 48945															
BRM 48946															
BRM 48947															
BRM 48948															
BRM 48949															
BRM 48950															
BRM 48951															
BRM 48952															
BRM 48953															
BRM 48954															

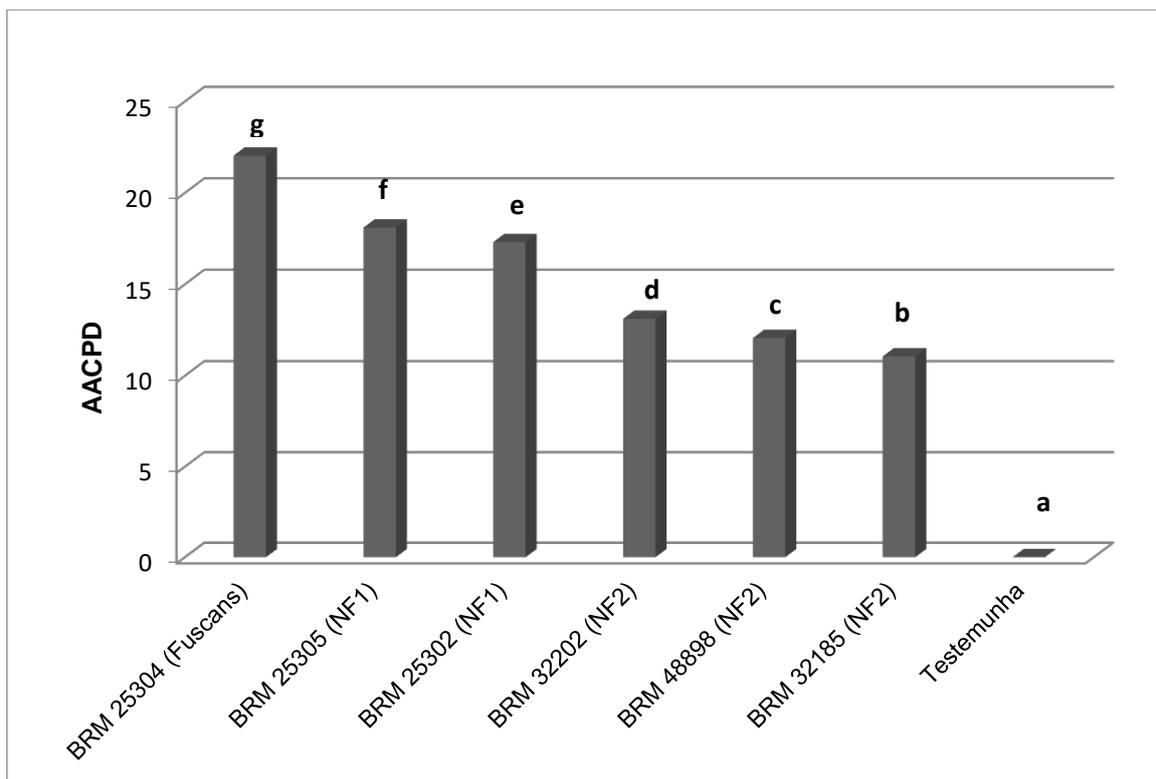


Figura 4. Média geral da severidade dos sintomas causados por dois isolados de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (NF1) e quatro de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (NF2 e fuscans) quando inoculados em 15 genótipos de feijoeiro comum. Para a testemunha o inóculo foi substituído por água estéril. Letras minúsculas nas colunas corresponde a média geral da severidade obtida para cada isolado pelo teste Scott-Knott 5 %.

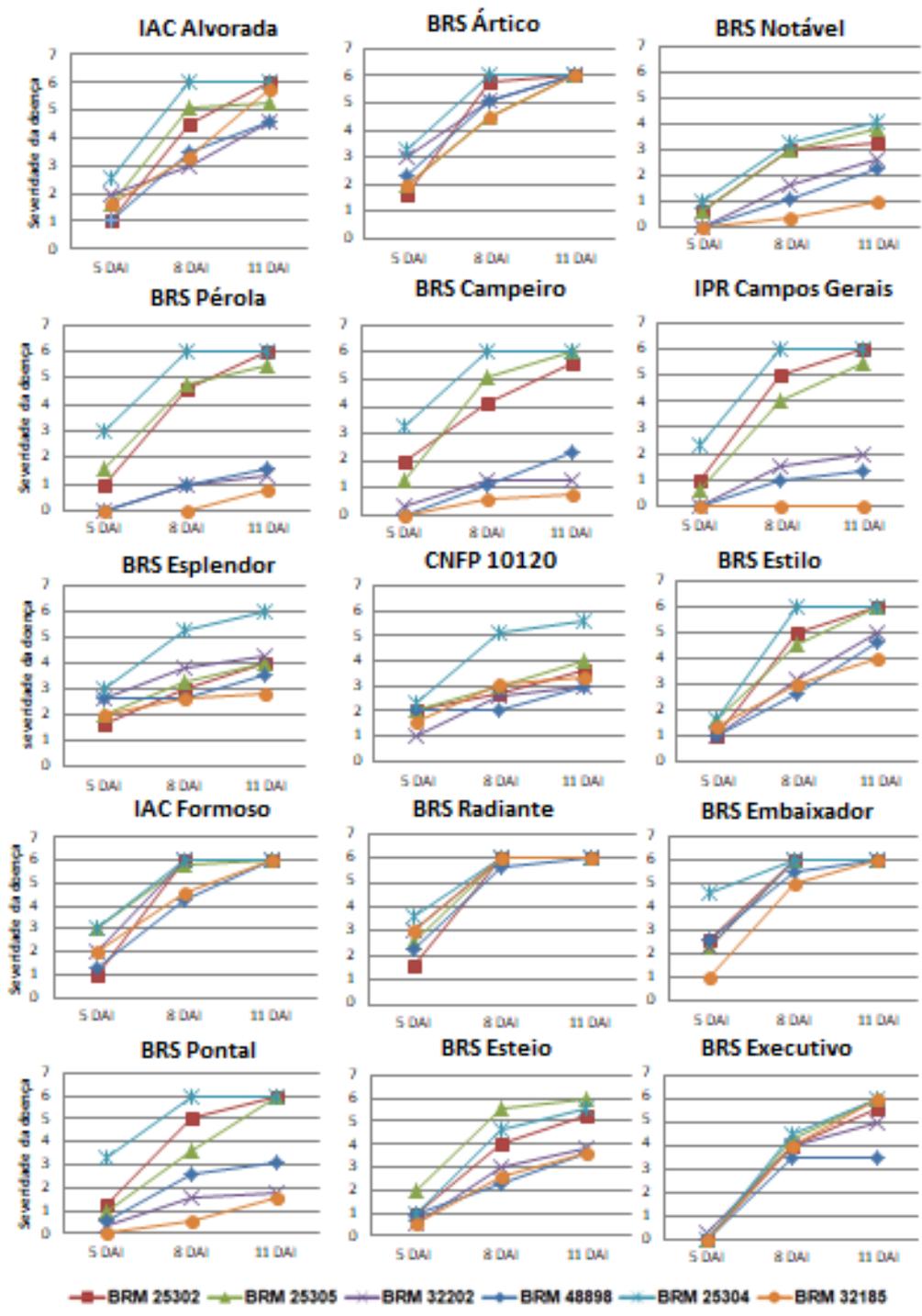


Figura 5. Curva do progresso da doença para os 15 genótipos de feijoeiro comum quando inoculados com *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*, isolados BRM 25302 (NF1), BRM 25305 (NF1), BRM 32202 (NF2), BRM 48898 (NF2), BRM 25304 (fuscans) e BRM 32185 (NF2), avaliados aos 5, 8 e 11 dias após a inoculação (dai).

Literatura Citada

- Aritua, V., Harrison, J., Sapp, M., Buruchara, R., Smith, J., Studholme, D. J. 2015. Genome sequencing reveals a new lineage associated with lablab bean and genetic exchange between *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Front. Microbiol.*
- Aritua, V., Musoni, A., Kato, F., Abang, M. M., Buruchara, R., Sapp, M., Harrisom, J., Studholme, D. J., and Smith, J. 2015. The draft genome sequence of *Xanthomonas* species strain Nyagatare, isolated from diseased bean in Rwanda. *FEMS Microbiol. Lett.* 362:4
- Bett, K. E., Banniza, S. 2014. Population study of *Xanthomonas* spp. from bean growing regions of Canada and response of bean cultivars to pathogen inoculation. *Can. J. Plant Pathol.* 36: 341-53.
- Büttner, D., He, S. Y. 2009. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol.* 150: 1656-64.
- Büttner, D., Bonas, U. 2010. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 107-33.
- Coyne, D., Schuster, M. 1974. Breeding and genetic studies of tolerance to several bean (*Phaseolus vulgaris* L.) bacterial pathogens. *Euphytica.* 23: 651-6.
- Coyne, D., Schuster, M. 1983. Genetics of and breeding for resistance to bacterial pathogens in vegetable crops. *HortScience.* 18: 30-6.
- Darrasse, A., Carrère, S., Barbe, V., Boureau, T., Arrieta-Ortiz, M. L., Bonneau, S., Briand, M., Brian, C., Cociancich, S. Durand, K. 2013. Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. *BMC Genomics.* 14: 76.

- Dunger, G., Garofalo, C. G., Gottig, N., Garavaglia, B. S., Rosa, M. C. P., Farah, C. S., Orellano, E. G., Ottado, J. 2012. Analysis of three *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* effector proteins in pathogenicity and their interactions with host plant proteins. *Mol. Plant Pathol.* 13: 865-76.
- Ekpo, E., Saettler, A. 1976. Pathogenic variation in *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. *Plant Disease Reporter.* 60: 80-3.
- Ferreira, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotec.* 35: 1039-42.
- Fourie, D., Herselman, L. 2011. Pathogenic and genetic variation in *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* and its *fuscans* variant in Southern Africa. *Afr. Crop Sci. J.* 19: 393-407.
- Gerlach, R. G., Hensel, M. 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 401-15.
- Halfeld-Vieira, B. D. A., Souza, R. M. 2000. Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. *Ciênc. Agrotec.* 24: 94-102.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., Boureau, T., Poussier, S. 2009. A «repertoire for repertoire» hypothesis: Repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One.* 4: e6632.
- Jaciani, F., Ferro, J., Ferro, M. I. T., Vernière, C., Pruvost, O., Belasque Júnior, J. 2012. Genetic diversity of a Brazilian strain collection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* based on the type III effector protein genes. *Plant Dis.* 96: 193-203.

- Jacobs, J. M., Pesce, C., Lefeuvre, P., Koebnik, R. 2015. Comparative genomics of a cannabis pathogen reveals insight into the evolution of pathogenicity in *Xanthomonas*. *Front. Plant Sci.* 6: 431.
- Kay, S., Bonas, U. 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. Microbiol.* 12: 37-43.
- Kelly, J., Gepts, P., Miklas, P., Coyne, D. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Res.* 82: 135-54.
- López, R., Asensio, C., Gilbertson, R. L. 2006. 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: 1204-13.
- Manzanera, A. S., Carmen, M., Asensio, C., Singh, S. P. 2006. Gamete selection for resistance to common and halo bacterial blights in dry bean intergene pool populations. *Crop Sci.* 46: 131-5.
- Maringoni, A. C., Kimati, H., Kurozawa, C. 1998. Comparação de dois métodos de extração de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Pesq Agropec Bras.* 33: 659-664.
- Melo, L. C., Santos, J. B. D. 1999. Identification of resistant genotypes considering polygenic systems in host-pathogen interaction. *Genet. Mol. Biol.* 22: 601-8.
- Mkandawire, A. B., Mabagala, R. B., Guzmán, P., Gepts, P., Gilbertson, R. L. 2004. Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology.* 94: 593-603.

