III CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS COINTER - PDVAGRO 2018

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE DOENÇAS BACTERIANAS ASSOCIADAS A SEMENTES DE FEIJÃO

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BACTERIAL DISEASES ASSOCIATED WITH BEAN SEEDS

Apresentação: Pôster

Tarcisio Tomás Cabral de Sousa¹; Nicaele Teixeira dos Santos²; Thamires da Silva Freitas³
Thiago Ferreira Costa⁴; Janaína Fernandes Gonçalves⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/2526-7701.IIICOINTERPDVAGRO.2018.00375>

Introdução

O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com safras em torno 3,5 milhões de toneladas por ano (Fao, 2014). O feijoeiro é um produto típico da alimentação brasileira. Estima-se que o crescimento no consumo do feijão, deva aumentar cerca de 1,22% ao ano, no período 2009/2010 a 2019/2020 (Mapa, 2014).

O crescimento acelerado da produção, aliado à falta de conhecimento prévio sobre a resistência /suscetibilidade às doenças e pragas, colaboraram para o surgimento de várias doenças. Fato este, que culminou para a baixa produção do feijoeiro. Neste contexto, a crescente demanda da população humana por esta cultura, tem forçado a um significativo aumento do uso de pesticidas. Cultivado durante todo o ano, o feijoeiro é uma planta bastante vulnerável a ação dos agentes de ambiente, pois é afetado por inúmeras doenças, sejam elas de natureza abiótica (clima) ou biótica (micro-organismos), as quais depreciam a qualidade do produto (Kimati et al., 2005). Dentre as doenças bióticas, as de origem bacterianas, em especial, o cretamento bacteriano comum (CBC), cujo agente é *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) (Vauterin et al., 1995), apresenta maior importância econômica no Brasil (Rava e Sartorato, 1994), pois encontra-se disseminado em quase todas as regiões produtoras de feijão do país. O

¹ Doutorando em Ciência Florestal, UFVJM- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, tarcisiocox@hotmail.com

² Graduanda em Ciências Agrárias, UFVJM- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, nicaeletds@gmail.com

³ Graduanda em Ciências Agrárias, UFVJM- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, thamiresfreitas64@hotmail.com

⁴ Graduando em Agronomia, UFVJM- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, thiago.agrofc@gmail.com

⁵ Doutora, UFVJM- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, janaina.goncalves@ufvjm.edu.br

uso contínuo de produtos químicos para o controle de doenças em plantas, causa uma série de problemas ambientais um deles é a seleção de linhagens fúngicas e bactericidas resistentes (Martins, 2006). No entanto, o controle químico de doenças de plantas é, em muitos casos, a única alternativa eficiente e economicamente viável de garantir alta produtividade (Kimati, 1995). Como resultado, o uso abusivo desses produtos pode acarretar, em longo prazo, o surgimento de fitopatógenos resistentes às substâncias químicas utilizadas (Ghini e Kimati, 2000). Nosso Trabalho objetivou-se identificar e caracterizar uma coleção de fitopatógenos em culturas de feijão, na região de Unaí – MG, pela técnica de Multiplex – PCR.

Fundamentação Teórica

Estima-se que até 2020 o Brasil aumentará o consumo do feijão por cerca de 1,22% ao ano, passando de 3,7 milhões de toneladas para 4,31 milhões de toneladas. Entretanto, o crescimento acelerado da produção, aliado à falta de conhecimento prévio sobre a resistência / suscetibilidade às doenças e pragas, auxilia no surgimento de várias doenças. Logo, a crescente demanda da população humana por esta cultura, tem forçado o uso significativo de aumento do uso de pesticidas (Mapa, 2014; Fao, 2014). Técnicas de caracterização molecular como reação da polimerase em cadeia (PCR), possibilita a detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes e em materiais de propagação. Caso haja a detecção de fitopatógenos nas amostras, serão avaliados a atividade antimicrobiana, de plantas com efeito biocida, a fim de minimizar a utilização de insumos químicos na cultura.

Com a PCR é possível identificar uma pequena região de um gene *cry* de aproximadamente 400 a 600 pb. Além disso, a PCR permite identificar tamanhos de fragmentos distintos, mas, ela não permite comparar a estrutura primária desses fragmentos, neste sentido, várias bactérias fitopatogênicas tem sido identificada e caracterizada por PCR (Lu et al., 2014; López et al., 2015; Farahani e Taghavi, 2016). Em alguns desses estudos os autores têm analisado a atividade bactericida de plantas, pois além de ser ambientalmente segura torna-se urgentemente necessário (Benchouik et al., 2016; Shi et al., 2016). Estes produtos poderão ser produzidos e utilizados como biopesticidas na cultura do feijão.

