

DULÂNDULA SILVA MIGUEL WRUCK

**ANÁLISES BIOQUÍMICA, PATOGÊNICA, SOROLÓGICA E
MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

W958a
2001

Wruck, Dulândula Silva Miguel, 1969-

Análises bioquímica, patogênica, sorológica e molecular de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / Dulândula Silva Miguel Wruck. Viçosa: UFV, 2001.
62p.: il.

Orientador: José Rogério de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Brássica - Doenças e pragas - Controle. 2. Brassica – Resistência a *Xanthomonas campestris*. 3. *Xanthomonas campestris* - Variabilidade genética. 4. *Xanthomonas campestris* – Análise. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 635.642932

CDD 20.ed. 635.642932

DULÂNDULA SILVA MIGUEL WRUCK

**ANÁLISES BIOQUÍMICA, PATOGÊNICA, SOROLÓGICA E
MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 6 de julho de 2001.

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Conselheiro)

Prof. José Mário da Silveira Mezêncio
(Conselheiro)

Prof. Luiz Antônio dos Santos Dias

Prof. Ulisses Gomes Batista

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Presidente da Banca)

A Deus.

Ao meu marido, Flávio, pelo companheirismo, apoio e estímulo.

A minha fonte de alegria, Thales.

Aos meus pais, Milton e Margarida, pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Rogério de Oliveira, amigo e orientador, pelo apoio, pela confiança e pelo estímulo, além das sugestões, orientações e providências durante todo o Programa.

Ao professor Reginaldo da Silva Romeiro, pela contribuição, por meio de orientações, ensinamentos e conselhos, desde a fase inicial deste trabalho.

Ao professor Francisco Murilo Zerbini Júnior, pelas valiosas contribuições e pelas críticas e sugestões.

Ao professor José Mário da Silveira Mezêncio, pelos conhecimentos, pela colaboração e pelas sugestões, que aperfeiçoaram esta pesquisa.

Aos professores Murilo Geraldo de Carvalho, Ulisses Gomes Batista e Luiz Antônio dos Santos Dias, pelas sugestões e pelo apoio.

Aos técnicos Maria Sueli de Oliveira Cardoso, José Luís Soares Monteiro e Francisco Antônio Balbino, pelo auxílio e pelo apoio na execução deste trabalho.

A Adriana Araújo Costa Truta e Dyana Alves Henriques, pelo tempo dispensado e auxílio nas análises finais.

Aos colegas do Programa, pelo agradável convívio e pela amizade.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos valiosos ensinamentos.

Aos funcionários dos laboratórios, da secretaria e da casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia, pela cooperação.

À Universidade Federal de Viçosa e, em especial, ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Programa e pelas condições oferecidas para a execução desta pesquisa.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa de estudos concedida.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e à Fazenda Experimental Getúlio Vargas (CTTP), pelo apoio.

Ao amigo José Lannes pela ajuda indispensável na finalização desse trabalho.

Aos meus pais, pela vida, pelo constante estímulo, pelos sacrifícios e pelo incentivo durante todos esses anos de estudo.

Ao meu marido Flávio Jesus Wruck, pelo carinho, pelo incentivo e pelo incondicional apoio em todos os momentos.

Ao meu filho Thales Miguel Wruck, cujo sorriso muitas vezes foi a minha fonte de perseverança, pelo estímulo.

A Deus, meu provedor de energia, pela fé e perseverança, presentes em todos os momentos.

A todos que, direta ou indiretamente, deram sua contribuição para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Dulândula Silva Miguel Wruck, filha de Milton José Miguel e Maria Margarida Silva Miguel, nasceu em 28 de abril de 1969, na cidade de Mogi das Cruzes, São Paulo.

Em agosto de 1993, graduou-se em Agronomia, pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais. Em setembro do mesmo ano, iniciou treinamento como bolsista de aperfeiçoamento no Departamento de Fitopatologia. Em fevereiro de 1997, concluiu o Curso de Mestrado em Fitopatologia.

Em março de 1997, iniciou o Curso de Doutorado em Fitopatologia, nesta mesma instituição.

Em março de 1999, foi admitida pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, no Centro Tecnológico do Triângulo e Alto Paranaíba, em Uberaba-MG, onde trabalha ultimamente.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Importância da doença	3
2.2. Sintomas da doença	3
2.3. Etiologia e taxonomia	4
2.4. Epidemiologia	7
2.5. Sorologia.....	8
2.6. Marcadores moleculares.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Origem e cultivo dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	11
3.2. Comprovação da fitopatogenicidade dos isolados.....	13
3.2.1. Preparo do inóculo	13
3.2.2. Inoculação artificial.....	13

	Página
3.3. Preservação dos isolados	13
3.4. Caracterização bioquímica dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	14
3.4.1. Testes bioquímicos	14
3.4.2. Variabilidade dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> com base na atividade de esterase.....	14
3.4.3. Sensibilidade dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> a alguns antibióticos.....	15
3.4.4. Produção de bacteriocinas.....	15
3.5. Caracterização patogenicidade dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	16
3.5.1. Inoculação cruzada.....	16
3.6. Caracterização sorológica dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	17
3.6.1. Preparo do imunógeno.....	17
3.6.2. Preparo do adjuvante incompleto de Freund.....	17
3.6.3. Imunização dos coelhos.....	18
3.6.4. Obtenção dos antissoros policlonais.....	18
3.6.5. Determinação dos títulos de aglutinação e precipitação dos antissoros.....	19
3.6.5.1. Preparo do antígeno particulado.....	19
3.6.5.2. Preparo do antígeno solúvel.....	19
3.6.6. Reação de aglutinação e precipitação.....	19
3.6.7. Especificidade dos anticorpos.....	20
3.6.8. Estudo do relacionamento sorológico.....	20
3.7. Caracterização molecular dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	21
3.7.1. Extração do DNA total dos isolados.....	21
3.7.2. Análise de RAPD.....	22
3.7.3. Extração do DNA plasmidial.....	22
3.8. Análise conjunta dos resultados.....	24
3.9. Análises estatísticas.....	24

	Página
3.9.1. Análise univariada.....	24
3.9.2. Análise multivariada.....	24
3.9.2.1. Análise de agrupamento.....	25
3.9.2.2. Análise de escala multidimensional.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Caracterização bioquímica dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	26
4.1.1. Testes bioquímicos.....	26
4.1.2. Variabilidade dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> com base na atividade de esterase.....	31
4.1.3. Sensibilidade dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> a alguns antibióticos.....	33
4.1.4. Produção de bacteriocinas.....	37
4.2. Caracterização patogênciã dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	38
4.2.1. Inoculação cruzada em diferentes brássicas.....	38
4.3. Caracterização sorológica dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	43
4.3.1. Reaçã de aglutinaçã e de precipitaçã.....	43
4.3.2. Especificidade dos anticorpos.....	44
4.3.3. Estudo do relacionamento sorológico.....	44
4.4. Caracterizaçã molecular dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	48
4.4.1. Análise de RAPD.....	48
4.4.2. Extraçã do DNA plasmidial.....	48
4.5. Análise conjunta dos resultados	49
5. RESUMO E DISCUSSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

RESUMO

MIGUEL-WRUCK, Dulândula Silva, D.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2001. **Análises bioquímica, patogênica, sorológica e molecular de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. Orientador: José Rogério de Oliveira. Conselheiros: Reginaldo da Silva Romeiro, Francisco Murilo Zerbini Júnior e José Mário da Silveira Mezêncio.

Trinta e três isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, obtidos de oito diferentes brássicas, provenientes de diferentes regiões do Brasil e do exterior, foram analisados com base em caracterizações bioquímica, patogênica, sorológica e genética, objetivando verificar a existência ou não de relacionamentos quanto à origem geográfica e ao hospedeiro. No estudo bioquímico, foram realizados 22 testes, além da avaliação da atividade de esterase, em que com base no tamanho do halo e utilizando o teste de Scott Knott no nível de 5% de probabilidade, obtiveram-se cinco grupos de similaridade. Avaliando a capacidade de produção de bacteriocina, verificou-se que três isolados apresentaram antibiose contra sete outros. Avaliou-se, também, a sensibilidade dos isolados a alguns antibióticos e, com base na análise de agrupamento, foi possível a observação de três grupos distintos: o primeiro constituído por quatro isolados resistentes a 11 ou mais antibióticos; o segundo grupo composto por um isolado resistente somente a três antibióticos; e o terceiro grupo composto pelos demais isolados. Na caracterização patogênica, foi realizada a inoculação

cruzada, de forma que os 33 isolados foram inoculados artificialmente em sete diferentes brássicas. Desses, 14 não mostraram especificidade quanto aos hospedeiros, enquanto os 19 isolados restantes apresentaram relativo grau de especificidade, uma vez que não causaram doença em uma ou mais das brássicas inoculadas. Para a análise sorológica, foram obtidos sete antissoros, pelos quais se reconheceram, no teste de imunodifusão dupla, 32 dos 33 isolados estudados, além de mostrarem especificidade quanto ao reconhecimento dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris*. Na caracterização molecular, realizou-se a extração do DNA total de todos os isolados, seguida de amplificação pela técnica do RAPD. Procedeu-se, também, à extração do DNA plasmidial. Para avaliação do comportamento dos 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* de diferentes origens e hospedeiros, com relação às diferentes análises realizadas, foram efetuadas análises estatísticas univariadas, para a avaliação da atividade de esterase, e multivariadas, para as demais, bem como a análise conjunta de todos os resultados. Com base nos resultados das caracterizações bioquímica, patogênica e sorológica, não se observou correlação da variabilidade dos isolados estudados com a origem geográfica e o hospedeiro do qual foram obtidos. Isso pode ter sido devido à constante introdução de novos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* nas áreas de plantio, por meio de sementes contaminadas.

ABSTRACT

MIGUEL-WRUCK, Dulândula Silva, D.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2001. **Biochemical, pathogenic, serological and molecular analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates.** Advisor: José Rogério de Oliveira. Committee Members: Reginaldo da Silva Romeiro, Francisco Murilo Zerbini Júnior and José Mário da Silva Mezêncio.

Thirty-three isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, obtained from eight different *Brassica* species and originated from distinct geographic regions in Brazil and other countries, were analyzed in terms of their biochemical, pathogenic, serological and molecular properties, in order to determine whether there is a relationship between isolate variability and host or geographic origin. Twenty-two biochemical tests, besides the determination of sterase activity, were carried out for the biochemical characterization. Five similarity groups were identified using Scott-Knot's test at 5% probability. The analysis of bacteriocin production indicated that three isolates displayed antibiosis against seven other isolates. Sensitivity to several antibiotics was also evaluated. Using cluster analysis, three distinct groups were identified: the first group consisted of four isolates which were resistant to 11 or more antibiotics; the second group consisted of one isolate which was resistant to only one antibiotic; the third group consisted of all the other remaining isolates. For the pathogenic characterization, all 33 isolates were cross-inoculated onto seven different

Brassica species. Fourteen isolates did not display host specificity. The remaining 19 isolates displayed a relative degree of host specificity, since they did not induce disease in one or more of the inoculated species. Seven polyclonal antisera were raised for the serological analysis. In immunodiffusion tests, 32 out of the 33 isolates tested were recognized by these antisera. The antisera specifically recognized isolates of *X. campestris* pv. *campestris*. For the molecular characterization, total DNA was extracted from each isolate and used as a template for RAPD reactions. Plasmid DNA was also extracted. Together, the data from the biochemical, pathogenic, serological and molecular analyses failed to indicate a relationship among the isolates, hosts and geographic origin. This could be due to the repeated introduction of new isolates of *X. campestris* pv. *campestris* into different geographic regions, via contaminated seeds.

1. INTRODUÇÃO

A família Brassicaceae (= Cruciferae) compreende 3.500 espécies, agrupadas em 350 gêneros, mas as espécies economicamente importantes estão no gênero *Brassica*: *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. juncea* e *B. napus* (Warwick e Francis, 1994, citados por WESTMAN et al., 1999). Além de sua importância como hortaliças, são utilizadas em adubação verde, como forrageiras, condimentos e na produção de óleo a partir das sementes (VILELA, 1983).

No Brasil, a cultura das brássicas tem maior expressão na região Centro-Sul, notadamente em São Paulo, no Rio de Janeiro e em Minas Gerais (SIQUEIRA, 1981; VILELA, 1983). Dentre as brássicas, o repolho, a couve comum, a couve-flor, o rabanete e o brócolos têm se expandido consideravelmente nos últimos anos. O volume comercializado nas Centrais de Abastecimento de Minas Gerais foi de 69,5 t no período de janeiro a dezembro de 2000, movimentando R\$ 16.539.067,00 (AGRIDATA, 2000).

A podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel, 1895) Dowson 1939 (FAHY e PERSLEY, 1983), é considerada a principal doença das brássicas. A forma mais importante de disseminação do patógeno é por meio de sementes contaminadas (SCHAAD e ALVAREZ, 1993; RODRIGUES NETO e MALAVOLTA JR., 1995). As sementes constituem a principal fonte de inóculo primário de *X. campestris* pv. *campestris*, e, portanto,

um dos métodos mais eficientes de controle da doença é o uso de sementes livres do patógeno.

Vários métodos têm sido empregados para detectar *X. campestris* pv. *campestris* em sementes, como o teste de crescimento, a deposição de sementes em ágar, os testes sorológicos e a extração, seguida da semeadura em meio semi-seletivo (SAETTLER et al., 1989). De maneira geral, nenhum desses métodos, com exceção da semeadura em meio de cultura, tem sido completamente aceito como teste de rotina em análise de sementes, por apresentar baixa sensibilidade e grande demanda de tempo (SAETTLER et al., 1989).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* tem sido muito estudada em alguns países, principalmente nos Estados Unidos. No Brasil, informações básicas acerca dos isolados que aqui ocorrem são escassas. Tais informações são importantes para a realização de pesquisas aplicadas, que permitam a obtenção de métodos de rotina para diagnose rápida da doença, e detecção do patógeno em sementes; e trabalhos de melhoramento visando resistência etc.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade de 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, com base em caracterizações bioquímica, patogênica, sorológica e molecular, verificando-se a existência ou não de relação da variabilidade encontrada com a origem geográfica do isolado e com a planta hospedeira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da doença

A podridão negra é a doença mais comum e, também, a mais importante em repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) e em outras brássicas, como couve comum (*B. oleracea* var. *acephala*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), brócolos (*B. oleracea* var. *italica*) e rabanete (*Raphanus sativus*), principalmente em cultivos de verão. É mais importante em repolho e couve, pois as folhas, que são as partes comercializadas, são também as partes mais afetadas pela doença (LOPES e QUEZADO-SOARES, 1997). No Brasil, sua distribuição é generalizada, sendo encontrada praticamente em todas as regiões produtoras, em razão de a bactéria ser transmitida por sementes e por mudas contaminadas (RODRIGUES NETO e MALAVOLTA JR., 1995).

2.2. Sintomas da doença

A origem do nome “podridão negra” deve-se ao fato de as plantas infectadas por *X. campestris* pv. *campestris* apresentarem-se, na maioria das vezes, apodrecidas e negras no final da infecção (SCHAAD e ALVAREZ, 1993).

Quando a penetração da bactéria se dá pelos hidatódios, aparece nas folhas um amarelecimento em forma de “V”, acompanhado de descoloração das nervuras, que se tornam escurecidas. Pelas nervuras, a bactéria atinge o caule da planta, observando-se o escurecimento dos vasos (SCHAAD e ALVAREZ, 1993; RODRIGUES NETO e MALAVOLTA JR., 1995).

Quando a infecção resulta de sementes contaminadas, os sintomas são observados inicialmente nos cotilédones, que ficam com os bordos escurecidos. Posteriormente, a infecção se estende para o caule e as raízes, havendo comprometimento do crescimento ou, mesmo, morte das plantas. Frequentemente pode ocorrer o apodrecimento da medula, como resultado da associação de *X. campestris* pv. *campestris* a microrganismos secundários, inclusive *Erwinia* sp. (RODRIGUES NETO e MALAVOLTA, 1995).

2.3. Etiologia e taxonomia

A podridão negra das brássicas é causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel, 1895) Dowson 1939.

Segundo ROBBS e RODRIGUES NETO (1993), nos compêndios de fitobacteriologia menciona-se a primeira descrição de uma bactéria que atualmente seria incluída no gênero *Xanthomonas*, feita por Wakker, em 1881, quando ele relatou a descoloração amarelada dos jacintos, com posterior descrição do patógeno. Em 1898, *X. campestris* pv. *campestris* foi relatada em repolho (*B. oleracea* var. *capitata*) nos Estados Unidos (Russel, 1898, citado por HUNTER et al., 1987).

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* são gram-negativas, com forma de bastonetes retos, medindo cerca de 0,4-0,7 x 0,7-1,6 µm, e móveis por um simples flagelo polar. São quimiorganotróficas, aeróbicas estritas e não contêm inclusões visíveis de poli-beta-hidroxibutirato ou outros produtos de reserva. As colônias em nutriente ágar são lisas, circulares, apresentando crescimento mucoso; são usualmente amarelas, com algumas estirpes apigmentadas. Apresentam catalase positiva, oxidase negativa ou fraca e

asparagina não é utilizada como fonte de carbono e nitrogênio (BRADBURY, 1986).

Uma característica taxonômica importante do gênero *Xanthomonas* é a propriedade de a maioria de seus membros apresentar pigmentos amarelos, denominados xanthomonadinas, que são ésteres de arilpolieno bromados, não-hidrossolúveis, presentes na parede da célula bacteriana, com absorção máxima em metanol nos comprimentos de onda de 420, 440 e 468 nm (KRIEG e HOLT, 1984; ROBBS e RODRIGUES NETO, 1993; ROMEIRO, 1995; SCHAAD et al., 2001). A importância da descoberta das xanthomonadinas está no fato de elas ocorrerem apenas no gênero *Xanthomonas*, podendo, portanto, ser empregadas como marcador taxonômico, o que distingue as espécies de *Xanthomonas* de outras fitobactérias formadoras de pigmentos amarelados e pertencentes a outros gêneros (*Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*) (ROBBS e RODRIGUES NETO, 1993).

O gênero *Xanthomonas* Dowson 1939, até 1995, era constituído por cinco espécies – incluindo o tipo *X. campestris* (Pammel) Dowson – listadas na “Approved List of Bacterial Names” de 1980 (SKERMAN et al., 1980): *X. albilineans*, *X. ampelina*, *X. axonopodis*, *X. campestris* e *X. fragariae*.

Mais de 100 patógenos distintos, pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, têm sido designados como patovares de *X. campestris*. O termo patovar foi proposto em 1978 (YOUNG et al., 1978) como uma das maneiras de preservar os nomes das fitobactérias para as quais dados fenotípicos adequados não estavam disponíveis para diferenciá-las das outras espécies. Esse termo não tem "status" taxonômico no Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (DYE et al., 1980; SNEATH, 1992). Desde 1980, têm sido propostas várias mudanças relacionadas à nomenclatura e taxonomia do gênero *Xanthomonas*. VAUTERIN et al. (1993, 1995) fizeram a proposta mais abrangente para a reclassificação de *Xanthomonas*, com base em análises nutricionais, ácidos graxos e homologia DNA/DNA. De acordo com essa proposta, o gênero passaria a ter 21 espécies, e vários patovares de *X. campestris* seriam reclassificados como patovares de *X. axonopodis*. SCHAAD et al. (2000) analisaram a proposta de VAUTERIN et al.

(1995) e não concordaram em grande parte com a ela. SCHAAD et al. (2001), no “Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition”, aceitaram a proposta de VAUTERIN (1995), em parte concordando com a maioria das recomendações de SCHAAD et al. (2000), listando 11 espécies no gênero *Xanthomonas* e retendo a maioria dos patovares de *X. campestris*.

Freqüentemente, o nome de um patovar é determinado em função do hospedeiro do qual a fitobactéria foi isolada. Essas designações podem ser problemáticas, porque o hospedeiro primário pode ser diferente daquele do qual se fez o isolamento; sabe-se, por exemplo, que alguns patovares de *X. campestris* são patogênicos a mais de um hospedeiro. Como as informações patogênicas são baseadas primariamente em uma resposta fenotípica do hospedeiro e em poucas propriedades intrínsecas da bactéria, os nomes de patovares podem ou não refletir um relacionamento filogenético (CHEN et al., 1994).

Várias técnicas têm sido usadas, com variado grau de sucesso, para diferenciar patovares de *X. campestris* ou subgrupos, sem a condução de testes de patogenicidade. Têm-se utilizado hibridização DNA-DNA (Hildebrand et al., 1990, citados por ALVAREZ et al., 1994), sorologia (ALVAREZ e LOU, 1985; THAVEECHAI e SCHAAD, 1986; GOTTWALD et al., 1991), tipagem de fagos (LIEW e ALVAREZ, 1981), análise eletroforética de proteínas da membrana (SDS-PAGE) (MINSAVAGE e SCHAAD, 1983), análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa (MAAS et al., 1985), digestão de DNA (HARTUNG e CIVEROLO, 1987; LAZO e GABRIEL, 1987) e análise por RFLP (LAZO e GABRIEL, 1987; GOTTWALD et al., 1991). Algumas dessas técnicas possuem problemas de aplicabilidade, porque freqüentemente as respostas são específicas do isolado em estudo (LAZO e GABRIEL, 1987). Dentre essas técnicas, SDS-PAGE e sorologia têm sido usadas, buscando-se determinar diferenças entre isolados de *X. campestris* pv. *campestris* e isolados de *X. campestris* pv. *armoraciae* (ALVAREZ et al., 1994). *X. campestris* pv. *armoraciae* também é patogênica a brássicas, causando mancha foliar nesses hospedeiros (BRADBURY, 1986). Entretanto, não há conhecimento das diferenças genéticas

entre estes dois grupos de patógenos que levam à ocorrência de sintomas distintos: *X. campestris* pv. *campestris* coloniza o sistema vascular e é capaz de se movimentar sistemicamente na planta, enquanto *X. campestris* pv. *armoraciae* não é um patógeno sistêmico, causando lesões foliares limitadas pelos vasos (CHEN et al., 1994).

2.4. Epidemiologia

As bactérias fitopatogênicas só penetram em hospedeiros passivamente, ou seja, necessitam de aberturas naturais ou ferimentos para que possam penetrar e, assim, colonizar o tecido hospedeiro.

Temperaturas entre 28 e 30 °C e a presença de água de irrigação, de chuva ou de condensação são favoráveis à penetração de *X. campestris* pv. *campestris*. A penetração ocorre através de aberturas naturais (estômatos e hidatódios) ou por ferimentos provocados na superfície da parte aérea (MARINGONI et al., 1997).

A bactéria pode estar presente no solo (onde sobrevive por curtos períodos) e em restos de cultura, bem como em brássicas silvestres, como epífitas. Entretanto, as sementes são a principal fonte de inóculo (SCHAAD e ALVAREZ, 1993; RODRIGUES NETO e MALAVOLTA JR., 1995).

Num programa de produção de sementes de brássicas, procura-se obter material, do ponto de vista sanitário, o mais sadio possível. Dessa forma, é necessário o uso freqüente de testes para detecção de patógenos nas sementes, como *X. campestris* pv. *campestris*. Segundo SCHAAD (1980), a tolerância estabelecida para esse patógeno é menos de três sementes infectadas em 10.000 (0,03%), para semeadura direta no campo, mas, para produção de mudas, a tolerância deveria ser zero. Essa tolerância baixa é necessária, pois sementes contaminadas podem originar mudas com infecção sistêmica sem sintomas externos (IGNATOV et al. 1999), que atuam como fonte de inóculo, e este, aliado à irrigação por aspersão, tem grande impacto na taxa de disseminação do patógeno durante a produção de mudas (ROBERTS et al., 1999).

Um grande problema para os produtores de sementes de brássicas é a capacidade de *X. campestris* pv. *campestris* sobreviver em plantas daninhas, sendo estas, portanto, uma fonte de inóculo do patógeno. No Estado da Georgia (EUA), a doença foi encontrada em *B. campestris*, *Lepidium virginicum*, *Coronopus didymus* e *R. sativus*. Na Califórnia (EUA), a bactéria foi encontrada também em *B. geniculata*, *B. nigra* e *Cardaria pubescens* (SCHAAD e DIANESE, 1981). Nesses casos, não se devem implantar novos cultivos próximos aos velhos e, ou, em campos onde existam essas plantas daninhas (WILLIAMS, 1980).

2.5. Sorologia

As técnicas sorológicas, embora apresentem pequeno valor na classificação de bactérias, devido à grande diversidade imunogênica, têm papel muito importante nos estudos epidemiológicos e constituem ferramenta útil na rotina de um laboratório (JONES e KRIEG, 1986), pois estão bem adaptadas para identificação rápida e acurada de bactérias, principalmente aquelas isoladas de sementes (AZAD e SCHAAD, 1988).

A utilização de testes sorológicos em bacteriologia vegetal foi iniciada por Ziffelt em 1912, na Alemanha, o qual demonstrou a existência de correlação sorológica entre raças de *Rhizobium* de várias espécies de leguminosas (Link e Sharp, 1927, e Goldsworthy, 1928, citados por MARINGONI e KIMATI, 1997).

SCHAAD (1979) discutiu o uso da sorologia na identificação de bactérias fitopatogênicas para gênero, espécie e, em alguns casos, para isolados dentro da mesma espécie.