- Mokryakov, M., Abdeev, I., Piruzyan, E., Schaad, N., Ignatov, A. 2010. Diversity of effector genes in plant pathogenic bacteria of genus *Xanthomonas*. *Microbiol.* 79: 58-65.
- Mutlu, N., Vidaver, A., Coyne, D., Steadman, J., Lambrecht, P., Reiser, J. 2008. Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. *Plant Dis.* 92: 546-54.
- Opio, A., Allen, D. J., Teri, J. 1996. Pathogenic variation in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, the causal agent of common bacterial blight in *Phaseolus* beans. *Plant Pathol.* 45: 1126-33.
- Paiva, B. A. R. de, Wendland, A., Borba, T., Araújo, L. G. 2018. Molecular Characterization and Differential Interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* with Common Beans (*Phaseolus vulgaris*). *Genet. Mol. Res.* 17: 1-13.
- Perrier, X., Jaquemon-Collet, J. 2005. DARwin-5.0. Dissimilarity analysis and representation for windows. Equipe Mathematique et Informatique, France.
- Pieretti, I., Royer, M., Barbe, V., Carrere, S., Koebnik, R., Cociancich, S., Couloux, A., Darrasse, A., Gouzy, J., Jacques, M.-A. 2009. The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited *Xanthomonadaceae*. *BMC genomics.* 10: 616.
- Raghavendra, B., Singh, D., Yadava, D., Mondal, K. K., Sharma, P. 2013. Virulence analysis and genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot of crucifers. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 46: 227-42.

- Rava, C., Zimmermann, M., Rocha, M., Yamada, T. 1988. Crestamento bacteriano comum. Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 598p.
- Rodrigues, R., Leal, N. R., Pereira, M. G., Lam-Sánchez, A. 1999. Combining ability of *Phaseolus vulgaris* L. for resistance to common bacterial blight. Genet. Mol. Biol. 22: 571-5.
- Studholme DJ, Wasukira A, Paszkiewicz K, Aritua, V., Thwaites, R., Smith, J., Grant, M. 2011. Draft genome sequences of *Xanthomonas sacchari* and two banana-associated xanthomonads reveal insights into the *Xanthomonas* group 1 clade. Genes. 2: 1050-65.
- Trindade, R. D. S., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A. T. D., Gonçalves, L. S. A., Viana, J. M. S., Sudré, C. P. 2015. Combining ability for common bacterial blight resistance in snap and dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Acta Sci. Agron. 37: 37-43.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. 40: e115.
- White, F. F., Yang, B., Johnson, L. B. 2000. Prospects for understanding avirulence gene function. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 291-8.
- Zaiter, H., Coyne, D., Vidaver, A., Steadman, J. 1989. Differential reaction of tepary bean lines to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. HortScience. 24: 134-7.

Capítulo 3

**Transmissão planta-semente de *Xanthomonas phaseoli* pv.
phaseoli e *X. citri* pv. *fuscans* em cultivares de feijoeiro**

Resumo

Sementes contaminadas tanto interna como externamente por *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (Xcf) e *X. phaseoli* pv. *phaseoli* (Xpp) podem transmitir o crestamento bacteriano comum (CBC) do feijoeiro. A partir de sementes contaminadas, as bactérias colonizam primeiro as mudas assintomáticas e, em seguida, são dispersadas no campo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a transmissão dos agentes causais do CBC de plantas para as sementes de diferentes genótipos de feijoeiro em condições de campo. Para isto, dois ensaios foram realizados, sendo o primeiro conduzido sob condições de infecção natural e o segundo conduzido sob inoculação artificial de Xpp, ambos compostos por 24 genótipos de feijoeiro comum. Ao final de todos os ensaios, as sementes colhidas foram submetidas à quantificação da população bacteriana por meio da metodologia prescrita pela ISTA e confirmação da presença do patógeno por PCR multiplex específica. A severidade do CBC foi acompanhada ao longo do ciclo e avaliada por escala de notas, a partir da qual foram calculadas as médias dos tratamentos (genótipos), que foram comparadas pelo teste de médias Scott-Knott 5%. Os resultados sugerem que as bactérias causadoras de CBC (Xcf e Xpp) são transmitidas da planta-mãe para as sementes, mesmo quando o inóculo é aplicado na fase vegetativa. Os resultados também indicaram que a transmissão planta-semente ao longo das gerações independe da severidade do CBC no campo e do genótipo do feijoeiro.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, crestamento bacteriano comum, patógenos transmitidos por sementes.

Introdução

A transmissão pela semente é um dos meios mais eficientes de dispersão para a maioria das bactérias patogênicas a plantas (Baker & Smith, 1966). O sucesso, de uma fitobactéria causar uma doença pode estar relacionado à quantidade de inóculo e também ao potencial com que esse inóculo é transmitido ao hospedeiro suscetível (Schuster & Coyne, 1977).

A transmissão de patógenos é um dos parâmetros mais importantes de medida da “fitness” (McCallum et al., 2001). Três vias de infecção de sementes foram descritas para patógenos transmitidos por sementes (Maude, 1996): (a) contaminação interna pelo movimento sistêmico do patógeno na planta mãe infectada (Saettler, 1989); (b) contaminação pelo estigma, onde as bactérias se movem através dos tecidos estilares para o embrião (Darrasse et al., 2018); e (c) contaminação externa como consequência do contato com populações bacterianas em tecido sintomático, ou uma alta carga de inóculo na vagens ou durante a debulha de resíduos com grandes populações bacterianas (Weller & Saettler, 1980).

Sementes contaminadas tanto interna como externamente por *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* e *X. phaseoli* pv. *phaseoli* podem transmitir o crestamento bacteriano comum (CBC) (Weller & Saettler, 1980). A partir de sementes contaminadas, as bactérias infectam e colonizam primeiro as mudas assintomáticas, e em seguida são dispersas no campo, dependendo das condições ambientais (Jacques et al. 2005; Weller e Saettler 1980).

Na semente contaminada pode-se observar uma mancha marrom no hilo ou no tegumento dos grãos de cor clara. Porém, mais frequentemente, as sementes não apresentam sintomas visíveis e podem germinar causando

danos à parte aérea, ou ainda germinar vigorosamente mesmo enquanto possuem comunidades epífitas do patógeno (Akhavan et al., 2013). A bactéria pode sobreviver na semente por períodos de até 15 anos, as quais constituem fonte imediata de inóculo em campos de feijão (Neergaard, 1977). Sob condições adequadas para a conservação de material genético vegetal a médio e longo prazo, *X. phaseoli* pv. *phaseoli* permanece viável, mantendo-se em populações elevadas e sendo capaz de causar doença em plântulas emergentes (Marques et al., 2005).

A transmissão de bactérias por meio das sementes infectadas ocorre via lesões cotiledonares em condições ambientais favoráveis à multiplicação do patógeno. Por esse processo a semente infectada, dormente, ao germinar e emergir do solo leva passivamente a bactéria infectante nas lesões cotiledonares. Assim, os respingos da chuva ou da água de irrigação, contendo células bacterianas são depositadas sobre plantas vizinhas e outras folhas dispersando a bactéria para uma nova planta. De acordo com Valarini et al. (1996) a taxa de transmissão de *X. citri* pv. *fuscans* pela semente é alta variando de 16 a 50,8 % em função da suscetibilidade da cultivar empregada. Quanto maior a incidência da bacteriose no campo, maior será a sua incidência na semente produzida, ou seja, maior será a transmissão planta mãe para as sementes (Valarini et al., 1992).

Diversas técnicas foram desenvolvidas e adaptadas com a finalidade de detectar a presença de Xpp e Xcf em sementes de feijão, tais como o uso de bacteriófagos, meios semisseletivos, testes sorológicos como ELISA, microscopia de imunofluorescência, imunodifusão em ágar e PCR (reação em cadeia da polimerase) (Malin et al., 1983; Sheppard, 1983; Van Vuurde et al.,

1983; De Velásquez & Trujillo, 1984; Maringoni et al., 1994; Audy et al., 1996; Tebaldi et al., 2007; Popović et al., 2010). No entanto, o método que emprega a semeadura de extrato ou semente em meios de cultura semisseletivo é capaz de proporcionar crescimento e quantificação da bactéria, permitindo verificar ao mesmo tempo sua presença e viabilidade (Chang et al., 1991).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a transmissão dos agentes causais do CBC para sementes de diferentes cultivares e linhagens genéticas de feijoeiro sob inoculação artificial e natural em condições de campo, ao longo de duas gerações (safras).

Material e Métodos

Ensaio de campo

Dois ensaios em condições de campo foram realizados, sendo que o primeiro ensaio foi conduzido sob condições de infecção natural e o segundo conduzido sob inoculação artificial de *X. phaseoli* pv. *phaseoli*. Em cada ensaio, a transmissão das bactérias foi avaliada durante duas gerações.

No primeiro ensaio a doença ocorreu naturalmente na área de cultivo (sem o conhecimento da fonte de inóculo) e foi acompanhada durante duas gerações. Para isto, foi selecionado um ensaio VCU (Valor de Cultivo e Uso) do Melhoramento Genético do Feijoeiro da Embrapa Arroz e Feijão, conduzido na safra das águas de 2016, no município de São João d'Aliança,GO, com alta incidência de cretamento bacteriano comum. O ensaio foi composto por 24 genótipos, entre eles linhagens e cultivares comerciais que apresentaram diferentes níveis de resistência ao CBC (Tabela 1). Na safra da “seca” de 2017,

as sementes de plantas infectadas providas de São João d'Aliança foram semeadas no campo experimental da Embrapa, em Santo Antônio de Goiás, GO, compondo a segunda geração avaliada do ensaio.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos inteiramente casualizados com três repetições, sendo que cada parcela foi composta por 3 linhas de 4 metros de comprimento, totalizando uma área útil colhida de 3,6 m² por parcela. Ao longo do desenvolvimento da cultura, o ensaio foi submetido à irrigação controlada por aspersão, ao controle de plantas daninhas e adubação de cobertura. Após o surgimento dos primeiros sintomas, procederam-se as avaliações semanais até a senescência das folhas. A severidade da doença foi avaliada por meio da escala de notas proposta por Rava et al. (1990), com notas variando de 1 a 9, como descrito abaixo:

Nota 1: ausência de sintomas

Nota 2: 5% de plantas da parcela com sintomas nas folhas

Nota 3: 10% de plantas da parcela com sintomas nas folhas

Nota 4: 25% de plantas da parcela com sintomas nas folhas

Nota 5: 35% de plantas da parcela com sintomas nas folhas

Nota 6: 50% de plantas da parcela com sintomas nas folhas ou nas vagens

Nota 7: 60% de plantas da parcela com sintomas nas folhas ou nas vagens

Nota 8: 80% de plantas da parcela com sintomas nas folhas ou nas vagens

Nota 9: 100 % de plantas mortas

Para o segundo ensaio foram utilizados os mesmos genótipos do ensaio anterior, porém a doença ocorreu por meio de inoculação artificial. Para assegurar a sanidade das sementes antes do plantio, uma amostra de cada genótipo/cultivar foi submetida à detecção pelo método da ISTA. Em seguida,

foram semeadas na safra da “seca” de 2017 no campo experimental da Embrapa em Santo Antônio de Goiás, e os grãos colhidos constituíram a primeira geração avaliada. No ano seguinte (safra da “seca” de 2018) sementes dessa primeira geração foram utilizadas no plantio para se obter, ao final do ciclo da cultura, a segunda geração avaliada. Também foi utilizado o delineamento experimental de blocos inteiramente casualizados com três repetições. Procedimentos para manejo da cultura (irrigação, controle de plantas daninhas e adubação), assim como as avaliações da doença, foram realizados conforme já descrito para o primeiro ensaio.