Metodologia

Obtenção das amostras e sintomatologia

Sementes de feijão com sintomas de doenças bacterianas foram coletadas em fazendas produtoras da região de Unaí –MG e foram transportadas para o Laboratório de Solos, situado

no Campus do Instituto de Ciências Agrárias na mesma cidade e Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal pertencente a UFVJM.

Extração do DNA genômico e reação em cadeia da polimerase (PCR)

A extração de DNA total das células bacterianas foi realizada com base no protocolo descrito por Ausubel et al. (1992).

Cada uma das amostras de DNA previamente extraídas foram submetidas a amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para bactérias, descrito por Grilo (2009). (Tabela 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho. Fonte: GRILO (2009)

Filos	Oligonucleotídeos	Tamanho previsto de Pares de bases
Spirochaetes	5'CCAGACTCCTACGGGAGGCAG3' 5'CTCGTGCCGTGAGGTGTTGGG3'	720
Proteobacteria	5'AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTC3' 5'GCTGACGACAGCCATGCAGCACCT3'	720
Bacteroidetes	5'CAGACTCCTACGGGAAGGCAGCAG3' 5TAACCCGACACCTCACGGCACGAG'3'	720
Firmicutes	5'TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA3' 5'TGCGGGACTTAACCCAACATCTCA3'	570
Crenarchaeota	5'ATAAGCGGGGGGCAAGTCTGGTGTG3' 5'ACCTGCCGTGGCCCCCTCCTTCCT3'	690

Estas reações foram conduzidas em um volume final de 25 µL em um termociclador automático PTC 100 (MJ Researcher). Cada uma conterá 250 mM de cada um dos deoxinucleotídeos trifosfatos, 50 pM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1 U da enzima Taq DNA polimerase e 5 µL de tampão 10 x para PCR, contendo Mg²⁺. As amplificações foram iniciadas com um período de desnaturação do DNA a 94°C por 5 min. seguido por 30 ciclos compostos por: 45 s a 94°C, 30 s a 45°C, 50 s a 72°C.

Ao final, as amostras foram mantidas a 4° C no termociclador até a hora em que foram retiradas do equipamento. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,5% (m/v). Após a eletroforese o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado.

Resultados e Discussões

Análises genético-moleculares

Para o estudo genético molecular, inicialmente, doze isolados foram escolhidos de forma aleatória. As extrações de DNA resultaram em amostras com qualidade e integridade

satisfatórias, sendo necessária somente uma padronização na quantidade de células bacterianas utilizadas na extração. Inicialmente, foi utilizada uma quantidade de células excessiva, prejudicando o processo de extração de ácidos nucleicos. Provavelmente, à medida que a quantidade de células aumenta, também aumenta a quantidade de goma xantana, polissacarídeo produzido por espécies de *Xanthomonas*, dificultando ação dos reagentes e, conseqüentemente, a extração do material genético. Assim, para algumas bactérias, a quantidade de material inicial interfere diretamente no sucesso da extração. Após a redução da quantidade de células para uma massa de material equivalente a uma cabeça de alfinete, a obtenção de DNA foi possibilitada. (Figura 1).

Figura 1. Resultado das extrações de DNA dos isolados bacterianos obtidos de folhas de feijoeiro com sintomas.
Fonte: Própria

Reação de PCR

Foi realizada uma reação de amplificação individual com amostras de DNA. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L com a seguinte constituição final na reação: 0,2 mM de dNTPs (10 mM de cada deoxinucleotídeo), 0,4 pMoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (10 pMoles/ μ L), 1 U da enzima (*Taq* DNA polimerase 5 U/ μ L), 1X de tampão 10x para PCR (Tris-HCl 200 mM pH 8,4 e KCl 500 mM), 2 mM de Mg^{2+} ($MgCl_2$ 50 mM) e 30 ng do DNA molde

Essas reações foram submetidas a um processo de amplificação composto por um período de desnaturação do DNA a 94° C por 5 min, seguido de 35 ciclos, sendo cada um dos ciclos composto por 30 s a 94° C, 30 s a 41° C e 1 min a 72° C. Ao final dos ciclos de amplificação as amostras foram submetidas a uma extensão final de 7 min a 72° C.