Dentre as técnicas sorológicas utilizadas na fitobacteriologia, destaca-se a imunofluorescência, pois, devido à sua grande sensibilidade, permite a detecção de pequeno número de células da bactéria-alvo (1-10 ufc/100 µL) (SCHAAD, 1978; ALVAREZ et al., 1997), sendo muito utilizada em programas de rotina de indexação de sementes (FRANKEN et al., 1993).

Segundo ALVAREZ e LOU (1985), para *X. campestris* pv. *campestris*, técnicas sorológicas como o “double-antibody sandwich” (DAS)-ELISA podem ser úteis quando for necessário detectar o patógeno em grande número de amostras, pois o tempo de análise é reduzido de 3-5 dias para 5 horas, em relação ao uso de meio semi-seletivo.

2.6. Marcadores moleculares

Sondas de ácido nucléico são ferramentas diagnósticas eficientes para a detecção de agentes infecciosos, devido à seqüência específica da molécula de ácido nucléico. As condições que permitem a sonda se ligar somente nas seqüências homólogas da amostra de DNA previnem a reação cruzada com o DNA de organismos não relacionados. Além disso, a estrutura do DNA é relativamente consistente, ao passo que a produção de outras macromoléculas, como proteínas, carboidratos e lipídios, pode mudar em decorrência de alterações no ambiente, por exemplo o meio de crescimento (GILBERTSON et al., 1989).

PROSEN et al. (1993) desenvolveram um método de PCR para detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* em sementes de feijão. Utilizando o método RFLP do DNA genômico e plasmidial, LAZO e GABRIEL (1987) diferenciaram vários grupos de *Xanthomonas*, incluindo alguns isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria*. GILBERTSON et al. (1989) trabalharam com DNA plasmidial e fragmentos de DNA plasmidial clonados de *X. campestris* pv. *phaseoli* como sondas para detecção de *X. campestris* pv. *phaseoli* e *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (agentes causais do cretamento bacteriano comum do feijoeiro) em folhas e em restos culturais de feijão.

Oligonucleotídeos para PCR, tendo como alvo o DNA genômico, foram selecionados por LI e DeBOER (1995), para detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* em batata. VERDIER et al. (1998) detectaram *X. axonopodis* pv. *manihotis* em tubérculos de mandioca utilizando PCR.

Plasmídios são moléculas de DNA, geralmente circulares, menores que o cromossomo bacteriano, com mecanismo de replicação independente e que

podem ser transferidos de uma célula bacteriana para outra, por meio de um processo de recombinação genética denominado conjugação (DAWES e SUTHERLAND, 1992; ALBERTS et al., 1994). Muitos dos plasmídios que ocorrem em bactérias fitopatogênicas não têm qualquer função fenotípica conhecida (Coplin, 1983, citado por CIVEROLO, 1985). Estudos realizados com vários patovares de *X. campestris* indicam que há alto grau de conservação de seqüência em plasmídios de alguns patovares (LAZO e GABRIEL, 1984; 1985; 1987; GABRIEL, 1985).

Em *X. axonopodis* pv. *citri*, encontraram-se pelo menos seis plasmídios sem função fenotípica específica associada (CIVEROLO, 1985). Entretanto, segundo esse autor, o perfil de plasmídios pode ser útil em estudos epidemiológicos desse patógeno, suplementando outros métodos de detecção e identificação bacteriana. Além disso, a presença desses plasmídios pode ser útil para avaliar o relacionamento entre isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* associados com as diferentes formas de cancro cítrico.

Importantes informações epidemiológicas têm sido obtidas a partir de perfis de plasmídios de grande número de isolados de outros patógenos. Por exemplo, Noble e Rahman (1986), citados por CANTEROS et al. (1995), determinaram perfis de plasmídios em isolados de *Staphylococcus aureus* que haviam sido isolados 25 anos antes. As características epidemiológicas de tipagem de fago, a sensibilidade a antibióticos e a localização geográfica foram associadas com os dados de plasmídios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem e cultivo dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram obtidos por doação de pesquisadores brasileiros e do exterior e por meio de isolamento nos Laboratórios de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (Quadro 1).

Quadro 1 - Origem dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* utilizados para as análises bioquímica, patogênica, sorológica e molecular

Código	Origem	Hospedeiro	Doador	Instituição
1	Paraná	<i>Brassica rapa</i>	V.A. Malavolta JR.	Instituto Biológico
2	Paraná	<i>B. rapa</i>	V.A. Malavolta JR.	Instituto Biológico
3	Minas Gerais	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	A. Reis	CNPH/EMBRAPA
4	Minas Gerais	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	D.S. Miguel-Wruck	UFV-EPAMIG
5	Minas Gerais	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	A. Reis	CNPH/EMBRAPA
6	São Paulo	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	D.S. Miguel-Wruck	UFV-EPAMIG
7	Minas Gerais	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	D.S. Miguel-Wruck	UFV-EPAMIG
8	Minas Gerais	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	R.M. Souza	UFLA
9	Rio Grande do Sul	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	A.M. Bacarin	UFPEL
10	Distrito Federal	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	C.A. Lopes	CNPH/EMBRAPA
11	Distrito Federal	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	C.A. Lopes	CNPH/EMBRAPA
12	Minas Gerais	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	D.S. Miguel-Wruck	UFV-EPAMIG
13	Minas Gerais	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	D.S. Miguel-Wruck	UFV-EPAMIG
14	São Paulo	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	L.O.S. Beriam	Instituto Biológico
15	São Paulo	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	L.O.S. Beriam	Instituto Biológico
16	São Paulo	<i>B. chinensis</i>	V.A. Malavolta JR.	Instituto Biológico
17	Espírito Santo	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	D.S. Miguel-Wruck	UFV-EPAMIG
18	Espírito Santo	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	D.S. Miguel-Wruck	UFV-EPAMIG
19	Minas Gerais	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	A. Reis	CNPH/EMBRAPA
20	Santa Catarina	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	A. Reis	CNPH/EMBRAPA
21	Minas Gerais	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	A. Reis	CNPH/EMBRAPA
22	São Paulo	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongyloides</i>	V.A. Malavolta JR.	Instituto Biológico
23	Minas Gerais	<i>Raphanus sativus</i>	D.S. Miguel-Wruck	UFV-EPAMIG
24	Paraná	<i>R. sativus</i>	V.A. Malavolta JR.	Instituto Biológico
25	EUA	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	T. Isakeit	Texas A&M University, College Satation
26	EUA	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	T. Isakeit	Texas A&M University, College Satation
27	Espírito Santo	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	D.S. Miguel-Wruck	UFV-EPAMIG
28	Minas Gerais	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	D.S. Miguel-Wruck	UFV-EPAMIG
29	Santa Catarina	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	A. Reis	CNPH/EMBRAPA
30	Minas Gerais	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	A. Reis	CNPH/EMBRAPA
31	Espírito Santo	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	D.S. Miguel-Wruck	UFV-EPAMIG
32	São Paulo	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	J.R. Neto	Instituto Biológico
33	São Paulo	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	I.G.M. Almeida	Instituto Biológico

3.2. Comprovação da fitopatogenicidade dos isolados

3.2.1. Preparo do inóculo

Os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram cultivados em placas de Petri contendo meio 523 de KADO e HESKETT (1970). Após incubação a 28 ± 1 °C por aproximadamente 24 horas, preparou-se uma suspensão bacteriana em solução salina (NaCl 0,85%), cuja concentração foi ajustada em um fotômetro Leitz para $OD_{540} = 0,30$.

3.2.2. Inoculação artificial

Os isolados foram inoculados em seus hospedeiros por meio de injeção da suspensão bacteriana nas folhas (KLEMENT et al., 1990). Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação. Observações diárias foram realizadas para verificar o aparecimento dos sintomas, e posteriormente foi realizado o teste de exsudação em gota, para comprovar a etiologia bacteriana das lesões.

3.3. Preservação dos isolados

Os isolados foram mantidos por dois métodos de preservação: por emulsificação em glicerina, conforme descrito por LELLIOT e STEAD (1987), e repicagem tubo a tubo em meio YDC (carbonato) (TUIITE, 1969; KIRÁLY et al., 1970; SCHAAD e STALL, 1988).

3.4. Caracterização bioquímica dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

3.4.1. Testes bioquímicos

Os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram caracterizados por meio das seguintes provas bioquímicas: crescimento mucóide em GYCA/YDC; crescimento a 35 °C; hidrólise de esculina; digestão de proteína (proteólise do leite); produção de urease; produção de ácidos a partir de arabinose, frutose, galactose, glucose, manose, sacarose e trealose; avaliação do crescimento em diferentes concentrações de solução salina; produção de H₂S a partir de peptona; hidrólise do amido; liquefação da gelatina; aerobiose (SCHAAD e STALL, 1988); utilização de asparagina como fonte de carbono (STARR e WEISS, 1943); e reação de Gram com base na solubilidade de KOH (RYU, 1940).

3.4.2. Variabilidade dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* com base na atividade de esterase

Foi utilizada a metodologia descrita por COSTA et al. (2001), em que os 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram cultivados em meio 523 líquido por 48 horas. Com o auxílio de uma alça de platina, depositaram-se alíquotas da suspensão bacteriana em quatro pontos equidistantes em uma placa de Petri contendo meio ágar-Tween 80. As placas foram incubadas a 28±1 °C por 144 horas, quando foi realizada a avaliação, medindo-se o halo de degradação do Tween 80 em dois sentidos diametralmente opostos, com o uso de uma régua milimetrada. A medição do halo foi considerada, subtraindo-se do diâmetro total o diâmetro da colônia bacteriana, medida de forma similar à do halo de degradação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa com quatro colônias bacterianas.

3.4.3. Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a alguns antibióticos

Para realização do antibiograma, foram utilizados os 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* relacionados no Quadro 1 e 34 diferentes antibióticos (Quadro 4).

Foi preparada uma camada básica de ágar-água 2% em placas de Petri. Após a solidificação, verteu-se uma sobrecamada de 10 mL de meio 523 semi-sólido (0,85% de ágar), a 40 °C, ao qual se incorporou 0,1 mL de suspensão bacteriana de cada isolado a ser testado (cultura com 24 horas). Após a solidificação da sobrecamada, foram distribuídos os discos de antibióticos. As placas foram incubadas a 28±1 °C/48 horas, quando foi observada a formação ou não de halos de inibição, registrando-se o seu diâmetro, em caso positivo.

3.4.4. Produção de bacteriocinas

Foram utilizados dois métodos para verificar a produção de bacteriocinas pelos isolados de *X. campestris* pv. *campestris*. No primeiro método, em placas de Petri (14 cm de diâmetro) contendo o meio 523 sólido, foram depositadas, com o auxílio de uma alça de platina, alíquotas de suspensão bacteriana, de modo a conter sete gotas equidistantes cada placa. As placas foram incubadas a 28±1 °C/24 horas e posteriormente colocadas, sem as tampas, sob luz ultravioleta por 20 minutos, para ocorrer a morte das células bacterianas. Verteram-se em cada placa 10 mL de meio 523 semi-sólido contendo 100 µL de suspensão bacteriana. As placas foram incubadas a 28±1 °C/24 horas, podendo-se observar o surgimento ou não de halos (ROMEIRO, 2001).

No segundo método, utilizado por MOURA (1996), em placas de Petri (14 cm de diâmetro) contendo meio 523 sólido, foram semeadas suspensões bacterianas, em estrias paralelas e equidistantes, de modo a conter cada placa cinco estrias, sendo cada estria correspondente a um isolado de *X. campestris* pv. *campestris*. As placas foram incubadas a 28±1 °C/24 horas. Após esse período,

as placas de Petri foram destampadas e expostas à radiação ultravioleta por 20 minutos, para provocar a morte das células bacterianas. Verteu-se em cada placa uma camada de 10 mL de meio 523 semi-sólido. Após completa solidificação, semearam-se diferentes isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, em estrias perpendiculares às primeiras, de forma que cada isolamento do patógeno apresentasse um ponto de interseção com as estrias realizadas anteriormente. As placas foram novamente incubadas a 28±1 °C/24 horas e avaliadas quanto à ocorrência de zonas de inibição indicativas de antibiose.

3.5. Caracterização patogênica dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

3.5.1. Inoculação cruzada

Foram preparadas suspensões bacterianas de todos os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* (Quadro 1). Essas suspensões foram obtidas conforme o item 3.2.1 e inoculadas com o auxílio de palitos de dente estéreis imersos nas suspensões bacterianas e utilizados para perfurar as nervuras do limbo foliar, em sete diferentes brássicas: couve comum (*Brassica oleracea* var. *acephala*), repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), canola (*B. rapa*), brócolos (*B. oleracea* var. *italica*), couve-chinesa (*B. chinensis*) e rabanete (*Raphanus sativus*). Foram utilizados três vasos com duas plantas para cada brássica. Após a inoculação, adotou-se o mesmo procedimento descrito no item 3.2.2.