Ao final de todos os ensaios, para cada tratamento, o peso de 1000 grãos foi obtido. Em seguida, as amostras foram submetidas à quantificação da população bacteriana e confirmação da presença e identidade do patógeno por PCR multiplex específica.

Preparo do inóculo e inoculação

O isolado BRM 25302 (Xpp) foi cultivado em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) e mantido durante 48 horas a 28 °C. Após crescimento, a cultura bacteriana foi transferida para frascos contendo 800 mL de caldo nutriente, que foram mantidos em agitador de bancada (130 rpm a 28 °C) durante 72 horas. Em seguida, mediu-se a absorbância da suspensão por meio de espectrofotômetro, ajustando-se a concentração da suspensão para 10^8 ufc/mL ($OD_{540}=1,0$). Plantas das 24 genótipos de feijoeiro (Tabela 1) foram previamente pulverizadas com jato de areia para provocar ferimentos aos 20 dias de idade, e na sequência, o inóculo foi aplicado com auxílio de um pulverizador costal manual.

Detecção de bactérias nas sementes

Para a detecção da bactéria nas sementes, foi empregada a metodologia prescrita pela ISTA (International Seed Testing Association) (Grimault et al., 2014) com algumas modificações. Para isto 1000 sementes foram imersas em solução salina 0,85% + Tween 20 (0,02% v/v), na proporção de 2 mL/g de semente, e então, mantidas em câmara fria (7 °C) por 16 horas. Após repouso, o extrato bruto (lavado) da semente foi submetido à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-7}) em água esterilizada, e uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi depositada em meio de cultura 523 de Kado, com três repetições para cada diluição. As placas foram incubadas a 28 °C por 72 horas e, em seguida foi feita a contagem de colônias para o cálculo de unidades formadoras de colônias por grama de semente.

Para cada tratamento, no máximo cinco colônias com características semelhantes ao gênero *Xanthomonas* foram coletadas do meio de cultura e ressuspendidas em 1 mL de água estéril. Uma alíquota do lisado de células bacterianas, após tratamento a 95 °C por 5 minutos, foi submetida a PCR multiplex específica (descrita no Capítulo 1) para confirmação da identidade do (s) patógeno (s) nas sementes.

Análise estatística

As sementes colhidas foram pesadas, porém o rendimento de grãos não foi considerado devido à perdas pela ocorrência de outras doenças na cultura (mosaico dourado, antracnose, mancha angular e mela) além do CBC. Para as notas de severidade, foi calculada a média dos tratamentos, e comparadas

pelo teste de médias Scott-Knott 5%, com o emprego do programa Sisvar (Ferreira, 2014).

Para a quantificação da bactéria nas sementes, o número médio de colônias por tratamento foi transformado para log (ufc/g de semente) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Esses dados foram utilizados para comparar a população de bactéria em cada genótipo ao longo das gerações avaliadas nos dois ensaios (inoculação artificial e natural).

Resultados

Ensaio de campo sob ocorrência natural da doença

Houve diferença significativa entre os genótipos quanto à severidade da doença na primeira geração (safra das águas), no entanto isso não foi observado na segunda geração (safra das secas). Quando a severidade nos 24 genótipos foi comparada entre as duas gerações, observou-se que para os genótipos, ANFC9, BRS FC402, BRS Estilo, CNFC 15850, CNFC 15859, BRS FP403, BRS Tuiuiu e CNFC 15697 não houve diferença significativa. Para o restante dos genótipos, houve uma redução significativa da severidade da doença (Tabela 2).

De acordo com os dados obtidos após a detecção e quantificação da bactéria nas sementes, verificou-se que não há correlação entre aumento da severidade e aumento do número de células bacterianas recuperadas das sementes. Para alguns genótipos, houve a redução da população presente na semente, ao mesmo tempo que para outros genótipos houve um incremento na segunda geração (Figuras 1 e 2). Por exemplo, a linhagem CNFC 16902 apresentou redução na severidade e na população bacteriana da primeira para

a segunda geração, enquanto que a linhagem CNFC 15826 demonstrou redução da severidade, e aumento da população bacteriana (Tabela 2). Com isso, verificou-se que a bactéria é transmitida de uma geração para outra, e que a transmissão aparentemente não está correlacionada ao genótipo do hospedeiro.

Ensaio de campo com inoculação artificial de *X. phaseoli* pv. *phaseoli*

Quando plantas dos 24 genótipos de feijoeiro foram submetidas a uma maior pressão do inóculo nas folhas devido à inoculação artificial, observou-se que o comportamento da severidade da doença para a maioria dos genótipos foi semelhante ao do primeiro ensaio. Assim como no primeiro ensaio, não foi verificada correlação entre aumento da severidade e aumento do número de células bacterianas recuperadas das sementes. Observou-se que para os genótipos, BRS FC402, CNFC 15801, CNFC 15805, CNFC 15820, CNFC 16709, CNFC 16876 e BRS FC403, não foi possível recuperar a bactéria da semente, mesmo apresentando médias de severidade elevada, como a cultivar BRS FP403 (média 7,3) (Figura 2). Para os 17 genótipos restantes em que foi possível recuperar a bactéria, a população bacteriana é semelhante à encontrada no primeiro ensaio (Tabela 3).

A identidade das bactérias recuperadas de todos os tratamentos (genótipos) foi confirmada por meio de PCR. Das sementes provindas do primeiro ensaio (não inoculado) foi recuperada a espécie *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*, e das sementes provindas do segundo ensaio (inoculado) apenas a espécie *X. phaseoli* pv. *phaseoli*.

Discussão

A transmissão pela semente é um dos mais eficientes meios de dispersão a longa distância da maioria das bactérias fitopatogênicas (Gitaitis & Walcott, 2007). Níveis baixos de contaminação das sementes por patógenos bacterianos são suficientes para levar à colonização eficiente das plantas (Darrasse et al., 2007).

Resultados obtidos neste trabalho demonstram que as bactérias causadoras do CBC (Xcf e Xpp) são transmitidas da planta-mãe para as sementes, mesmo quando o inóculo é aplicado na fase vegetativa (segundo ensaio). Para este patossistema é relatado que a bactéria é transmitida para a semente através do sistema vascular da planta hospedeira (Darsonval et al., 2009, Darsonval et al., 2008), e que na maioria das vezes a presença da bactéria é observada desde o tegumento até as superfícies dos embriões (Darrasse et al., 2018).

Ficou evidenciado aqui que a menor da severidade da doença não implica em menor da população bacteriana na semente, mostrando que mesmo que a severidade dos sintomas seja menor na geração seguinte, a bactéria continua presente na semente em concentrações similares entre as duas gerações para a maioria dos genótipos. Para a espécie Xcf, Darrasse et al. (2007), mostraram que a bactéria foi capaz de contaminar sementes de feijão sem a expressão dos sintomas na hospedeira suscetível. Resultados semelhantes foram encontrados por Walcott et al. (2003), quando avaliaram a contaminação de sementes por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melancia assintomáticas. Resultado contrário foi relatado por Roberts et al.

(1996) quando analisaram a transmissão de *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* para ervilhas e verificou-se que o número de lesões nas plantas aumenta à medida que a população bacteriana nas sementes aumenta.

Segundo Rodríguez et al. (2018) a herdabilidade de microrganismos endófitos nas sementes pode estar relacionada à interação deste com o genótipo da hospedeira. Nossos resultados sugerem que isto não ocorre para o patossistema em estudo, visto que a transmissão de Xcf e Xpp para as sementes foi avaliada em 24 genótipos de feijoeiro, e nos dois ensaios realizados não houve correlação entre a quantidade de bactéria presente na semente e o nível de resistência de CBC das cultivares. Portanto, a transmissão do patógeno ao longo das gerações aparentemente não depende do genótipo da hospedeira. Semelhantes resultados foram encontrados por Popović et al. (2010) quando avaliaram 23 cultivares comerciais de feijoeiro da Sérvia e confirmaram a presença (sem quantificação) da bactéria em 20 cultivares.

Genótipos com baixa severidade e classificados como resistentes a doença, como por exemplo, o IPR Tuiuiu (ensaio sob infecção natural) mostrou aumento da população bacteriana na segunda geração, sugerindo que a expressão de genes envolvidos na resistência à doença não impede ou diminui a transmissão do patógeno para a geração seguinte. Resultado contrário é relatado para *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, em que a resistência do hospedeiro é um fator importante para a transmissão da bactéria das sementes para as plantas (Moffett & Wood, 1985).

Os genótipos de feijoeiro foram avaliados apenas durante duas gerações, ou seja, dois anos consecutivos. Seria importante avançar as

gerações destes genótipos a fim de analisar o comportamento da população de bactérias ao longo dos anos. Segundo Rezki et al. (2018), as flutuações anuais nas condições climáticas podem contribuir para as diferenças na estrutura da comunidade de microrganismos entre as gerações sucessivas da planta.

Compreender a importância da transmissão dos patógenos pela semente é um pré-requisito para o desenvolvimento de métodos de controle eficientes. Com isso, deve-se atentar no desenvolvimento de métodos de controle que diminuam a eficiência da transmissão dos patógenos da planta para a semente, representando uma estratégia interessante para a produção de sementes com boa qualidade sanitária.