A partir das amostras de DNA com qualidade e integridade satisfatórias, foi realizada a amplificação por PCR com os primers (Tabela 1), gerando fragmento de 720, 690 e 570 pb, aproximadamente, para 20 dos 21 isolados analisados neste estudo (Figura 2). Uma vez que um dos isolados não apresentou amplificação, o processo foi repetido apenas para a amostra A18, mas, não foi obtido êxito no processo de amplificação da mesma.

Figura 2: Resultado da amplificação do DNA dos isolados por meio da técnica de PCR com os primers específicos para o Filo *Proteobacteria*. *Xanthomonadales*. Fonte: Própria

Figura 3: Resultado da amplificação do DNA dos isolados por meio da técnica de PCR com os primers específicos para o Filo *Bacteroidetes*. Fonte: Própria

Figura 4: Resultado da amplificação do DNA dos isolados por meio da técnica de PCR com os primers específicos para o Filo *Firmicutes*. Fonte: Própria

A utilização da PCR permitiu a detecção de três diferentes filos de bactérias: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Logo, com base na presença de amplificação, referente ao Filo *Proteobacteria* é possível inferir, que existe uma grande probabilidade da presença da bactéria *Xanthomonas* por PCR, uma vez que este gênero pertence a este Filo.

Conclusões

Uma mesma mancha foliar pode conter diferentes isolados de uma mesma fitobactéria com diferentes graus de virulência. Pode-se concluir que existe micro-organismo de todos os filos e que em posteriores análise poderemos saber se existe polimorfismo entre esses micro-organismos, além de um possível identificação, caracterização de fitopatógenos em plantas, sendo considerado uma alternativa inovadora e um objeto de estudo importante no setor acadêmico.

Agradecimento: Pelo apoio CNPq e FAPEMIG

Referências

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: Greene Publishing Association; Wiley-Interscience, 1992. v.1.

BENCHOUIKH, A., ALLAM, T., KRIBI, A., AND KHADIJA, O. Morphological and biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and Antimicrobial Activity *in Vitro* of the Essential Oil of *Cinnamomum zeylanicum*, *Nigella sativa* and *Syzygium aromaticum* L. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**. v. 5, n.11, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ALIMENTOS MAPA. Technological solutions and innovation: **Embrapa in the International Year of Family Farming**, Brasília, DF, 2014.

FAO (2014), “**The State of Food and Agriculture 2014: Innovation in family farming**”, FAO, Rome, www.fao.org/3/a-i4040e.pdf.

FARAHANI, A.S., TAGHAVI, S.M. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* in geranium by real-time PCR. **Journal of plant protection research**, v. 56, n. 3, 2016.

FARAHANI, A.S., TAGHAVI, S.M. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* in geranium by real-time PCR. **Journal of plant protection research**, v. 56, n. 3, 2016.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**. 78P, 2000.

GRILO, A.M.S. **Caracterização molecular de populações microbianas em reactores anaeróbio**. 2009. Tese (Mestrado em Microbiologia Aplicada Lisboa 2009. 42p) Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências departamento de biologia vegetal.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia Doenças das plantas cultivadas**. Vol.2, São Paulo: Editora Ceres, 275p, 2005.

LÓPEZ, M.C., GONZÁLEZ, D.R., GUTIÉRREZ, L.Z., ZUBIAUR, Y.M., COCA, B.M. Detección e identificación de nuevos aislados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* en cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia Mayabeque, Cuba. **Rev. Protección Veg**, v. 30, n. 2 p. 97-103, 2015.

LU, W., PAN, L., ZHAO, H., JIA, Y., WANG, Y., YU, X., WANG, X. Molecular detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, and *Burkholderia glumae* in infected rice seeds and leaves. **The Crop Journal**, v. 2, p.398 -406, 2014.

MARTINS, D.A. Uso de extratos à base de algas para controlar a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) do feijoeiro. 49f. **Monografia (Graduação em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias**, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA/ACS). Projections of agribusiness: Brazil 2013/14 to 2023/24 **Long-term Projections**, Brasília, 2014.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Ed.). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, 1994. 300 p.

SHI, W., LI, C., LI, M., ZONG, X., HAN, D., CHEN, Y. Antimicrobial peptide melittin against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.100, p.5059–5067, 2016.

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