3.6. Caracterização sorológica dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

3.6.1. Preparo do imunógeno

Adotou-se a metodologia utilizada por OLIVEIRA (1995). Foram utilizados oito isolados de *X. campestris* pv. *campestris* (isolados 2, 3, 11, 16, 20, 22, 23 e 31), selecionando-se, ao acaso, um isolado de cada hospedeiro. Cada isolado foi semeado em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo o meio 523 sólido com 100 mg/L de cicloheximida, e incubados a 28 ± 1 °C/48 horas. Para obtenção do imunógeno, foram escolhidas placas em que os isolados apresentaram crescimento uniforme, sem quaisquer contaminantes.

As suspensões bacterianas foram obtidas por meio da adição de 15 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, por placa. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky estéril, raspou-se a cultura de células bacterianas, e as suspensões foram coletadas por meio de uma pipeta automática.

Cada suspensão teve sua concentração determinada em um fotômetro modelo Perkin-Elmer UV-Vis OD₅₄₀ (2=0,97; 3=1,06; 11=1,02; 16=1,07; 20=1,06; 22=0,98; 23=1,00; e 31=0,9) e foi emulsificada com adjuvante incompleto de Freund na proporção 1:1 (v:v). A emulsificação foi feita com o auxílio de uma seringa de injeção sem agulha. A mistura foi aspirada e espirada até a emulsão apresentar aspecto viscoso e denso, não se desfazendo quando em contato com água.

3.6.2. Preparo do adjuvante incompleto de Freund

Este adjuvante é composto por 10 mL de óleo mineral e 10 mL de lanolina. A lanolina foi fundida e colocada com o óleo mineral em um gral de porcelana previamente aquecido em estufa. A mistura, após homogeneizada, foi dividida em alíquotas e acondicionada em frascos limpos. O armazenamento do adjuvante foi feito em geladeira, sendo aquecido no momento da utilização.

3.6.3. Imunização dos coelhos

Foi utilizada a metodologia descrita por MEZÊNCIO (1981), para imunização de coelhos machos, da raça Nova Zelândia. Para cada isolado de *X. campestris* pv. *campestris* foram imunizados dois animais. Foram coletados 10 mL de sangue de cada coelho antes da imunização, de forma a se obter o soro-controle. Os coelhos foram imobilizados, aplicou-se-lhes 0,5 mL do imunógeno, por via intramuscular, em cada coxa, num total de 1,0 mL por animal. Após um intervalo de 15-20 dias, foi repetido esse procedimento. Uma terceira imunização foi realizada 15-20 dias após a segunda, injetando-se 0,2 mL do imunógeno, via subcutânea, em três diferentes pontos do corpo do animal (dorso do pescoço e dorso da região lombar). O sangue dos animais imunizados foi coletado cinco dias após a última imunização.

3.6.4. Obtenção dos antissoros policlonais

Foi utilizada a metodologia descrita por MEZÊNCIO (1981), sendo o sangue dos animais coletado e colocado em recipiente estéril. O frasco com o sangue foi deixado por uma hora em temperatura ambiente e transferido, em seguida, para um refrigerador. Com o auxílio de um bastão de vidro estéril, separaram-se o coágulo e o soro, sendo este transferido para tubos de centrifuga e submetido a centrifugação por 15 minutos, a 3.000 rpm. O sedimento foi descartado e o sobrenadante, transferido para frascos esterilizados, com tampa, em alíquotas de aproximadamente 0,5 mL. Os frascos contendo os antissoros foram armazenados à temperatura de -20 °C até o momento da utilização.

3.6.5. Determinação dos títulos de aglutinação e precipitação dos antissoros

3.6.5.1. Preparo do antígeno particulado

Os isolados utilizados como imunógeno foram semeados, um a um, em meio 523 sólido contendo 100 mg/L de cicloheximida, em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro.

As células bacterianas foram ressuspendidas em solução salina (NaCl 0,85%), com o auxílio de uma espátula de Drigalsky. A suspensão bacteriana obtida foi filtrada em papel-filtro, para remoção de fragmentos de meio e de aglomerados de células. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada ao espectrofotômetro modelo Perkin-Elmer® UV-Vis para $OD_{540}=0,2$.

3.6.5.2. Preparo do antígeno solúvel

Os isolados utilizados como imunógeno foram cultivados e coletados conforme descrito no item 3.6.5.1. Cada suspensão bacteriana sofreu cinco ciclos de congelamento-descongelamento e teve a concentração determinada ao espectrofotômetro modelo Perkin-Elmer® UV-Vis para OD_{540} (2=1,20; 3=1,10; 11=1,12; 16=1,38; 20=1,5; 22=1,75; 23=0,43; e 31=0,67). Posteriormente, as suspensões foram submetidas à fervura, em banho-maria, por 10 minutos e, então, centrifugadas a 10.000 xg/15 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para frascos com tampa, em alíquotas de aproximadamente 1,0 mL, e armazenado a -20 °C até o momento da utilização.

3.6.6. Reação de aglutinação e precipitação

Foi utilizada a técnica descrita por ROMEIRO E FUKUDA (1983) para determinação dos títulos de aglutinação e precipitação do anticorpo, utilizando-se solução salina (NaCl 0,85%).

Depositou-se sobre o fundo úmido de uma placa de Petri uma lâmina de polietileno (9 x 9 cm) quadriculada com caneta hidrográfica (quadrados de 1 x 1 cm). Realizou-se, então, uma diluição em série do antissoro de coelho e do antígeno (1:2, 1:4, ..., 1:65.536) em solução salina (NaCl 0,85%). Depositaram-se, com o auxílio de uma micropipeta, 10 µL das diluições do antissoro no centro dos quadrados da lâmina de polietileno. Cada diluição do antissoro foi cruzada com cada diluição do antígeno solúvel e do antígeno particulado.

As placas foram incubadas em banho-maria, a 37 °C, por quatro horas. Procedeu-se, então, à avaliação em binocular estereoscópica com o menor aumento; a formação de um precipitado indicou reação positiva. Foram realizadas duas repetições para cada diluição. Os controles consistiram da utilização do antissoro de coelho sem a presença do antígeno e do antígeno sozinho.

3.6.7. Especificidade dos anticorpos

Para verificação da especificidade dos anticorpos obtidos contra *X. campestris* pv. *campestris* obtidos, foram escolhidos cinco isolados de bactérias fitopatogênicas (dois de *Erwinia* sp., um de *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*, um de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e um de *X. campestris* pv. *vesicatoria*), dos quais se obtiveram os respectivos antígenos solúveis, conforme o item 3.4.5.2. A concentração foi ajustada ao espectrofotômetro modelo Perkin-Elmer® UV-Vis para OD₅₄₀ = 1,4.

Foi realizado o teste de imunodifusão dupla de Ouchterlony (IDD), utilizando-se os anticorpos obtidos, juntamente com os seus antígenos, como forma de controle dos antígenos dos cinco isolados citados.

3.6.8. Estudo do relacionamento sorológico

Um estudo do relacionamento sorológico entre os 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foi realizado por meio da técnica de imunodifusão dupla em gel, utilizando-se os antissoros obtidos dos coelhos imunizados.

3.7. Caracterização molecular dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

3.7.1. Extração do DNA total dos isolados

Para extração do DNA total bacteriano, utilizou-se o protocolo proposto por AUSUBEL et al. (1992) e adaptado por PEREIRA (1999). Alíquotas de 1,5 mL de culturas bacterianas crescidas a 28 ± 1 °C por 48 horas em meio 523 líquido foram centrifugadas a 6.000 rpm, por dois minutos, em microcentrífuga. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 567 µL de tampão de extração (25 partes do tampão A, composto por sorbitol 350 mM, Tris-base 100 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5; 25 partes do tampão B, composto por Tris 200 mM, EDTA 50 mM, NaCl 2 M, CTAB 2%; e 10 partes de sarcosil 5% dissolvido em 0,15% (p/v) de bissulfito de sódio), 30 µL de SDS 10% e 3 µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubados por 1 hora a 37 °C. Posteriormente adicionaram-se 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de CTAB 10(p/v)/NaCl 0,7 M em solução aquosa. Após homogeneização, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 65 °C, seguindo-se adição de igual volume de álcool isoamílico/clorofórmio (24:1 v/v). Procedeu-se a uma agitação vigorosa das amostras, que foram em seguida centrifugadas por cinco minutos a 10.000 rpm. Transferiram-se as fases aquosas para novos tubos, e adicionou-se igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v), sendo repetidas a agitação vigorosa e a centrifugação. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, aos quais se adicionou 0,6 volume de isopropanol (aproximadamente 400 µL). A mistura foi cuidadosamente agitada até a precipitação do DNA e, então, centrifugada a 7.500 rpm por cinco minutos, para sedimentação do DNA. Descartaram-se os sobrenadantes, e aos sedimentos resultantes adicionou-se 1 ml de etanol 70%. Após cinco minutos, realizou-se nova centrifugação (7.500 rpm por cinco

minutos), e depois do descarte dos sobrenadantes, adicionou-se 1 ml de etanol 95%. Após um minuto, efetuou-se nova centrifugação, e descartaram-se os sobrenadantes. Os sedimentos resultantes foram secados ao ar por 40-60 minutos, ressuspendidos em 100 µl de tampão TE (Tris, 10 mM; e EDTA, 1 mM, pH 8,0) com RNase (1 µL de RNase para 199 µL de TE) e armazenados a -20 °C.

A quantificação do DNA total foi feita por meio da análise comparativa da intensidade das bandas das amostras com as de soluções de DNA de concentração conhecida, após eletroforese em gel de agarose 1%, e coradas com 0,15 µg/mL de brometo de etídio. Após a quantificação, as amostras foram diluídas em água miliQ estéril, para obtenção da concentração final de aproximadamente 2,5 ng/µL.

3.7.2. Análise de RAPD

Os fragmentos de DNA foram amplificados em uma reação com volume total de 50 µL contendo tampão 10x (KCl 500 mM, Tris-Cl 100 mM [pH 9,0 a 25 °C], 1% Triton X-100], MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 5 pmol de cada oligonucleotídeo (Operon Technologies Inc.) e 1,25 unidade de Taq DNA polimerase. Um volume de 5 a 10 µL de DNA obtido dos isolados bacterianos foi adicionado à reação. A amplificação foi realizada em termociclador, com um passo inicial de desnaturação por cinco minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94 °C, 30 segundos de pareamento a 35 °C e 45 segundos de extensão a 72 °C e um passo final de extensão a 70 °C por cinco minutos (LEITE JR. et al., 1995).

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,2) a 100 V por três horas e visualizados sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio (LEITE JR. et al., 1995; VERDIER et al., 1998).

3.7.3. Extração do DNA plasmidial

Para extração do DNA plasmidial bacteriano, utilizou-se o protocolo proposto por SAMBROOK et al. (1989). Aliquotas de 1,5 mL de culturas bacterianas crescidas a 28 ± 1 °C por 48 horas em meio 523 líquido foram centrifugadas a 14.000 rpm por um minuto em microcentrífuga. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 100 µL de solução I (25 mM-Tris-HCl pH 8,0; 10 mM de EDTA e 50 mM de D-glucose) e agitados por três minutos ou até a completa ressuspensão das células. As células foram mantidas durante três minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionaram-se a essa suspensão 200 µL de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%). A mistura foi cuidadosamente agitada e mantida durante cinco minutos no gelo, adicionando-se, em seguida, 150 µL de solução III (3M Kac, 2M Hac, pH 8,0) a 4 °C, repetindo a agitação, cuidadosamente, e incubação por cinco minutos no gelo. Procedeu-se a centrifugação das amostras a 14.000 rpm por cinco minutos, e cerca de 400 µL dos sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, aos quais se adicionaram 400 µL de fenol/clorofórmio (1:1). A mistura foi agitada por dois minutos e, em seguida, centrifugada a 14.000 rpm por três minutos. Os sobrenadantes (cerca de 300 µL) foram transferidos para novos tubos, aos quais se adicionaram 600 µL de etanol 100%. As amostras ficaram em repouso por dois minutos e, em seguida, centrifugadas a 14.000 rpm por cinco minutos. Descartaram-se os sobrenadantes, e aos sedimentos resultantes adicionou-se 1 mL de etanol 70%. Realizou-se nova centrifugação (14.000 rpm por dois minutos), e depois do descarte dos sobrenadantes, adicionou-se 0,5 mL de etanol 95%. Após um minuto, efetuou-se nova centrifugação, e descartaram-se os sobrenadantes. Os sedimentos resultantes foram secados ao ar, por 40-60 minutos, ressuspensos em 100 µL de tampão TE (Tris, 10 mM; e EDTA, 1 mM, pH 8,0) com RNase (1 µL de RNase para 199 µL de TE), digeridos com a enzima Eco RI (Amersham Life Science) e armazenados a -20 °C.