Tabela 1. Cultivares e linhagens genéticas de feijoeiro utilizadas nos ensaios, com descrição da genealogia das linhagens e o tipo de grão

Genótipos	Genealogia	Tipo de grão
ANFC9	-	Carioca
BRS FC402	-	Carioca
BRS ESTILO	-	Carioca
IPR Bem te vi	-	Carioca
BRS PÉROLA	-	Carioca
CNFC 15713	Juriti / CNFC 9437	Carioca
CNFC 15743	Magnífico / BRS Requite	Carioca
CNFC 15801	Magnífico / CNFC 8202	Carioca
CNFC 15805	Magnífico / CNFC 8202	Carioca
CNFC 15820	CNFE 8075/ LM202206076	Carioca
CNFC 15826	CNFC 8202/ LM 202206076	Carioca
CNFC 15839	CNFC 8202 / Magnífico	Carioca
CNFC 15850	GX 9792 - 299-2 / Juriti	Carioca
CNFC 15853	CNFC10429 / BRS Pontal	Carioca
CNFC 15 854	CNFC10429 / BRS Pontal	Carioca
CNFC 15859	CNFC10429 / CNFC 8075	Carioca
CNFC 15820	CNFC 10432 /CNFC 9437	Carioca
CNFC 16709	VC3 / CNFC 10429	Carioca
CNFC 16876	VC3 / CNFC 10408	Carioca
CNFC 16902	VC3 / CNFC 10408	Carioca
BRS FP403	-	Preto
BRS ESTEIO	-	Preto
IPR TUIUIU	-	Preto
CNFP 15627	BRS VALENTE / CNFP 10138	Preto

Tabela 2. Desdobramentos das interações significativas da análise de variância referente à população bacteriana presente nas sementes de 24 genótipos de feijoeiro e severidade do crestamento bacteriano comum avaliadas em duas gerações, sob infecção natural de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans*

Genótipos	População bacteriana [log(ufc/g de sementes)]		Severidade (Nota)	
	Geração 1	Geração 2	Geração 1	Geração 2
ANFC9	3,46 ¹ d A ²	3,35 d A	3,3 a A	2,3 a A
BRS FC402	2,44 a A	4,01 e B	5,0 b A	3,6 a A
BRS Estilo	3,82e B	3,09 c A	4,6 b A	3,3 a A
IPR Bem te vi	2,77 b A	3,93 e B	5,3 b B	3,3 a A
Pérola	3,04 c B	0,0 a A	5,6 b B	2,6 a A
CNFC 15713	3,16 c A	3,46 d B	5,3 b B	3,0 a A
CNFC 15743	2,32 a B	0,0 a A	7,0 c B	3,6 a A
CNFC 15801	3,04 c B	0,0 a A	6,0 c B	3,6 a A
CNFC 15805	3,26 d A	4,06 e B	6,0 c B	3,6 a A
CNFC 15820	3,10 c A	3,48 d B	8,0 c B	2,6 a A
CNFC 15826	4,65 f A	5,77 f B	8,0 c B	4,3 a A
CNFC 15839	4,02 e A	3,77 e A	6,6 c B	2,6 a A
CNFC 15850	4,04 e B	3,36 d A	5,3 b A	3,6 a A
CNFC 15853	4,06 e B	3,14 c A	5,3 b B	2,3 a A
CNFC 15854	2,50 a A	4,04 e B	5,3 b B	2,6 a A
CNFC 15859	3,27 d A	3,92 e B	5,0 b A	4,0 a A
CNFC 15860	3,10 c B	0,0 a A	5,0 b B	2,6 a A
CNFC 16709	3,80 e A	4,03 e A	7,0 c B	2,0 a A
CNFC 16876	2,84 b A	3,98 e B	8,0 c B	3,0 a A
CNFC 16902	4,44 f B	2,86 c A	7,3 c B	3,3 a A
BRS FP403	2,40 a B	1,32 b A	3,0 a A	2,3 a A
BRS Esteio	3,42 d B	0,0 a A	5,0 b B	3,0 a A
IPR Tuiuiu	2,63 b A	3,42 d B	2,6 a A	2,3 a A
CNFP 15697	2,41 a B	0,0 a A	6,6 c A	5,3 a A
Média geral	3,25 B	2,71A	5,69 B	3,15 A

¹ Valores médios de 3 repetições

²Para cada variável analisada (população bacteriana e severidade), as médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si para os genótipos e letra maiúscula na linha não diferem entre as gerações. Scott-Knott 5%.

Tabela 3. Desdobramentos das interações significativas da análise de variância referente à população bacteriana presente na semente e severidade da doença, avaliadas em duas gerações, para os 24 genótipos de feijoeiro sob inoculação artificial de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*.

Genótipos	População bacteriana [log(ufc/g de sementes)]		Severidade (nota)	
	Geração 1	Geração 2	Geração 1	Geração 2
ANFC9	3,47 ¹ e A ²	3,43 g A	6,0 a A	5,0 a A
BRS FC402	0,0 a A	0,0 a A	6,6 b A	5,6 a A
BRS Estilo	3,18 d A	3,47 g B	6,0 a A	4,3 a A
IPR Bem te vi	3,93 g A	3,96 h A	7,6 b B	5,6 a A
Pérola	2,65 c A	4,70 i B	5,3 a A	5,0 a A
CNFC 15713	3,14 d B	1,67 c A	7,6 b B	5,0 a A
CNFC 15743	2,95 d B	2,01 d A	7,6 b B	3,6 a A
CNFC 15801	0,0 a A	0,0 a A	6,3 b B	3,6 a A
CNFC 15805	0,0 a A	0,0 a A	4,6 a A	4,6 a A
CNFC 15820	0,0 a A	0,0 a A	5,6 a A	4,3 a A
CNFC 15826	3,36 e B	1,5 b A	7,0 b B	4,6 a A
CNFC 15839	3,92 g B	3,52 g A	6,3 b B	4,3 a A
CNFC 15850	3,31 e B	2,53 e A	5,3 a B	3,0 a A
CNFC 15853	3,03 d B	0,0 a A	6,6 b B	4,3 a A
CNFC 15854	4,12 h B	0,0 a A	7,0 b B	4,3 a A
CNFC 15859	3,14 d B	2,52 e A	6,6 b B	4,3 a A
CNFC 15860	2,41 b A	2,35 e A	7,0 b B	3,3 a A
CNFC 16709	0,0 a A	0,0 a A	7,6 b B	5,0 a A
CNFC 16876	0,0 a A	0,0 a A	5,0 a A	4,3 a A
CNFC 16902	2,22 b A	2,41 e A	7,0 b B	3,6 a A
BRS FP403	0,0 a A	0,0 a A	7,3 b B	5,0 a A
BRS Esteio	3,60 f B	3,34 f A	8,0 b B	4,3 a A
IPR Tuiuiu	4,30 i B	3,63 g A	5,3 a A	5,0 a A
CNFP 15697	4,41 i B	3,20 f A	6,6 b A	5,0 a A
Média Geral	2,38 B	1,84 A	6,52 B	4,48 A

¹ Valores médios de 3 repetições

² Para cada variável analisada (população bacteriana e severidade), as médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si para os genótipos e letra maiúscula na linha não diferem entre as gerações. Scott-Knott 5%.

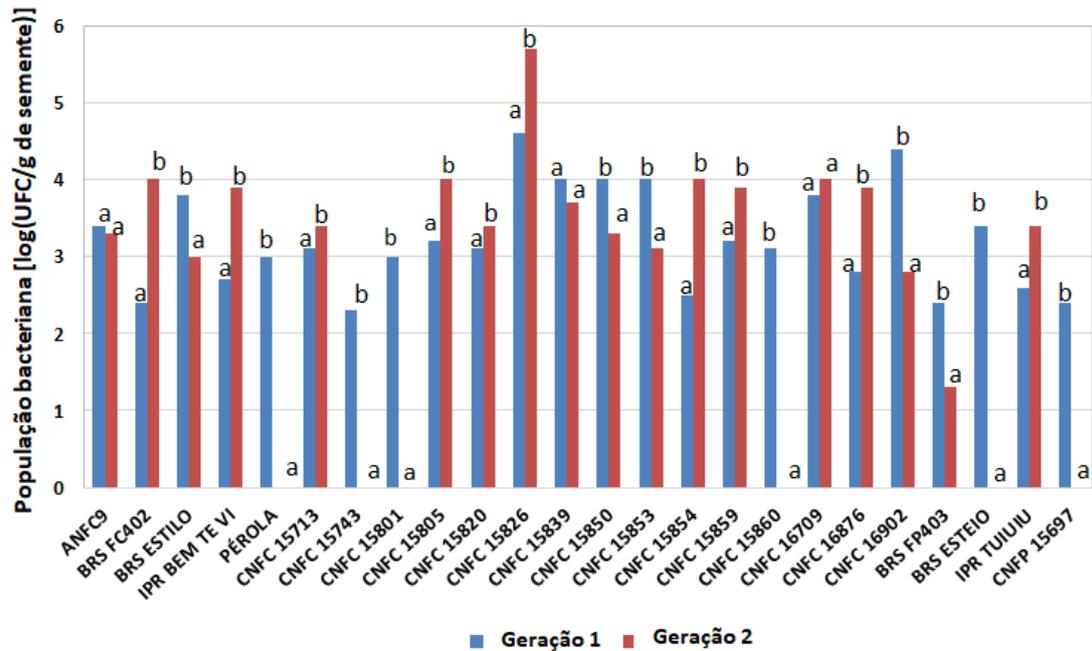


Figura 1. População de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* expressa em Log (ufc/g de semente) detectada em sementes de 24 genótipos de feijoeiro avaliados ao longo de duas gerações sob condições de ocorrência natural de crestamento bacteriano comum. Letras iguais indicam que as médias não diferem entre si, entre as duas gerações sucessivas de plantio (Scott-Knott 5%).

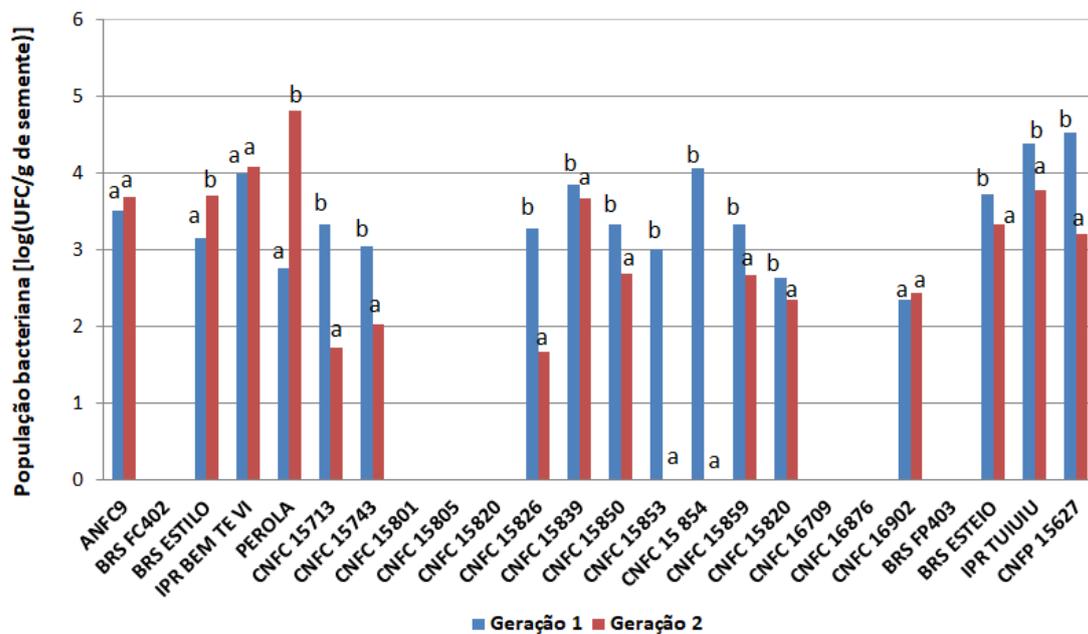


Figura 2. População de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* expressa em Log (ufc/g de semente) detectada em sementes de 24 genótipos de feijoeiro inoculados artificialmente em condições de campo e avaliados ao longo de duas gerações. Letras iguais indicam que as médias não diferem entre si, entre as duas gerações sucessivas de plantio (Scott-Knott 5%).

Literatura Citada

- Akhavan, A., Bahar, M., Askarian, H., Lak, M. R., Nazemi, A., Zamani, Z. 2013. Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. Springer Plus. 2:41.
- Audy, P., Braat, C. E., Saindon, G., Huang, H. C., Laroche, A. 1996. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. Phytopathology.86: 361-366.
- Baker K. F., Smith S.H., 1966. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 4. 311-32.
- Chang, C., Donaldson, R., Crowley, M., Pinnow, D. 1991. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. Phytopathology. 81:449-453.
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C. E., Jacques, M-A. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. Eur. J. Plant Pathol. 119:203-15.
- Darrasse, A., Barret, M., Cesbron, S., Compant, S., Jacques, M-A. 2018. Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. Plant and soil. 422:115-28.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., Manceau, C., Jacques, M.-A. 2008. The type III secretion system of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* is involved in the phyllosphere colonization process and in transmission to seeds of susceptible beans. Appl. Environ. Microbiol. 74:2669-78.

- Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S., Jacques, M-A. 2009. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. Mol. Plant-Microb. Interact. 22:747-57.
- De Velásquez, N. C., Trujillo, G. 1984. Comparacion de Metodologias para la Deteccion de la Infeccion de Semillas de Caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) com la Bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. Agron. trop.34: 29-41.
- Ferreira, D. F. 2014. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. Ciênc. Agrotec. 38:109-112.
- Gitaitis, R., Walcott, R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 45:371-97.
- Kado, C., Heskett, M.1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology. 60: 969-76.
- Grimault, V., Oliver, V., Rolland, M., Darrasse, A., Jacques, M.-A. 2014. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris* (bean). International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods. 7-021:1-20.
- Jacques, M.-A., Josi, K., Darrasse, A., Samson, R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. Appl. Environ. Microbiol. 71:2008-2015.
- Malin, E., Roth, D., Belden, E. 1983. Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. Plant Dis. 67:645-647.

- Maringoni, A., Kimati, H., Kurozawa, C. 1994. Variabilidade sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Summa Phytopathol. 20:164-167.
- Marques, A. S. D. A., Guimarães, P. M., Dos Santos, J. P., Vieira, T. M. 2005. Sobrevivência e viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão armazenadas sob condições controladas. Fitopatol. Bras. 30:527.
- Maude, R. B. 1996. *Seedborne Diseases and their Control. Principles and Practice*. CAB International. Wallingford, UK. 280 pp.
- Mccallum, H., Barlow, N., Hone, J. 2001. How should pathogen transmission be modelled? Trends Ecol. Evol. 16:295-300.
- Moffett, M. L., Wood, B. A. 1985. Resident population of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* on cotton leaves: a source of inoculum for bacterial blight. J. Appl. Microbiol. 58:607-12.
- Neegaard, P. 1977. Seed pathology Vols. 1 and 2. The MacMillan Press. Flórida, USA. 176 pp.
- Popović, T., Balaž, J., Nikolić, Z., Starović, M., Gavrilović, V., Aleksić, G., Vasić M., Živković, S. 2010. Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. Afr. J. Agric. Res. 5:2730-2736.
- Rava, C., Sartorato, A., Romeiro, R. 1990. Avaliação de cultivares de feijoeiro quanto aresistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em condições de campo e casa de vegetação. Summa Phytopathol. 16:83-91.

- Rezki, S., Campion, C., Simoneau, P., Jacques, M-A., Shade, A., Barret, M. 2018. Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. *Plant and soil*. 422:67-79.
- Roberts, S., Ridout, M., Peach, L., Brough, J. 1996. Transmission of pea bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisii*) from seed to seedling: effects of inoculum dose, inoculation method, temperature and soil moisture. *J. Appl. Microbiol.* 81:65-72.
- Rodríguez, C. E., Mitter, B., Barret, M., Sessitsch, A., Compant, S. 2018. Commentary: seed bacterial inhabitants and their routes of colonization. *Plant and soil*. 422:129-34.
- Saetler, A. 1989. Assessment of yield loss caused by common blight of beans in Uganda. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop.* 35:113-114.
- Sheppard, J. 1983. Detection of seed-borne bacterial blights of bean. *Seed Sci Technol.* 11:561-567.
- Tebaldi, N. D., Souza, R. M., Machado, J. C. 2007. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi-seletivo. *Fitopatol. Bras.* 32:56-58.
- Valarini, P., Galvão, J., Oliveira, D. D. A. 1996. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: importância do inóculo da semente na epidemiologia do crestamento bacteriano comum do feijoeiro. *Fitopatol. Bras.* 21:261-7.
- Valarini, P., Menten, J., Lollato, M. 1992. Incidência do crestamento bacteriano comum no campo e transporte de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* pela sementes de feijão, obtidas por diferentes métodos. *Summa Phytopathol.* 18:160-166.
- Van-Vuurde, J., Van Den Bovenkamp, G., Birnbaun, Y. 1983. Immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay

as potential routine tests for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seed. Seed SciTechnol. 11:547-559.

Walcott, R., Gitaitis, R., Castro, A. 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Phytopathology. 93:528-34.

Weller, D. M., Saettler, A. 1980. Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field-grown navy beans. Phytopathology. 70:500-6.

Weller, D. M., Saettler, A. 1980. Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. Phytopathology. 70:148-152.

Capítulo 4

Detecção rápida de *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* e *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* em feijoeiro-comum por amplificação isotérmica mediada por Loop*

*Artigo submetido ao periódico Plant Disease, em 08/06/2018 (manuscrito ID PDIS-06-18-0976-RE)

Resumo

Foi desenvolvido um ensaio Lamp para detecção específica dos patógenos causadores do crestamento bacteriano comum no feijoeiro, *X. phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans*. Os limites de detecção do ensaio Lamp foram de 10 ufc/mL para a suspensão de células e 0,1 fg para DNA, enquanto que na PCR convencional os iniciadores detectam até 10^5 ufc/mL e 10 ng de DNA. O método foi testado com amostras de folhas inoculadas artificialmente, com sintomas e com infecção latente, e houve detecção da bactéria na folha a partir de 4 horas após a inoculação até o final do tempo de avaliação, aos 15 dai. Quando o método foi aplicado para detecção da bactéria em lotes de sementes de feijão contaminado, a taxa de detecção da bactéria foi de 100% (24/24). O patógeno foi detectado nas sementes submetidas a apenas 1 hora de repouso em solução salina (0,85%), reduzindo o tempo demandado para a detecção da bactéria. O uso do ensaio LAMP em lotes de semente reduziria os riscos de plantio de lotes com alta infestação da bactéria em ambientes favoráveis a sua multiplicação.

Introdução

O crestamento bacteriano comum (CBC) está entre as doenças mais destrutivas do feijoeiro comum, causando grandes perdas na produção principalmente na safra das águas, época em que as condições ambientais são favoráveis (umidade e temperatura elevada) ao desenvolvimento da doença e disseminação do patógeno (Vieira 1983). A doença é causada por quatro linhagens genéticas diferentes que pertencem a duas espécies dentro do gênero *Xanthomonas* (Schaad et al. 2005; Schaad et al. 2006; Alavi et al.

2008). Sendo a linhagem “fuscans”, a linhagem não fuscans 2 (NF2) e 3 (NF3) pertencentes a espécie *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* (anteriormente *X. fuscans* subsp. *fuscans* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* grupo 9.6 por rep-PCR). E a linhagem não fuscans 1 (NF1) pertencente a *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (anteriormente *X. axonopodis* pv. *phaseoli* grupo 9.4 por rep-PCR) (Rademaker et al. 2005; Constantin et al. 2016).

No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez no estado do Pará, e seu agente causal descrito como *X. campestris* pv. *phaseoli* (Robbs 1954) e a variante *fuscans*, foi descrita no Estado de São Paulo (Paradela Filho et al. 1967). A doença tem expressão mundial, sendo alvo de quarentena em muitos países da Europa, onde não é endêmica. Assim, o trânsito de sementes contaminadas é um forte componente alvo das medidas de controle para limitar a disseminação do patógeno no mundo. A bactéria pode sobreviver e permanecer viável por períodos de cinco a 15 anos em sementes de feijão, (Neergaard 1977; Marques et al. 2005), sendo um importante veículo de disseminação a curta distância e o principal à longa distância.

Diferentes técnicas de detecção podem ser empregadas para demonstrar a presença da bactéria na hospedeira. Métodos de diagnose baseados no uso de meios semisseletivos (Clafflin et al. 1987; Tebaldi et al. 2007), dupla difusão em gel de ágar (Maringoni et al. 1994), testes bioquímicos e PCR específica. Apesar de ser apresentada como uma técnica de detecção precisa, a PCR específica apresenta a desvantagem de não possuir alta sensibilidade, principalmente no que se refere à detecção em material de planta. E ainda por demandar tempo devido ao demorado ciclo de amplificação do fragmento de DNA e, às análises pós-amplificação por eletroforese em gel.

O par de iniciadores específicos X4c/X4e desenvolvidos por Audy et al. (1994) amplifica um fragmento de 730 pb do DNA plasmidial que permite detectar tanto a linhagem “fuscans” como as linhagens “não fuscans”. Os iniciadores Xf1/Xf2 específicos apenas para a linhagem “fuscans” foram desenvolvidos para a detecção da bactéria na planta, e de acordo com os autores o limite de detecção foi 10^4 ufc por disco de folha (Toth et al. 1998).

A partir dos genes de virulência *avrBst* e *xopL*, Boureau et al. (2013) desenvolveram os iniciadores Am1F/R e Am2F/R, que quando usados em conjunto com os iniciadores X4c/X4e compondo uma reação multiplex diminuem o risco de falsos positivos, e permitem a diferenciação de isolados patogênicos daqueles não patogênicos, apresentando como uma alternativa aos testes de patogenicidade. Os autores sugerem a realização de testes de patogenicidade para aqueles resultados que apresentam ambiguidade.

A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) foi descrita por Notomi et al. (2000) e tornou-se uma ferramenta para a detecção de fitopatógenos, incluindo várias espécies de *Xanthomonas* (Lang et al. 2014; Hodgetts et al. 2015; Jun-Hai et al. 2015; Palacio-Bielsa et al. 2015; Wang and Turechek 2016). Em contraste com a PCR, a LAMP amplifica a uma temperatura única e constante e, portanto, não requer um equipamento termociclador, diminuindo os custos e otimizando o tempo para a detecção de um patógeno. No entanto, os produtos da reação facilmente causam poluição por aerossóis em condições de alta temperatura, o que resulta em maiores taxas de falsos positivos (Huang et al. 2017).

Os ensaios LAMP requerem a enzima Bst DNA polimerase (com atividade de deslocamento de cadeia) e um conjunto de 4-6 iniciadores que

hibridam em 6 a 8 regiões distintas da sequência alvo, conferindo alta especificidade. A amplificação, em geral, é concluída sob uma condição isotérmica entre 60-65 °C, resultado em grandes quantidades de produto amplificado em pouco tempo (0,5 - 1h) (Jun-Hai et al. 2015).

Conforme a reação progride é possível observar a turbidez por pirofosfato de magnésio, um subproduto da reação de amplificação, que está diretamente relacionado à quantidade de produto amplificado (Arroyo et al. 2008). É possível também realizar a detecção visual pela adição de corantes intercalantes de DNA, tais como, brometo de etídeo, SYBR Green e iodeto de propídio, ou indicadores de íons de metais, como azul de hidroxinaftol (HNB) e calceína.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de LAMP para a detecção específica dos patógenos causadores do crestamento bacteriano comum no feijoeiro (*X. phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans*), e validá-lo em plantas de feijoeiro sintomáticas e assintomáticas, bem como em lotes de sementes originados de cultivo com incidência da doença no campo.

Material e Métodos

Obtenção dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos utilizados neste estudo foram recuperados da coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Arroz e Feijão. Os isolados pertencentes às espécies *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xpp) e *X. citri* pv. *fuscans* (Xcf) foram crescidos em meio de cultura 523 de Kado

(Kado and Heskett 1970), e submetidos a confirmação da identidade por meio da PCR específica com os iniciadores X4c/X4e (Audy et al. 1994) e Xf1/Xf2 (Toth et al. 1998), e da patogenicidade pelo método da tesoura (Rava et al. 1988) na cultivar suscetível BRS Ártico.

PCR convencional

A reação foi realizada com auxílio do QIAGEN® multiplex PCR Kit em um volume final de 10 µL contendo: 5 µL do multiplex PCR master mix; 1 µL de Q-solution; 0,1 µL de cada primer (10 µM) Xf 1/Xf 2; X4c/X4e; e 1 µL da suspensão de células bacterianas (10^7 ufc/mL). O programa para PCR foi composto por desnaturação inicial de 95°C por 15 min, seguido por 37 ciclos de 94 °C/30 seg, 65 °C/30 seg, 72 °C/1 min, e uma extensão final a 72 °C/ 10 min. Posteriormente, os produtos da PCR (5 µL) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X, corado com gelRed 2X, visualizado sob luz UV e fotodocumentados via sistema digital (L-PIX Loccus).

LAMP

Os iniciadores LAMP foram desenhados a partir da sequência do DNA plasmidial p7X4 da bactéria, utilizados por Audy et al. (1994) para desenvolver os iniciadores específicos (X4c/X4e) usados na PCR convencional. O software PrimerExplorer V5 (Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) foi utilizado para os desenhos de dois pares de iniciadores internos (FIP e BIP) e dois pares de iniciadores externos (F3 e B3). As sequencias de iniciadores desenhados está descrita na Tabela 1.

As reações de LAMP foram otimizadas ajustando-se as concentrações dos iniciadores, dNTPs, MgSO₄, e demais reagentes da PCR (corantes e solução tampão). Após a otimização, as reações foram conduzidas em volume final de 10 µl contendo, 1X Bst Thermopol Buffer, 5.5 µM MgSO₄, 200 µM do corante vermelho neutro com pH 7,8, 0.2 µM de F3 e B3 (cada), 1.6 µM de FIP e BIP (cada), 1.4 mmol de cada dNTP, 8U de Bst DNA polimerase large fragment (Biolabs, New England[®]), e 1µl de suspensão de células bacterianas (10⁷ ufc/mL).

Para encontrar a temperatura de amplificação ideal, a reação foi conduzida em aparelho termociclador (BioRad[®] Thermal Cycler) com gradiente de temperatura que variou de 55°C a 65°C, por 1 hora. Controles negativos contendo água livre de nuclease foram incluídos em cada ensaio. Enquanto os controles positivo foi composto pelos isolados BRM 25302 (Xpp) e BRM 25304 (Xcf). O corante vermelho neutro (Vetec[®]) adicionado na reação permitiu monitorar a amplificação observando-se a cor em tons de rosa para as amostras positivas e a cor amarela para as amostras negativas (Alhassan et al. 2016; Poole et al. 2017).

Especificidade e sensibilidade LAMP

Para determinar a especificidade do protocolo LAMP para o alvo (Xpp e Xcf), os *iniciadores* foram testados em diferentes espécies de *Xanthomonas* (*Xanthomonas gardneri*, *X. axonopodis* pv. *manihots*, *X. axonopodis* pv. *glycines* e *X. campestris* pv. *campestris*), em outros patógenos do feijoeiro (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccunfaciens*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*,

Macrophomina phaseolina, *Pseudocercospora griseola*), DNA extraído da folha do feijoeiro e ainda população de microrganismos presente na folha do feijoeiro. Folhas de feijão sadias foram coletadas aleatoriamente em um ensaio de multiplicação de sementes conduzidos na casa de vegetação. As folhas foram carimbadas em meio de cultura 523 de Kado e mantidas em B.O.D por 48 horas, em seguida as placas foram lavadas com água destilada e 1µl foi usado para as reações LAMP.

Para determinar a concentração mínima detectável foi preparada uma suspensão de células dos isolados BRM 25302 (Xpp) e BRM 25304 (Xcf), ajustando-se a concentração para 10^8 ufc/mL e efetuando-se 10 diluições em série. Também foi determinado o limite mínimo de DNA detectável com 12 diluições de DNA a partir da concentração inicial de 100 ng/µl. Cada diluição foi submetida a reações com os iniciadores LAMP e PCR convencional com os iniciadores X4c/X4e para comparar a sensibilidade de detecção das duas técnicas. Os ensaios foram repetidos três vezes para confirmação dos resultados.

Detecção do patógeno em amostras de folhas sintomáticas e com infecção latente

Para avaliar o potencial LAMP para detectar infecções latentes, plantas com 10 dias de idade da cultivar suscetível BRS Ártico foram inoculadas pelo método da tesoura (Rava et al. 1988) com uma suspensão de suspensão de 10^7 ufc/mL do isolado BRM 25302. Foram coletadas duas folhas escolhidas aleatoriamente nas plantas inoculadas em oito diferentes tempos, 4 horas após a inoculação, 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 15 dias

após a inoculação. Folhas de plantas saudáveis também foram amostradas antes da inoculação como controles negativos. De cada folha, foram retirados fragmentos de cerca de 0,5 mm² na região do corte, que foram macerados em microtubos contendo 200 µL de água estéril a temperatura ambiente. Uma alíquota de 1 µL foi usada diretamente nas reações de LAMP.

Detecção dos patógenos nas sementes

Um lote de sementes (cv. BRS Esplendor) colhido em um campo experimental submetido a condições ambientais desfavoráveis a doença, e sem ocorrência de sintomas de CBC foi usado para os testes. Para averiguar a sanidade do lote, quanto à presença de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans*, as sementes foram submetidas ao método padrão do ISTA (International Rules for Seed Testing), que consistiu em manter 1000 sementes submersas em solução salina (0,85%) durante 16 horas a 4° C, e submeter 1mL do extrato bruto a diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura para contagem das colônias, seguido por identificação por PCR específica (Grimault et al. 2014). Cada diluição do extrato bruto foi plaqueada quatro vezes.

Após confirmada a ausência dos patógenos na sementes, uma subamostra das sementes foi inoculada artificialmente por aspersão da suspensão bacteriana (10⁸ ufc/mL) nas sementes até estarem completamente cobertas pela suspensão. Em seguida as sementes foram secas sob fluxo laminar. A sensibilidade dos ensaios LAMP para detecção de contaminações de 0,1 e 1% no lote de sementes (1:999 e 10:990) foi testada. As sementes

foram submetidas a 16 horas de repouso em solução salina, como sugerido pelo ISTA, e uma alíquota de 1 mL do extrato bruto foi centrifugado por 10 min a 12.000 rpm, em seguida o pellet foi ressuspensionado em 100 µL de água estéril, e uma alíquota de 1 µL foi retirada para as reações de LAMP.

Para testar a reprodutibilidade do método, foram utilizados lotes de sementes de 24 cultivares/linhagens genéticas de feijoeiro com alta infestação de CBC no campo e apenas uma linhagem ou lote livre do patógeno como controle negativo. Cada lote foi submetido previamente à detecção pelo método convencional proposto pelo ISTA (International Seed Testing Association). Cada reação incluiu um controle positivo (BRM 25302) com suspensão bacteriana e um controle negativo com água.

A fim de reduzir o tempo de detecção, 1000 sementes foram submersas em solução salina (2 mL/grama) e mantidas em câmara fria por 1 e 4 horas. Após o repouso, foi retirado 1 mL do extrato que foi centrifugado e o pellet ressuspensionado em água (100 µL), uma alíquota de 1 µL foi utilizada para reações de Lamp.

Resultados

Desenho dos iniciadores, especificidade e sensibilidade

Os cinco conjuntos de iniciadores desenhados com base no amplicon gerado pelos iniciadores específicos X4c/X4e foram submetidos à reação de PCR e apenas um dos conjuntos mostrou-se eficiente para a detecção específica de *X. phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans*. As sequências que

contém os iniciadores externos F3 e B3, os iniciadores internos FIP (consistiu em F2 e F1c) e BIP (consistiu em B2 e B1c), estão listadas na Tabela 1.

As condições de reação LAMP (temperatura e tempo) foram otimizadas para 63°C por 60 min. Os limites de detecção do LAMP foram de 10 ufc/mL para a suspensão de células e 0,1 fg para DNA (Figura 1), enquanto que na PCR convencional os iniciadores detectam até 10⁵ ufc/mL e 10 ng de DNA (Tabela 2). Como para ambas as espécies de *Xanthomonas* os resultados foram idênticos, foi apresentado o resultado obtido para apenas uma das espécies, *X. phaseoli* pv. *phaseoli*.

A especificidade do ensaio LAMP foi testada para outros patógenos associados ao feijoeiro, para a microbiota presente na folha, para o DNA do feijoeiro e ainda para outras espécies de *Xanthomonas*. Amostras contendo DNA de Xpp desenvolveram uma coloração rosa após a reação, e as amostras negativas, com água, com DNA do feijão, e com DNA e célula de outros patógenos ou microrganismos, apresentaram coloração amarela após a reação, indicando que não houve amplificação de DNA (Figura 2).

Detecção do patógeno em amostras de folhas sintomáticas e com infecção latente

Para demonstrar sua aplicabilidade, o método LAMP foi testado com amostras de folhas inoculadas artificialmente, com sintomas e com infecção latente. As folhas começaram a apresentar sintomas somente a partir de 4 dias após a inoculação (dai) (Tabela 3), contudo os iniciadores LAMP detectaram a presença da bactéria na folha a partir de 4 horas após a inoculação até o final do tempo de avaliação, aos 15 dai . Isso demonstrou alta capacidade do ensaio

LAMP na detecção dos agentes do CBC em infecções latentes (plantas assintomáticas) e em plantas com sintomas (Figura 3).

Detecção do patógeno na semente

O ensaio LAMP para a detecção *X. phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans* foi aplicado a 24 lotes de sementes de feijão coletados em campo experimental contaminado com CBC. A taxa de detecção da bactéria foi de 100% com o método LAMP. Os mesmos lotes de sementes quando submetidos à análise pelo método padrão sugerido pelo ISTA, apresentaram uma porcentagem de incidência dos patógenos nos lotes avaliados, de 18/24 (75%). A fim de reduzir o tempo de detecção sugerido pelo ISTA, as sementes foram submetidas a tempos de 1 e 4 horas de imersão em solução. Foi possível detectar o patógeno nas sementes submetidas a apenas 1 hora de repouso em solução salina (0,85%) (Figura 7).

Discussão

A diagnose de cretamento bacteriano comum no feijoeiro baseia-se em um conjunto de métodos complementares como, reconhecimento de sintomas, cultivo em meio semisseletivo (Claflin et al. 1987; Tebaldi et al. 2007), testes bioquímicos (Ryu 1940; Klement et al. 1990; Schaad et al. 2001), testes de patogenicidade (Rava et al. 1988) e métodos moleculares baseados em PCR (Audy et al. 1994), que requerem maior tempo e técnicas especializadas. O presente trabalho desenvolveu um método de detecção rápida dos agentes

patogênicos (*X. phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans*) em folhas e sementes de feijão por meio da técnica LAMP.

LAMP representa uma nova ferramenta que pode ser usada para detecção de patógenos com inúmeras vantagens em relação às técnicas existentes. As reações LAMP apresentam alta sensibilidade e rapidez, e os resultados podem ser visualizados a olho nu com adição de corantes, sem a necessidade de eletroforese para detecção do produto amplificado.