A análise do DNA plasmidial foi realizada conforme descrito no item 3.5.1.

3.8. Análise conjunta dos resultados

Foi realizada uma análise de agrupamento de todos os dados referentes às análises bioquímica, patogênica e sorológica, em que se tentou relacionar a variabilidade encontrada nos 33 isolados com o hospedeiro e a origem geográfica.

3.9. Análises estatísticas

Para avaliação do comportamento dos 33 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, de diferentes origens e hospedeiros, com relação às diferentes análises realizadas, foram processadas análises estatísticas univariadas e multivariadas.

3.9.1. Análise univariada

A análise univariada de variância foi processada para avaliar o comportamento dos isolados quanto à atividade de esterase (item 3.4.2), sendo as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Scott-Knott, no nível de 5% de probabilidade.

3.9.2. Análise multivariada

Esta análise foi processada com o objetivo de classificar os diversos isolados avaliados, considerando-se simultaneamente os resultados dos diferentes testes. As análises multivariadas utilizadas foram a análise de agrupamento, conhecida como análise de “cluster”, e a análise de escala multidimensional.

3.9.2.1. Análise de agrupamento

Primeiramente geraram-se matrizes de distâncias, utilizando do complemento aritmético do coeficiente de similaridade de concordância simples (DIAS, 1998), aplicado sobre os resultados dos testes bioquímicos (item 3.4.1), da sensibilidade a alguns antibióticos (item 3.4.3), da inoculação cruzada (item 3.5.1), da atividade sorológica (item 3.6) e sobre a combinação de todos esses resultados (item 3.8). Para o processamento do referido coeficiente de similaridade, os resultados positivos dos testes foram codificados como 1 e, os negativos, 0. O processamento dessas matrizes foi realizado por meio do programa GENES (CRUZ, 2001). A seguir, aplicou-se o algoritmo de agrupamento das médias das distâncias, conhecido como UPGMA, sobre as matrizes de distâncias, para visualizar a classificação dos isolados em um diagrama de árvore, chamado de dendrograma. O processamento do algoritmo e a construção dos dendrogramas foram feitos com a aplicação do programa STATISTICA 5.1 (STATSOFT, INC, 1997). Os princípios teóricos e a aplicação da análise de agrupamento podem ser vistos em DIAS (1998).

3.9.2. Análise de escala multidimensional

Esta análise foi processada para representar em um gráfico bidimensional a dissimilaridade entre os isolados, a partir das matrizes de distâncias obtidas no item anterior. No gráfico bidimensional, cada isolado é representado por um ponto, e a análise de escala multidimensional é processada de modo a maximizar a correspondência entre a dissimilaridade observada na matriz de distância e a distância interponto. Dessa forma, se dois isolados são idênticos, a distância entre seus pontos correspondentes no gráfico é zero. Os princípios teóricos e a aplicação da análise de escala multidimensional foram discutidos por DIAS (1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização bioquímica dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

4.1.1. Testes bioquímicos

Pelos resultados dos testes bioquímicos (Quadro 2), verificou-se que os isolados testados apresentaram características semelhantes, próprias do gênero *Xanthomonas* e da espécie *X. campestris* (KRIEG e HOLT, 1984; SCHAAD e STALL, 1988). O resultado negativo no teste de Gram (RYU, 1940), a não utilização de asparagina como a única fonte de carbono e o fato de serem aeróbicos estritos confirmam sua classificação nesse gênero. Entre outras características, a hidrólise da esculina, da gelatina e do amido, a produção de H₂S a partir de peptona, o crescimento mucóide, a proteólise do leite, a não-produção de urease, a tolerância máxima de NaCl de 2 a 5% e a produção de ácido a partir de arabinose, glicose, sacarose, manose, galactose, trealose e frutose permitiram incluir os isolados testados na espécie *X. campestris* e, com base na gama de hospedeiros, no patovar *campestris* (DYE et al., 1980; BRADBURY, 1986).

A partir da matriz de distância por coeficiente de coincidência simples, procedeu-se à análise de agrupamento, observando a formação de três grupos

distintos (Figuras 1 e 2). Em um dos grupos, o isolado 2 destacou-se, uma vez que diferiu dos demais, provavelmente pelo fato de não crescer em nenhuma das concentrações de NaCl testadas, além de não hidrolisar o amido (Quadro 2). O fato de não hidrolisar o amido não está relacionado com perda de patogenicidade, uma vez que se trabalhou com isolados patogênicos. O mesmo comportamento foi observado por SCHAAD (1976) em um isolado de *X. c. pv. vesicatoria*. Um segundo grupo foi composto pelos isolados 9, 15, 16 e 17, que permaneceram marginais em relação aos outros isolados, devido à variação em um ou mais testes bioquímicos, e, por último, um terceiro grupo foi composto pelos demais isolados.

O isolado 17 diferiu dos demais, por não apresentar crescimento mucóide, uma das características da espécie *X. campestris*, além de as colônias apresentarem coloração alaranjada, diferente da coloração amarelada dos outros isolados. Nos demais testes bioquímicos, entretanto, esse isolado se comportou de maneira semelhante ao restante dos isolados em estudo, com respostas típicas da espécie *X. campestris* (Quadro 2).

Verificou-se que localidade e hospedeiro de origem não influenciaram o agrupamento dos isolados. As variações observadas para alguns isolados em relação aos resultados esperados estão dentro da faixa de aceitação para cada teste bioquímico, não ocorrendo nenhuma exclusão desses isolados da espécie *X. campestris*. Fato semelhante foi observado por CHASE et al. (1992) com isolados de *X. campestris* de plantas da família *Aracaceae*.

Quadro 2 - Testes bioquímicos para caracterização de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* obtidos de diferentes brássicas

Isola- dos	Utilização de Açúcares							Concentração de Sal (%)				Hidrólise do Amido	Utilização de Asparagina	Gram
	A	Ga	G	F	M	S	T	2	3	4	5			
<i>Xcc</i> ¹¹	+ ¹²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	-	-
1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
9	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
14	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
16	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
17	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
24	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
27	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
32	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
33	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-

¹¹ *Xcc* = *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

¹² (+) = positivo para 80% dos isolados, (-) = negativo para 80% dos isolados e D = 11 a 89% dos isolados são positivos.

Quadro 2 - Cont.

Isola- dos	Aerobiose	Hidrólise de Esculina	Liquefação de Gelatina	Crescimento Mucóide	H ₂ Sb	Urease	Crescimento a 35 °C	Proteólise do Leite
<i>Xcc</i> ¹	+ ²	+	D	+	+	-	+	-
1	+	+	+	+	+	-	+	+
2	+	+	+	+	+	-	+	+
3	+	+	+	+	+	-	+	+
4	+	+	+	+	+	-	+	+
5	+	+	+	+	+	-	+	+
6	+	+	+	+	+	-	+	+
7	+	+	+	+	+	-	+	+
8	+	+	+	+	+	-	+	+
9	+	-	+	+	+	-	+	-
10	+	+	+	+	+	-	+	+
11	+	+	+	+	+	-	+	+
12	+	+	+	+	+	-	+	+
13	+	+	+	+	+	-	+	+
14	+	+	+	+	+	-	+	+
15	+	+	+	+	+	-	+	+
16	+	+	+	+	+	-	+	-
17	+	+	+	-	+	-	+	+
18	+	+	+	+	+	-	+	+
19	+	+	+	+	+	-	+	+
20	+	+	+	+	+	-	+	+
21	+	+	+	+	+	-	+	+
22	+	+	+	+	+	-	+	+
23	+	+	+	+	+	-	+	+
24	+	+	+	+	+	-	+	+
25	+	+	+	+	+	-	+	+
26	+	+	+	+	+	-	+	+
27	+	+	+	+	+	-	+	+
28	+	+	+	+	+	-	+	+
29	+	+	+	+	+	-	+	+
30	+	+	+	+	+	-	+	+
31	+	+	+	+	+	-	+	+
32	+	+	+	+	-	-	+	+
33	+	+	+	+	+	-	+	+

¹ *Xcc* = *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

² (+) = positivo para 80% dos isolados, (-) = negativo para 80% dos isolados e D = 11 a 89% dos isolados são positivos.

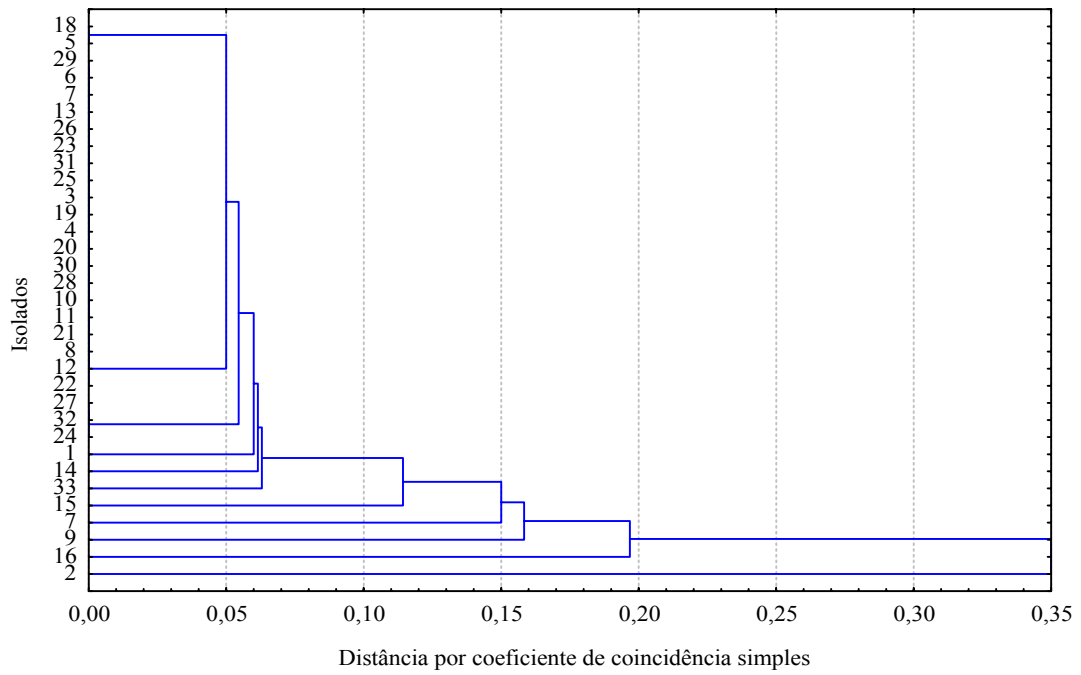


Figura 1 – Dendrograma de UPGMA referente a 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* avaliados por testes bioquímicos.

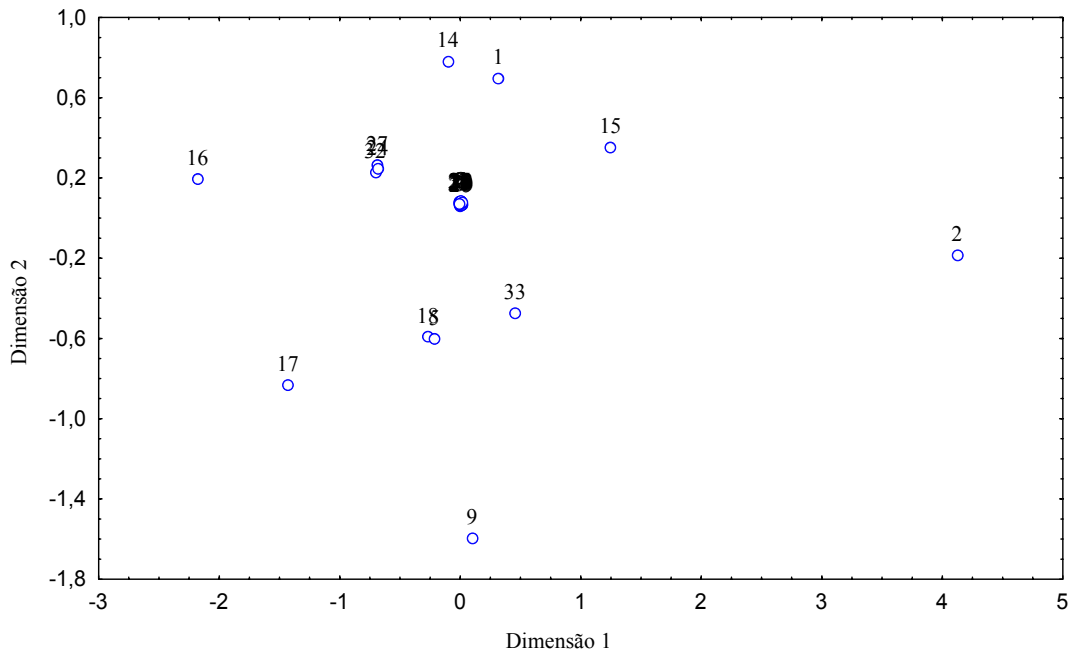


Figura 2 – Gráfico de escala multidimensional referente a 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* avaliados por testes bioquímicos.