Todos os parâmetros para detectar Xpp e Xcf por meio de LAMP foram padronizados e o ensaio pode ser realizado com sucesso usando-se um banho-maria, bloco de incubação ou outro dispositivo de aquecimento, que fornecem uma temperatura constante de 61° C a 63° C. O corante vermelho neutro possibilitou a visualização das reações a olho nu, apresentado tons de rosa para as amostras positivas e cor amarela para as amostras negativas. É importante ressaltar que para visualização a olho nu é recomendado o uso de métodos de contrastes (corantes) que sejam adicionados antes da amplificação, e que a detecção seja realizada em tubo fechado para reduzir os riscos de contaminação cruzada por aerossóis, produzindo falsos positivos.

Os testes de sensibilidade do ensaio LAMP mostraram um limite de detecção na ordem de femtograma do DNA alvo (0,1 fg) ou 10 ufc/mL de suspensão bacteriana, superior ao nível de detecção da PCR convencional que tem como limite de detecção 10⁵ ufc/mL. Resultados semelhantes foram encontrados na detecção por LAMP de *Erwinia amylovora* (Bühlmann et al. 2013), *Ralstonia solanacearum* (Morisset et al. 2014) e *Xanthomonas albilineans* (Dias et al. 2018). A especificidade do

conjunto de iniciadores LAMP foi validada com outras espécies de *Xanthomonas*, de sete outros patógenos encontrados no feijoeiro comum, e também aos microrganismos que sobrevivem epifiticamente na folha, mostrando ser altamente específica apenas para o organismo alvo.

A detecção específica de agentes patogênicos é muito importante para a predição e controle de doenças. A técnica LAMP desenvolvida possibilitou detectar a bactéria em infecções sintomáticas e latentes, confirmando a presença da bactéria no tecido da folha antes do surgimento dos primeiros sintomas. Isso demonstra a eficácia do método em detectar o patógeno presente na planta mesmo em baixas concentrações, podendo ser aplicada em amostras vindas diretamente do campo.

Os sintomas da doença no campo se manifestam frequentemente nas folhas, e são de fácil reconhecimento. Porém as sementes quando contaminadas raramente apresentam sintomas da doença, tornando difícil testar com eficiência e precisão amostras de sementes para a presença da bactéria. O método recomendado pelo ISTA apresenta como vantagem a quantificação bacteriana, porém, demanda tempo e requer bom conhecimento para execução e identificação das colônias. A técnica LAMP desenvolvida no trabalho permitiu detectar a bactéria na semente em apenas 1 hora de repouso em solução salina (0,85%), reduzindo bastante o tempo demandado para a detecção da bactéria.

O limite de detecção para a bactéria nas sementes foi de 0,1 %, ou seja, uma semente contaminada em 999 sadias. Quando o método foi testado em diferentes lotes de sementes contaminados, houve 100% de detecção (24/24), mostrando a eficiência do método para detecção da bactéria em lotes de

sementes. Resultados similares foram encontrados por Lang et al. (2014) que por meio dos primer LAMP específicos para *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* detectaram 100% das amostras avaliadas, e obtiveram 0,5 % de taxa de detecção em 5g de sementes.

Outra grande vantagem do método desenvolvido é o fato de não haver necessidade de extração de DNA, usando o extrato bruto da semente e das folhas diretamente nas reações. Vários trabalhos publicados demonstram que as amplificações LAMP toleram níveis mais elevados de certos inibidores e que a sensibilidade é menos afetada pelos vários componentes das amostras da planta, permitindo a omissão da purificação do DNA da amostra (Kaneko et al. 2007; Francois et al. 2011; Tomlinson et al. 2013). A tolerância do LAMP para componentes da folha e das sementes evita a necessidade para pré-extração do modelo de DNA, reduzindo o tempo necessário para todo o processo.

Por fim, o método de detecção visual Lamp desenvolvido para *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* apresenta como vantagens a simplicidade, sensibilidade e especificidade. O ensaio LAMP poderia ser potencialmente útil para a seleção de lotes de sementes contaminados, o que reduziria muito os riscos de plantio de lotes de sementes com alta infestação da bactéria em ambientes favoráveis a sua multiplicação. Conseqüentemente, facilitaria a tomada de medidas preventivas e de controle adequadas antes da multiplicação e disseminação do patógeno no campo.

Tabela 1. Iniciadores usados neste estudo

Método	Primer	Sequência (5'→3')	Referência
PCR	X4c	GGCAACACCCGATCCCTAACAGG	Audy et al., 1994
	X4e	CGCCGGAAGCACGATCCTCGAAG	
	Xf1.2	ACGCAAGACCCATCGTCATTC	Toth et al., 1998
	Xf2.2	ATGGCTCAAGGAAAACTTTCAGG	
Lamp	F3	TCCATACCTTCGGTCAACGA	Este estudo
	B3	GCACCTCTTCGAGGATCGT	Este estudo
	FIP	TAGGCTCGGCCGCTCACTATCGTTTTGAACGCC ACCTGCTTTTCCT	Este estudo
	BIP	CAGCTTCCACACCACCAGCACGTTTTTCGGCGCG AAGGATGAC	Este estudo

Tabela 2. Limite de detecção de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* por LAMP e PCR convencional

Suspensão de <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>								
Método ^a	(ufc/mL)							
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
Lamp	+ ^b	+	+	+	+	+	+	-
PCR convencional	+	+	+	-	-	-	-	-

^aEnsaio foram repetidos 3 vezes com os mesmos resultados.

^b += reação positiva; - = reação negativa

Tabela 3. Detecção de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* em folhas de feijoeiro sintomáticas e assintomáticas.

	Inoculação artificial de <i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> na folha (Dias após a inoculação)								
	-1	0	1	2	3	4	5	10	15
LAMP	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Sintomas	-	-	-	-	-	+	+	+	+

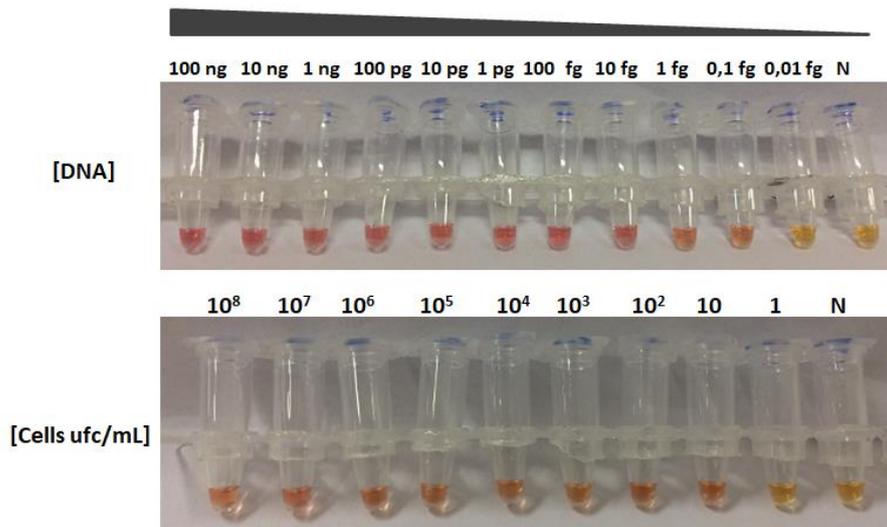


Figura 1. Sensibilidade de LAMP avaliada por meio de diluição em série do DNA bacteriano do isolado BRM 25302 de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (100 ng – 0,01 fg) e diluição em série da suspensão de células bacterianas (10⁸ – 1 ufc/mL). N: controle negativo.

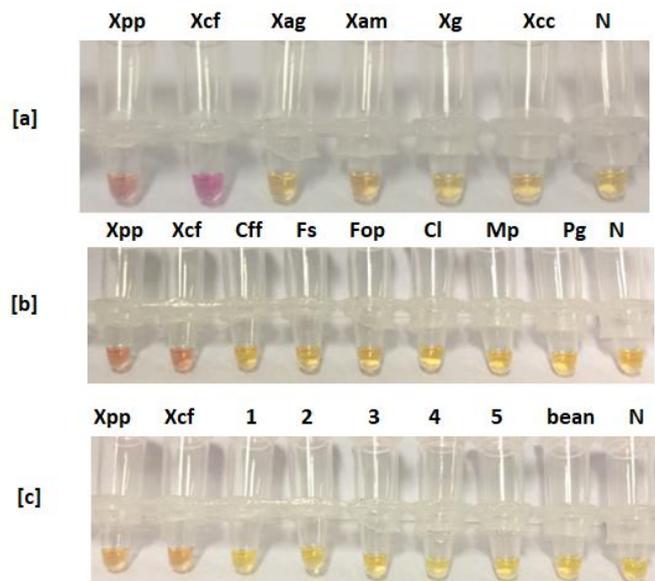


Figura 2. Detecção específica de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans* por meio de LAMP. (a): Xpp, *X. phaseoli* pv. *phaseoli*; Xcf, *X. citri* pv. *fuscans*; Xag, *X. axonopodis* pv. *glycines*; Xam, *X. axonopodis* pv. *manihots*; Xg, *X. gardneri*; Xcc, *X. campestris* pv. *campestris*.(b): Xpp, *X. phaseoli* pv. *phaseoli*; Xcf, *X. citri* pv. *fuscans*; Cff, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; Fs, *Fusarium solani*; Fop, *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*; Cl, *Colletotrichum lindemuthianum*; Mp, *Macrophomina phaseolina*; Pg, *Pseudocercospora griseola*. (c): Xcp, *X. phaseoli* pv. *phaseoli*; Xcf, *X. citri* pv. *fuscans*; 1-5, microbiota da folha; bean, DNA da folha do feijão. N: controle negativo

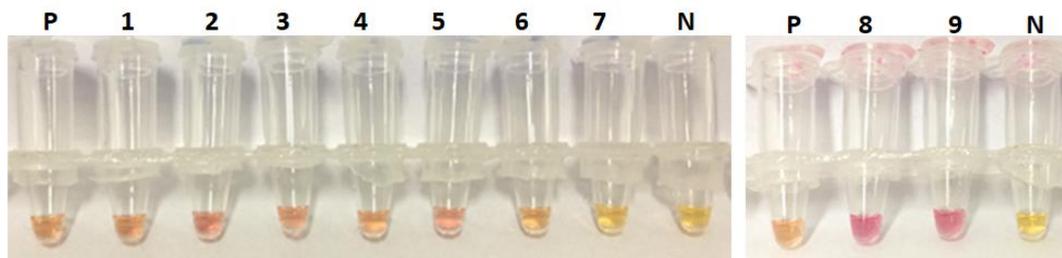


Figura 3. Detecção de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* por LAMP em folhas sintomáticas e assintomáticas após inoculação artificial. Tubo 1 = 5 dias após a inoculação (dai); 2 = 4 dai; 3 = 3 dai; 4 = 2 dai; 5 = 1 dai; 6 = 4 horas após a inoculação; 7 = 1 dia antes da inoculação; 8= 10 dai; 9 = 15 dai. P= controle positivo; N= controle negativo. As reações foram repetidas duas vezes.

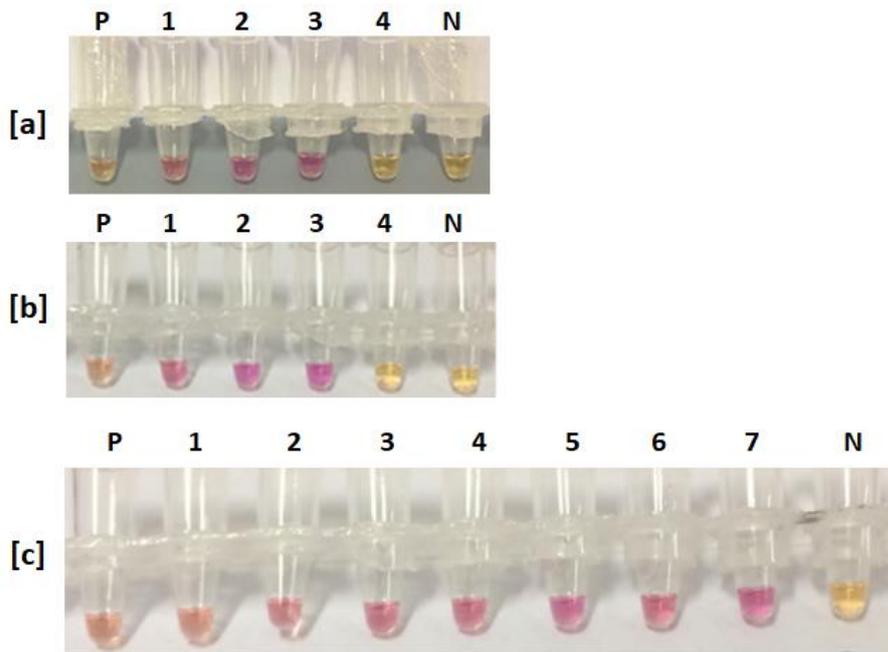


Figura 4. Detecção de *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* por LAMP em lotes de sementes de feijoeiro. (a) Sementes mantidas por 1 hora de repouso em solução salina. Tubos 1, 2 e 3, lotes de sementes contaminadas; Tubo 4, lote de semente sadia. (b) Sementes mantidas por 4 horas de repouso em solução salina. Tubos 1, 2 e 3, lotes de sementes contaminadas; Tubo 4, lote de semente sadia. (c) Parte dos lotes submetidos à 1 hora de repouso em solução salina Tubos 1-7, diferentes lotes de sementes contaminadas. P: controle positivo. N: controle negativo.

Literatura Citada

- Alavi, S. M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C., and Poussier, S. 2008. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3295-3301.
- Alhassan, A., Osei-Atweneboana, M.Y., Kyeremeh, K.F., Poole, C. B., Li, Z., Tettevi, E., Tanner, N. A., and Carlow, C. K. S. 2016. Comparison of a new visual isothermal nucleic acid amplification test with PCR and skin snip analysis for diagnosis of onchocerciasis in humans. *Mol. Biochem. Parasitol.* 210:10-12.
- Arroyo, M. I., Maestre, A., Carmona-Fonseca, J., Sosa, P. A., and Morales, G. P. 2008. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de *Plasmodium*: nueva técnica diagnóstica. *Med. UIS.* 21:158-175.
- Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H. C., and Gilbertson, R. L. 1994. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. *Phytopathology.* 84:1185-1192.
- Boureau, T., Kerkoud, M., Chhel, F., Hunault, G., Darrasse, A., Brin, C., Durand, K., Hajri, A., Poussier, S., Manceau, C., Lardeux, S., Saubion, S., and Jaques, M.-A. 2013. A multiplex-PCR assay for identification of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *J. Microbiol. Methods.* 92:42-50.
- Bühlmann, A., Pothier, J. F., Rezzonico, F., Smits T. H., Andreu, M., Boonham, N., Duffy, B., and Frey, J. E. 2013. *Erwinia amylovora* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight. *J. Microbiol. Methods.* 92:332-9.

- Claflin, L., Vidaver, A., and Sasser, M. 1987. MXP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Phytopathology*. 77: 730-734.
- Constantin, E., Cleenwerck, I., Maes, M., Baeyen, S., Van Malderghen, C., De Vos, P., and Cottyn, B. 2016. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathol.* 65:792-806.
- Dias, V. D., Fernandez, E., Cunha, M. G., Pieretti, I., Hincapie, M., Roumagnac, P., Comstock, J. C., and Rott, P. 2018. Comparison of loop-mediated isothermal amplification, polymerase chain reaction, and selective isolation assays for detection of *Xanthomonas albilineans* from sugarcane. *Trop. Plant Pathol.* 43:1-9.
- Francois, P., Tangomo, M., Hibbs, J., Bonetti, E. J., Boehme, C. C., Notomi, T., Perkins, M. D., and Schrenzel, J. 2011. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62:41-8.
- Grimault, V., Oliver, V., Rolland, M., Darrasse, A., and Jacques, M.-A. 2014. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris* (bean). *International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods.* 7:1-20.
- Hodgetts, J., Hall, J., Karamura, G., Grant, M., Studholme, D. J., Boonham, N., Karamura, E., and Smith, J. 2015. Rapid, specific, simple, in-field detection of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* by loop-mediated isothermal amplification. *J. Appl. Microbiol.* 119:1651-1658.
- Huang, W., Zhang, H., Xu, J., Wang, S., Kong, X., Ding, W., and Feng, J. 2017. Loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of

Ralstonia solanacearum phylotype I mulberry strains in China. *Front. Plant. Sci.* 8:76.

Jun-Hai., N., Yue-Rong, G., Jun-Mei, Y., Qing-Yun, L., Guang-Sui, Y., Cun, W., and Yu, R. 2015. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of bacterial blight pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*) in anthurium. *Eur. J. Plant Pathol.* 142:801-813.

Kado, C., and Heskett, M. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology.* 60:969-76.

Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E., and Suzutani, T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70:499-501.

Lang., J. M., Langlois, P., Nguyen, M. H. R., Triplett, L. R., Purdie, L., Holton, T. A., Djikeng, A., Cruz, C. M. V., Verdier, V., and Leach, J. E. 2014. Sensitive detection of *Xanthomonas oryzae* pathovars *oryzae* and *oryzicola* by loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:4519-4530.

Maringoni, A., Kimati, H., and Kurozawa, C. 1994. Variabilidade sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Summa Phytopathol.* 20:164-167.

Marques, A. S. D. A., Guimarães, P. M., Dos Santos, J. P., and Vieira, T. M. 2005. Sobrevivência e viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão armazenadas sob condições controladas. *Fitopatol. Bras.* 30:527.

Morisset, D., Pirc, M., Llop, P., Ravnikar, M., and Dreo, T. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for

detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. PLoS One 9:e96027.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28:e63-e63.

Palacio-Bielsa, A., López-Soriano, P., Bühlmann, A., Van Doorn, J., Pham, K., Cambra, M. A., Berruete, I. M., Pothier, J. F., Duffy, B., and Olmos, A. 2015. Evaluation of a real-time PCR and a loop-mediated isothermal amplification for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in plant tissue samples. J. Microbiol. Methods. 112:36-39.

Paradela Filho, O., Carvalho, A., and Pompeu, A. 1967. Occurrence of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burk.) Starr & Burk, in dry beans in the State of São Paulo. Bragantia. 26: 1-5.

Poole, C. B., Li, Z., Alhassan, A., Gueling, D., Diesburg, S., Tanner, N. A., Zhang, Y., Evans Júnior, T. C., La Barre, C., Wanji, S., Burton, R. A., and Carlow, C. K. S, 2017. Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP). PLoS One. 12:e0169011.

Rademaker, J., Louws, F., Schultz, M., Rossbach, U., Vauterin, L., and de Bruijn, F. J. 2005. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. Phytopathology. 95:1098-111.

Rava, C., Zimmermann, M., Rocha, M., and Yamada, T. 1988. Crestamento bacteriano comum. Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 420-443.

Robbs, C. 1954. A bacteriose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Distrito Federal. Agronomia. 12:445-8.

- Ryu, E. 1940. A Simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 17:58-63.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. *Proc. Am. Phytopathol. Soc. St. Paul, USA.*
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:494-518.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy G, Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K., and Vidaver, A. K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst App Microbiol* 29: 690-695.
- Tebaldi, N. D., Souza, R. M., and Machado, J. C. 2007. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi-seletivo. *Fitopatol. Bras.* 32:56-58.
- Tomlinson, J, Ostojca-Starzewska S, Webb K, Cole, J., Bames, A., Dickinson, M., and Boonham, N. 2013. A loop-mediated isothermal amplification-based method for confirmation of *Guignardia citricarpa* in citrus black spot lesions. *Eur. J. Plant Pathol.*136:217-24.

Toth, I., Hyman, L., Taylor, R., and Birch, P. 1998. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv. *phaseoli*. J. Appl. Microbiol. 85:327-336.

Vieira, C. 1983. Doenças e pragas do feijoeiro. Ed. Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Wang, H., and Turechek, W. 2016. A loop-mediated isothermal amplification assay and sample preparation procedure for sensitive detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry. PLoS One. 11: e0147122.

Conclusões Gerais

- O protocolo de PCR multiplex com os iniciadores específicos disponíveis foi eficiente na identificação simultânea dos isolados, diferenciando a linhagem fuscans das demais. A filogenia molecular com base nas sequências de dois genes permitiu discriminar as linhagens genéticas e confirmar a presença de todas as quatro linhagens no país, além de identificar uma nova espécie associada ao crestamento bacteriano comum no Brasil, *Xanthomonas cannabis* pv. *phaseoli*.
- De acordo com a análise dos genes efetores tipo III, um único haplótipo (perfil de presença/ausência de 15 efetores) foi detectado na linhagem fuscans. Quando avaliou-se a virulência nos genótipos de feijoeiro ficou evidente a existência de interação significativa isolado*genótipo, confirmando que o grau de resistência do genótipo de feijoeiro varia de acordo com o isolado analisado.
- A transmissão planta-semente dos patógenos Xcp e Xcc ao longo de duas gerações aparentemente não foi influenciada pelo genótipo do feijoeiro, e a redução da severidade da doença não implicou em redução da população bacteriana nas sementes.
- O método de amplificação isotérmica e detecção visual LAMP desenvolvido apresentou alta sensibilidade, especificidade, e eficiência na detecção das bactérias em sementes e folhas assintomáticas.

Perspectivas Futuras

- É importante realizar coletas mais representativas que englobem todas as regiões produtoras de feijão no país, para determinar qual espécie e linhagem genética prevalente no Brasil, além de investigar a distribuição da nova espécie, *X. cannabis* pv. *phaseoli*, em outras regiões.
- Desenvolver iniciadores específicos que possam ser incluídos na PCR multiplex, e que possibilitem a identificação em uma única etapa das diferentes linhagens genéticas e da espécie *X. cannabis* pv. *phaseoli*.
- Aprofundar os estudos da interação feijoeiro- *X. cannabis* pv. *phaseoli*, buscando observar o comportamento do patógeno em campo, no que se refere a ocorrência de sintomas, progresso da doença, e quantificação de danos e perdas na hospedeira, e também investigar os mecanismos de virulência da espécie e resistência genética na hospedeira.
- Incluir isolados de todas as linhagens genéticas para determinar a variabilidade quanto à virulência em diversos genótipos de feijoeiro, a fim de comprovar a existência de raças do patógeno.
- Avançar as gerações dos genótipos de feijoeiro em campo, para analisar o comportamento da população das bactérias ao longo do tempo. Obter também dados de rendimento de grãos, com o intuito de analisar a relação entre a população bacteriana nas sementes e o rendimento da cultura.
- Validar o método de LAMP para detecção precoce de Xcp e Xpp em amostras no campo.