4.1.2. Variabilidade dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* com base na atividade de esterase

Com base no tamanho do halo e utilizando o teste de Scott-Knott (Quadro 3), os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram distribuídos em cinco grupos de similaridade. Quinze isolados apresentaram os maiores halos, diferindo significativamente dos demais ($P \leq 0,05$). Como nos trabalhos realizados por STRIPECKE e ROSATO (1988) e COSTA et al. (2001), os isolados estudados apresentaram variabilidade quanto à atividade de esterase, mas não se verificou relação entre essa variabilidade e os hospedeiros de origem ou a procedência destes. A formação de halos claros, evidenciada em um resultado positivo, é devida à presença de cristais brancos, constituídos de sais de cálcio de ácidos graxos liberados do Tween por meio de enzimas lipolíticas; e a produção dessas enzimas varia entre patovares e isolados (McGUIRE et al., 1986).

Variações na atividade de esterase têm sido observadas, também, em outros patovares de *X. campestris* (HENZ et al., 1987; McGUIRE et al., 1986). Os resultados de STRIPECKE e ROSATO (1988) mostraram que o sistema esterase é bastante específico e que a variabilidade pode ocorrer tanto entre patovares quanto dentro de cada patovar.

Os isolados 20 e 29 (Quadro 3) não apresentaram atividade de esterase, porém a ausência dessa enzima não interfere na patogenicidade. De todas as enzimas produzidas por *X. c.* pv. *campestris*, apenas as proteases são importantes para o desenvolvimento da doença (HAYWARD e MARIANO, 1997; COSTA et al., 2001). As esterases são enzimas que atuam em diversos substratos, e a variabilidade detectada quanto ao padrão do perfil eletroforético, entre patovares e dentro de cada patovar de *X. campestris*, tem sido sugerida por diferentes autores como indicativo do desenvolvimento de especificidade ao hospedeiro, o que pode permitir um avanço na diferenciação de isolados do patógeno (EL-SHARKAWY e HUISINGH, 1971a, b).

Quadro 3 - Atividade de esterase de 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris*

Isolados	Atividade de Esterase ^{VI}
1	25,20 a
2	22,17 b
3	22,60 b
4	26,70 a
5	25,87 a
6	20,07 b
7	26,37 a
8	25,43 a
9	12,27 d
10	22,20 b
11	21,93 b
12	16,27 c
13	27,77 a
14	27,03 a
15	16,70 c
16	24,63 a
17	5,50 e
18	24,37 a
19	16,10 c
20	0,00 f
21	26,93 a
22	25,70 a
23	17,20 c
24	27,00 a
25	19,20 b
26	12,10 d
27	25,77 a
28	14,87 c
29	0,00 f
30	24,80 a
31	16,20 c
32	28,50 a
33	17,73 c

^{VI}Expressada como o diâmetro do halo (mm) de degradação do Tween 80 incorporado ao meio de crescimento dos isolados em estudo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade.

4.1.3. Sensibilidade dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a alguns antibióticos

Os isolados apresentaram-se sensíveis a 13 diferentes antibióticos: amicacina, canamicina, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, neomicina, netilmicina, novobiocina, polimixina B, rifampicina, tetraciclina, tobramicina e vancomicina (Quadro 4). O isolado 23 só apresentou resistência a três – antibióticos cefadroxil, cefalotina e sulfazotrim , enquanto os demais isolados apresentaram resistência a cinco ou mais dos 34 antibióticos testados, com um máximo de 15 para os isolados 15 e 24 (Quadro 4). Dentre os produtos testados não se encontrou nenhum ao qual todos os isolados fossem resistentes.

De acordo com ROMEIRO et al. (1998), há tendência de padrão característico para patovar ou espécie, comportando-se os isolados, normalmente, como sensíveis ou resistentes aos mesmos compostos. As análises de agrupamento (Figura 3) e de escala multidimensional (Figura 4) permitiram observar a formação de três grupos distintos. O primeiro grupo foi constituído pelos isolados 8, 12, 17 e 24, resistentes, respectivamente, a 11, 12, 11 e 15 antibióticos. A similaridade encontrada entre esses isolados consiste no fato de os três primeiros terem apresentado resistência à maioria dos antibióticos aos quais o isolado 24 também foi resistente.

O segundo grupo foi composto pelo isolado 23, e um terceiro grupo, composto pelos demais isolados.

Não se verificou relação entre a sensibilidade/resistência aos produtos testados e a origem geográfica ou o hospedeiro original dos isolados, ao contrário dos resultados obtidos por VERNIERE et al. (1992), que, ao estudarem 65 isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* de diferentes patótipos perante a 63 antibióticos, verificaram que o critério de agrupamento usado separou os isolados quanto à origem geográfica.

Quadro 4 - Sensibilidade de 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* a diferentes antibióticos, determinada pelo bioensaio por difusão em gel

Antibióticos ¹	µg no disco	Isolados															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ác. Nalidíxico	30	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	R	-	R	-	-
Ác. Oxolinico	30	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	R	-	R	-	-
Ác. Pipemídico	20	-	-	-	R	-	-	-	R	R	-	-	R	-	-	-	-
Amicacina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amoxicilina	10	-	R	R	R	R	-	R	-	-	R	R	-	R	R	R	R
Ampicilina	10	¹ R	R	R	R	R	-	R	R	-	R	-	-	R	R	R	R
Bacitracina	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-
Canamicina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbenicilina	100	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-
Cefadroxil	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalexina	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalotina	30	R	R	R	R	R	-	R	R	-	R	R	R	-	R	R	R
Cefotaxima	30	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	R	-
Cefoxitina	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftriaxona	30	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estreptomicina	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfomicina	50	R	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	R	-	-	-	R
Gentamicina	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lincomicina	2	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R
Neomicina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Netilmicina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrofurantoina	300	R	R	R	-	R	R	R	-	R	R	R	R	-	R	R	R
Novobiocina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacilina	1	-	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Penicilina	10	R	R	R	R	-	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R
Polimixina B	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rifampicina	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfazotrim	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	R	R
Sulfonamidas	300	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	R	R	R
Tetraciclina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tobramicina	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancomicina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Resistente (R) e sensível (-).

Quadro 4 - Cont.

Antibióticos ^{VI}	µg no disco	Isolados																
		17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
Ác. Nalidíxico	30	R	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ác. Oxolínico	30	R	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ác. Pipemídico	20	R	-	-	-	-	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amicacina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amoxicilina	10	R	R	R	R	-	R	-	-	R	-	R	-	R	R	-	R	R
Ampicilina	10	R	R	-	-	R	R	-	R	R	-	R	-	R	R	-	-	R
Bacitracina	10	-	-	-	R	-	R	-	R	-	-	R	-	-	-	-	-	R
Canamicina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbenicilina	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefadroxil	30	-	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalexina	30	-	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalotina	30	-	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	-	R
Cefotaxima	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefoxitina	30	R	R	R	-	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftriaxona	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R
Eritromicina	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estreptomicina	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfomicina	50	R	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lincomicina	2	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	R	R	R	R	R	R	R
Neomicina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Netilmicina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrofurantoina	300	R	R	R	R	R	R	-	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R
Novobiocina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxacilina	1	R	R	R	R	-	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	-	R
Penicilina	10	-	-	-	R	-	R	-	R	R	-	R	-	R	-	-	-	R
Polimixina B	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rifampicina	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sulfazotrim	25	-	-	-	-	-	R	R	R	-	-	R	-	-	-	-	-	R
Sulfonamidas	300	R	-	-	-	-	R	-	R	-	-	-	-	R	-	-	-	R
Tetraciclina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tobramicina	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancomicina	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^{VI}Resistente (R) e sensível (-).

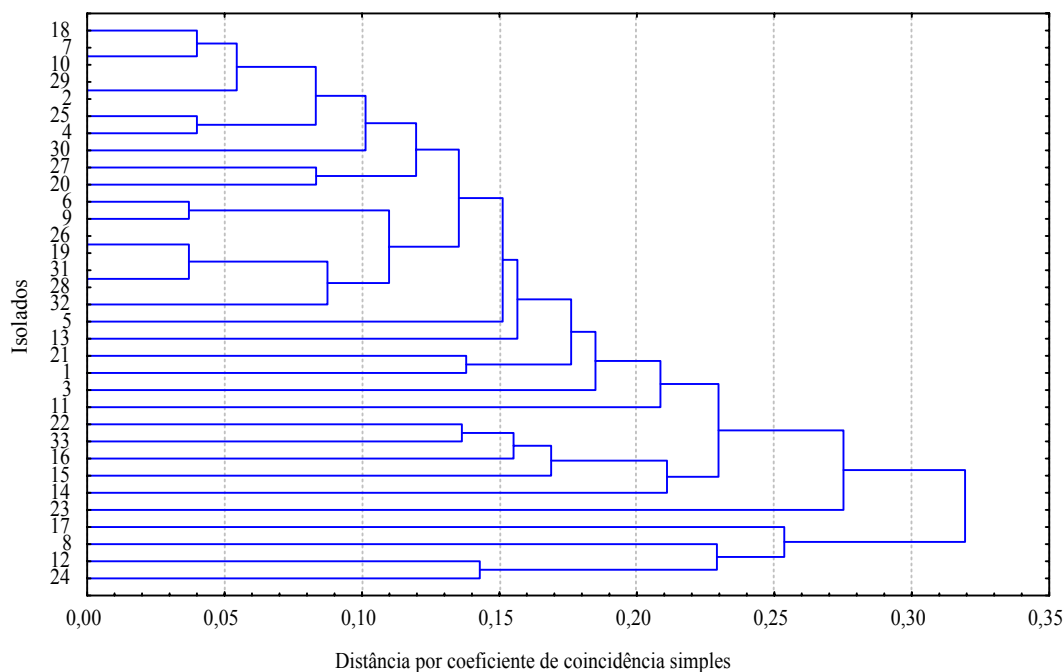


Figura 3 - Dendrograma de UPGMA referente a 33 isolados de *X. campestris pv. campestris* avaliados com base no antibiograma qualitativo.

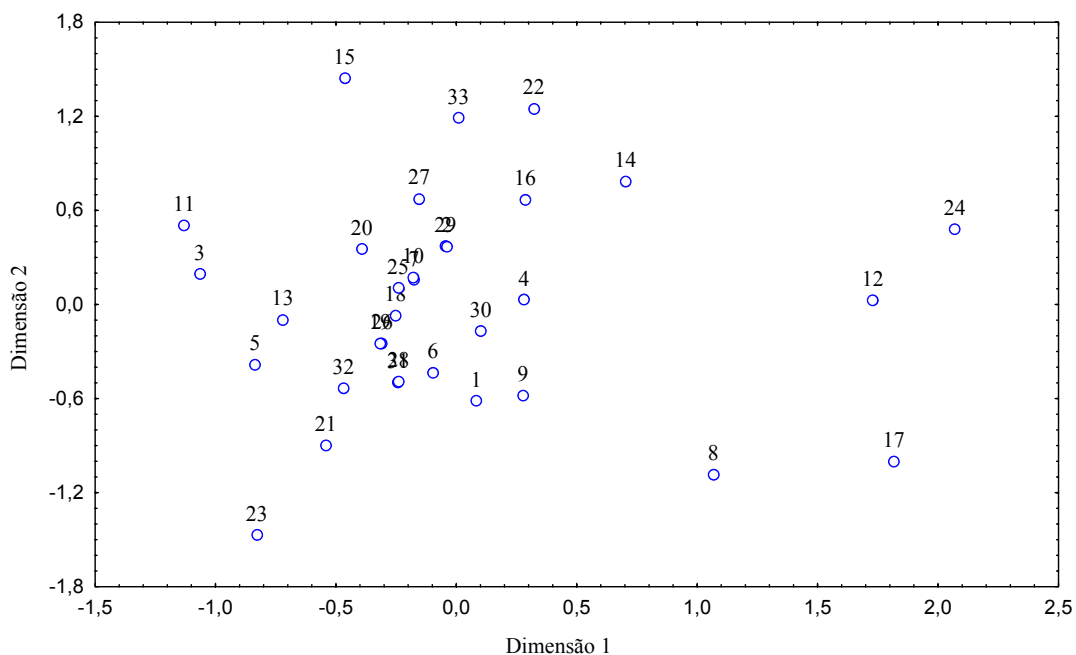


Figura 4 - Gráfico de escala multidimensional referente a 33 isolados de *X. campestris pv. campestris* avaliados com base no antibiograma qualitativo.

4.1.4. Produção de bacteriocinas

Três isolados apresentaram antibiose contra sete outros isolados: o isolado 10 contra os isolados 23, 25 e 16; o isolado 22 contra o 12 e o 31; e o isolado 24 contra o 3 e o 14. Como poderá ser visto no item 4.5.2 (extração do DNA plasmidial), os isolados 10, 22 e 24 possuem plasmídios. De acordo com alguns autores, bacteriocinas são produzidas por bactérias pertencentes a todos os gêneros de fitobactérias, mas "bacteriocinogenicidade" tem sido associada a plasmídios em *E. herbicola*, *E. carotovora* subsp. *carotovora* (VIDAVER, 1976), *Agrobacterium radiobacter* (KERR, 1980; ROMEIRO, 1995) e *A. tumefaciens* (Slota e Farrand, 1982, citados por COPLIN, 1989). Porém, para os isolados 10, 22 e 24, não é prudente utilizar essa teoria para explicar a "bacteriocinogenicidade", pois plasmídios também foram extraídos a partir de outros isolados, como será observado no item 4.5.2, para os quais não se observou a produção de bacteriocinas.

O fato de não ter sido observado "bacteriocinogenicidade" nos demais isolados não significa que eles não a possuam, mas sim que os isolados utilizados como "alvo" não são sensíveis.

Bacteriocinas têm sido conceituadas como compostos de alto peso molecular, de produção exclusiva por bactérias, com ação inibitória e tóxica intra-específica e associada a um plasmídio (JACK et al., 1995; NGUYEN et al., 1999).

As duas metodologias utilizadas para observar a produção de antibiose apresentaram os mesmos resultados, porém o método de estrias esteve mais sujeito a contaminações, que, entretanto, não interferiram nos resultados.

A antibiose ocorreu entre isolados de hospedeiros diferentes, não se verificando relação com a origem geográfica e o hospedeiro.

4.2. Caracterização patogênica dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

4.2.1. Inoculação cruzada em diferentes brássicas

Com base na análise de agrupamento (Figura 5) e de escala multidimensional (Figura 6), notou-se a separação dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* em três grupos de similaridade. O primeiro grupo foi composto pelos isolados 1 e 24, que induziram sintomas somente em dois hospedeiros; o segundo grupo foi composto pelos isolados 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 14, 15, 23, 26, 27 e 31, que induziram sintomas em todas as plantas hospedeiras; e, por último, um terceiro grupo de similaridade foi constituído pelos demais isolados, que induziram sintomas em quatro a seis plantas hospedeiras.

Na literatura há relatos de que a bactéria se mostra altamente patogênica a várias brássicas em diferentes condições, porém estas condições não foram bem elucidadas (ALVAREZ e CHO, 1978; ALVAREZ et al., 1994). Segundo Elliot (1951), citado por BRADBURY (1986), *X. campestris* pv. *campestris* tem como hospedeiras várias brássicas, dentre elas a couve comum (*Brassica oleracea* var. *acephala*), o repolho (*B. oleracea* var. *capitata*), a couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), a canola (*B. rapa*), o brócolos (*B. oleracea* var. *italica*), a couve-chinesa (*B. chinensis*), a couve-rábano (*B. oleracea* var. *gongyloides*) e o rabanete (*Raphanus sativus*). Entretanto, os resultados da inoculação cruzada (Quadro 5) indicaram que isolados de *X. campestris* pv. *campestris* podem apresentar especificidade de hospedeiro. Isso ocorre em razão, possivelmente, da variabilidade tanto do patógeno quanto do hospedeiro.

Dos 33 isolados estudados, todos patogênicos, 14 deles não mostraram especificidade quanto aos hospedeiros, uma vez que induziram sintomas em todas as plantas inoculadas. No entanto, os 19 isolados restantes apresentaram relativo grau de especificidade, pois não causaram doença em uma ou mais das brássicas inoculadas.

Segundo CHEN et al. (1994), *X. campestris* pv. *campestris* é genética e patogênicamente heterogênea. Comprovando essa informação, YUEN et al. (1987), trabalhando com plantas de repolho, verificaram diferenças na virulência e, ou, na capacidade dessa bactéria de se disseminar, e esses fatores podem ser a causa da variação da intensidade da doença em repolho. Aqueles autores verificaram, também, que a variação observada não foi revelada no desenvolvimento dos sintomas, resultantes de inoculação em laboratório.

Machado (1985), citado por HENZ et al. (1987), estudou 67 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* provenientes de ervas daninhas. Dentre esses isolados, somente 15 mostraram-se patogênicos a brássicas, ressaltando-se que um dos isolados atacava somente repolho e, outro, somente couve.

Durante a execução deste trabalho, descartou-se a possibilidade de se estar trabalhando com isolados de *X. campestris* pv. *armoraciae*, uma bactéria também patogênica a brássicas e agente causal de uma mancha foliar. Embora não existam conhecimentos profundos das diferenças genéticas entre esses dois patógenos (CHEN et al., 1994), a hipótese de que alguns isolados pudessem pertencer a *X. campestris* pv. *armoraciae* foi descartada, pois, segundo BRADBURY (1986), essa bactéria só induziu sintomas em brássicas quando inoculadas artificialmente, e os isolados utilizados neste trabalho foram todos obtidos de plantas naturalmente infectadas.

Maiores estudos precisam ser realizados para se entender melhor a variação na especificidade dos isolados em relação às brássicas utilizadas neste trabalho. É importante, inclusive, um estudo para determinação das raças do patógeno que ocorrem no Brasil. Kamoun et al. (1992), citados por IGNATOV et al. (1999), agruparam número limitado de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* em cinco raças, de acordo com a resposta de diferentes cultivares de *Brassica rapa* e *B. juncea*. Segundo esses autores, a estrutura de raça em populações de *X. campestris* pv. *campestris* varia consideravelmente entre países com extensas áreas de cultivo de brássicas.

Com base nos resultados encontrados, concluiu-se que a especificidade dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* estudados não possui qualquer relação com a origem geográfica ou o hospedeiro do qual foram obtidos.

Quadro 5 - Inoculação cruzada de sete brássicas com 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris*

Isolados	Hospedeiros						
	<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	<i>Raphanus</i> <i>sativus</i>	<i>B.</i> <i>chinensis</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	<i>B. rapa</i>
1	- ^{VI}	+	-	-	-	-	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	-	+	+	+
8	+	+	+	-	+	+	-
9	+	+	+	-	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	-	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	-	+	+	+	-
17	-	+	-	+	+	+	+
18	+	+	+	-	+	+	-
19	+	+	+	-	+	+	-
20	+	+	+	-	+	+	+
21	+	+	+	-	+	+	-
22	+	+	-	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+
24	-	-	+	-	+	-	-
25	+	+	-	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	-	+	+	-
29	+	+	+	-	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	-
31	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	-	+	+	-
33	+	+	+	+	+	+	-

^{VI}(+) = lesões com necroses nos vasos e que mostraram exsudação ao microscópio e (-) = ausência de lesões.

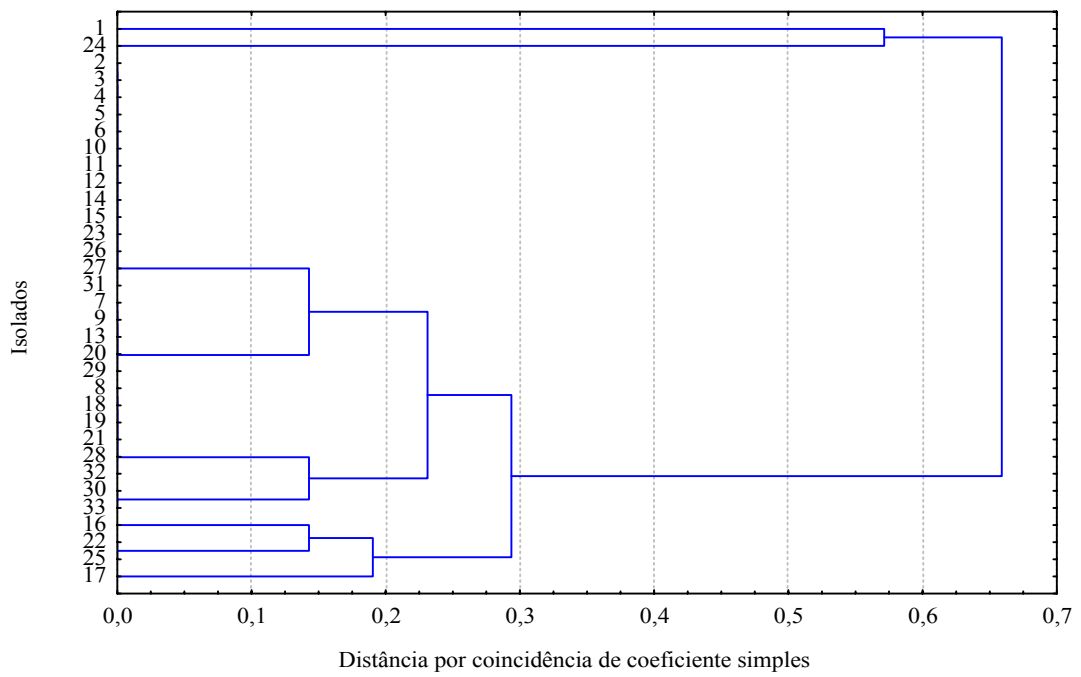


Figura 5 - Dendrograma de UPGMA referente a 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* avaliados com base na inoculação cruzada em sete diferentes brássicas.

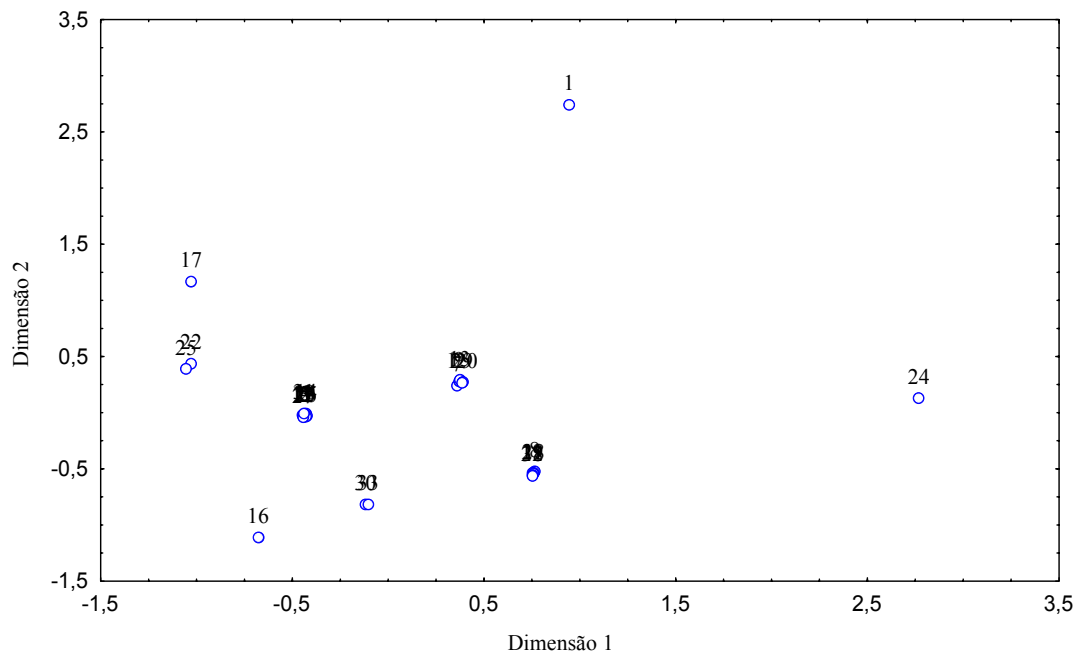


Figura 6 - Gráfico de escala multidimensional referente a 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* avaliados com base na inoculação cruzada em sete diferentes brássicas.

4.3. Caracterização sorológica dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

4.3.1. Reação de aglutinação e de precipitação

Os títulos de aglutinação e de precipitação obtidos para os antissoros produzidos em coelhos foram baixos, variando de 1:16 a 1:32. OLIVEIRA (1995), trabalhando com *X. c. pv. vesicatoria*, obteve títulos de 1:1.024. Segundo esse mesmo autor, títulos altos, de até 1:10.000, como o obtido por ZUTRA et al. (1986) contra um isolado de *Erwinia amylovora*, são difíceis de alcançar.

Uma hipótese levantada para explicar os títulos baixos desses antissoros nos testes de aglutinação e precipitação em gota foi fundamentada na verificação de que todos os isolados de *X. c. pv. campestris* que foram utilizados como imunógenos produziram grande quantidade de cápsula. Esta pode ter se comportado como um imunógeno fraco, uma vez que só se obteve produção de anticorpos quando os coelhos foram imunizados com uma suspensão muito concentrada de cada isolado, o que explica as reações positivas na IDD quando se utilizou o antígeno mais concentrado e espesso. No entanto, quando se utilizou o antígeno mais diluído, a reação passou a ser negativa.

Em trabalhos futuros, seria interessante realizar o fracionamento da célula bacteriana, de forma a verificar se alguma fração resultaria na produção de antissoros com títulos mais elevados e, talvez, com maior especificidade, bem como para verificar, com exatidão, qual a fração da célula é responsável pela resposta imune. THAVEECHAI e SCHAAD (1986) e AZAD e SCHAAD (1988), utilizando proteínas da membrana como imunógeno, verificaram que os anticorpos produzidos possuíam especificidade a ponto de permitir a identificação de fitobactérias.

Não se visualizou qualquer reação com o antissoro produzido contra o isolado 20, indicando que, provavelmente, anticorpos não foram produzidos pelos dois animais imunizados ou o método de detecção utilizado não teve a sensibilidade suficiente para detectá-los.

4.3.2. Especificidade dos anticorpos

Reação de imunodifusão dupla não foi observada entre os anticorpos produzidos por coelhos contra os isolados de *Erwinia* sp. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* e *X. campestris* pv. *vesicatoria*. A formação de bandas foi observada para os antígenos respectivos de *X. campestris* pv. *campestris* utilizados como controle, evidenciando-se a especificidade dos anticorpos produzidos para essa bactéria.

4.3.3. Estudo do relacionamento sorológico

Embora os títulos de aglutinação e de precipitação dos antissoros tenham se mostrado baixos, eles foram suficientes para se trabalhar com a imunodifusão dupla.

Os antissoros 23 e 16 reconheceram o maior número de isolados de *X. campestris* pv. *campestris*. O antissoros 3 reconheceu o menor número de isolados, ao passo que o isolado 17 não foi reconhecido por nenhum dos antissoros (Quadro 6).

Em alguns casos, ocorreu interferência entre antígenos vizinhos, havendo resultados negativos. No entanto, todas as reações foram reproduzíveis.

O fato de determinado antissoros reconhecer um antígeno proveniente de um isolado de *X. campestris* pv. *campestris* de outro hospedeiro significa que existem antígenos comuns entre os dois isolados, o que era esperado, uma vez que se trabalhou com isolados pertencentes à mesma espécie e patovar de bactéria.

O isolado 17 não foi reconhecido por nenhum dos antissoros testados. Esse isolado apresentou algumas características particulares, pois, embora tenha sido isolado de couve-flor e tido a sua patogenicidade comprovada, em alguns testes bioquímicos ele diferiu dos demais. O isolado 17 não apresentou crescimento mucóide (Quadro 2), o que pode significar baixa produção de cápsula. O seu não- reconhecimento pelos antissoros poderia, portanto, ser

explicado pela ausência de antígenos capsulares ou pela presença destes em quantidade extremamente baixa.

Com base no agrupamento de distância euclidiana média (Figuras 7 e 8), verificou-se que os isolados 17 e 32 se encontravam agrupados onde o isolado 32 não foi reconhecido por três antissoros. Deve-se levar em consideração, na interpretação desses resultados, que os testes de agrupamento apresentam certa distorção da realidade, ou seja, nesta análise foram estudados sete antissoros. Assim, passa-se de um espaço composto de sete dimensões para um de duas, ocorrendo, portanto, perda de informações, o que explica o agrupamento do isolado 17 com o 32.

Nenhum dos antissoros utilizados foi capaz de reconhecer todos os isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, indicando a existência de alta variabilidade sorológica. Embora essa variabilidade exista, os resultados obtidos (Figuras 7 e 8) não permitiram agrupar os isolados, seja com relação à origem geográfica, seja com relação ao hospedeiro do qual foram obtidos. O conhecimento dessa variabilidade é de grande importância na utilização de técnicas sorológicas para detecção de *X. campestris* pv. *campestris*.

Quadro 6 - Relacionamento sorológico entre os 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, por meio de imunodifusão dupla em gel de agarose, utilizando-se sete antissoros policlonais produzidos em coelhos

Isolados	Antissoros						
	2	3	11	16	22	23	31
1	+ ^{VI}	-	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	-	+	+	+	+	+
5	+	+	+	-	+	+	-
6	+	-	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+
14	+	-	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+
16	+	-	+	+	+	+	+
17	-	-	-	-	-	-	-
18	+	-	+	+	+	+	-
19	+	-	+	+	+	+	+
20	+	-	+	+	+	+	+
21	+	-	+	+	+	+	-
22	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	-	+	-
26	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+
29	+	-	+	+	+	+	+
30	+	-	+	+	+	+	-
31	+	+	+	+	+	+	+
32	-	-	+	+	-	+	-
33	+	+	+	+	+	+	+

^{VI}(+) reação positiva, evidenciada pela formação de banda; e (-) reação negativa.

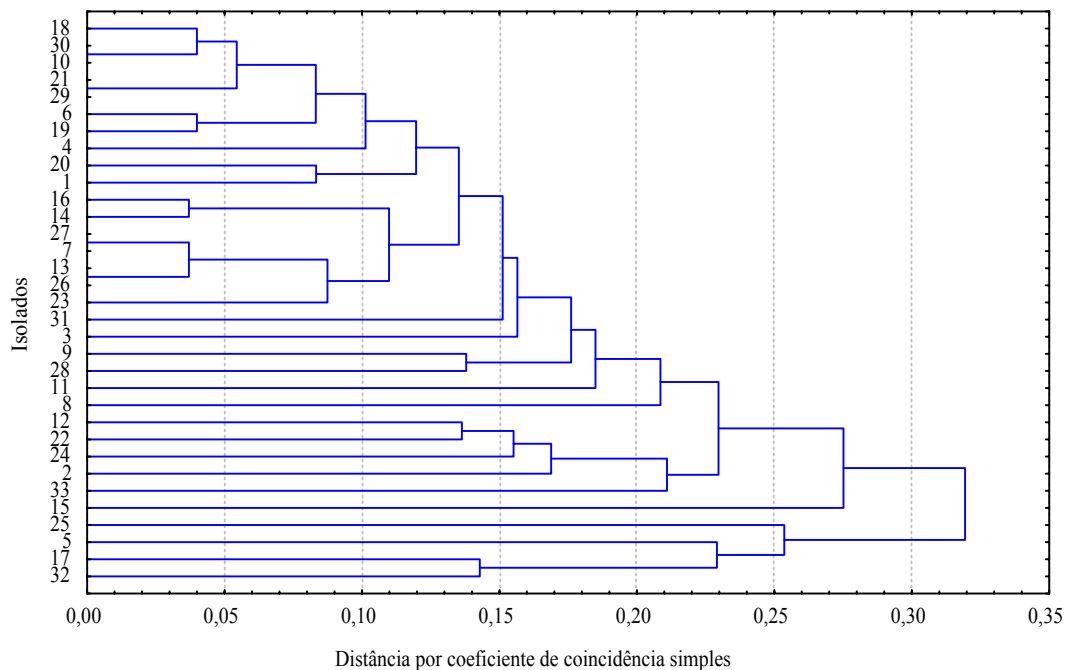


Figura 7 - Dendrograma de UPGMA referente a 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* avaliados com base no relacionamento sorológico.

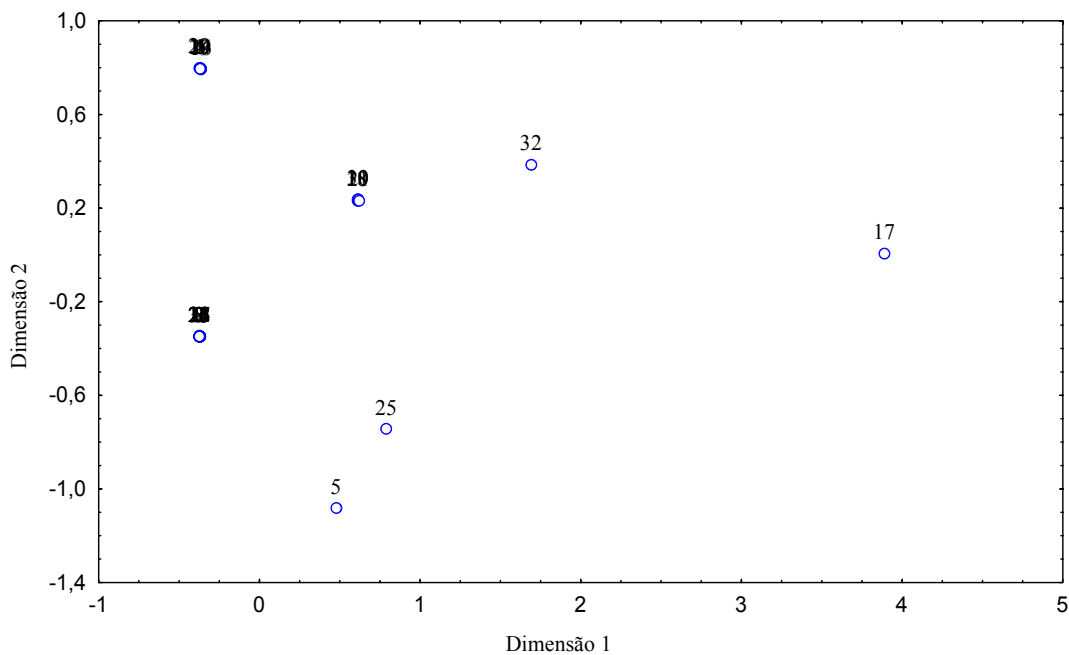


Figura 8 - Gráfico de escala multidimensional referente a 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* avaliados com base no relacionamento sorológico.

4.4. Caracterização molecular dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

4.4.1. Análise de RAPD

Extraiu-se DNA de todos os 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, porém não se conseguiu amplificar os fragmentos pela técnica do RAPD. A grande quantidade de proteína, juntamente com o DNA, caracterizada por um "arraste" e visualizada após a eletroforese em gel de agarose, pode ter interferido com a ação da Taq DNA polimerase, não permitindo a amplificação. Os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* produziram grande quantidade de cápsula, e algum componente capsular pode ter interferido na amplificação. Para minimizar esse problema, devem ser semeados os isolados num meio de cultura com outra fonte de açúcar que não a sacarose, para se obter um crescimento bacteriano com pouca quantidade de cápsula. Adicionalmente, é importante que outros protocolos sejam avaliados quanto à capacidade de extrair o DNA bacteriano sem grandes quantidades de proteínas ou realizar modificações na metodologia utilizada, de modo a se obter uma preparação de DNA isenta de polissacarídeos.

4.4.2. Extração do DNA plasmidial

Em 23 dos 33 isolados foram extraídos plasmídios, os quais variaram em quantidade e tamanho. Em 10 isolados não se encontrou DNA plasmidial: isolados 3, 4, 7, 5, 9, 14, 16, 19, 21 e 28. O fato de não se terem encontrado plasmídios nesses isolados não significa que estes não os contenham, pois pode ser que possuam plasmídios pequenos ou muito grandes e os métodos de extração e, ou, digestão enzimáticas utilizados não tenham sido adequados.

Plasmídios grandes podem ficar retidos, juntamente com o DNA cromossômico, durante o processo de extração. A adição da solução III (item 3.5.3) tem por finalidade induzir a formação de uma "malha" que retém o DNA cromossômico, separando-o do DNA plasmidial. Se o plasmídio for muito

grande, pode ficar retido nesta etapa da extração. Nesse caso, outros protocolos de extração devem ser estudados.

Variações em quantidade e tamanho de plasmídios dentro de isolados da mesma espécie e patovar de bactéria já foram relatadas por alguns autores. CANTEROS et al. (1995), trabalhando com *X. campestris* pv. *vesicatoria*, verificaram que o número e o tamanho de plasmídios era variável entre os isolados, e nenhum plasmídio ou perfil de plasmídios foi característico para essa fitobactéria. A diversidade de plasmídios em isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* pode ser resultante da freqüente transferência de plasmídios entre isolados. Segundo CROSSE (1966), a variação em perfis de plasmídios pode contribuir para a existência de ecótipos.

4.5. Análise conjunta dos resultados

Os resultados do agrupamento final dos dados referentes às caracterizações bioquímica, patogênica e sorológica encontram-se nas Figuras 9 e 10.

O isolado 17 diferiu dos demais isolados (Figuras 9 e 10), ficando distante deles. Isso era esperado, em razão das diferenças que ele apresentou, as quais foram discutidas ao longo deste trabalho. Observou-se que os 32 isolados restantes permaneceram próximos, constituindo um só grupo, o que não permitiu estabelecer qualquer relação com a sua origem geográfica ou com os hospedeiros a partir dos quais foram obtidos.

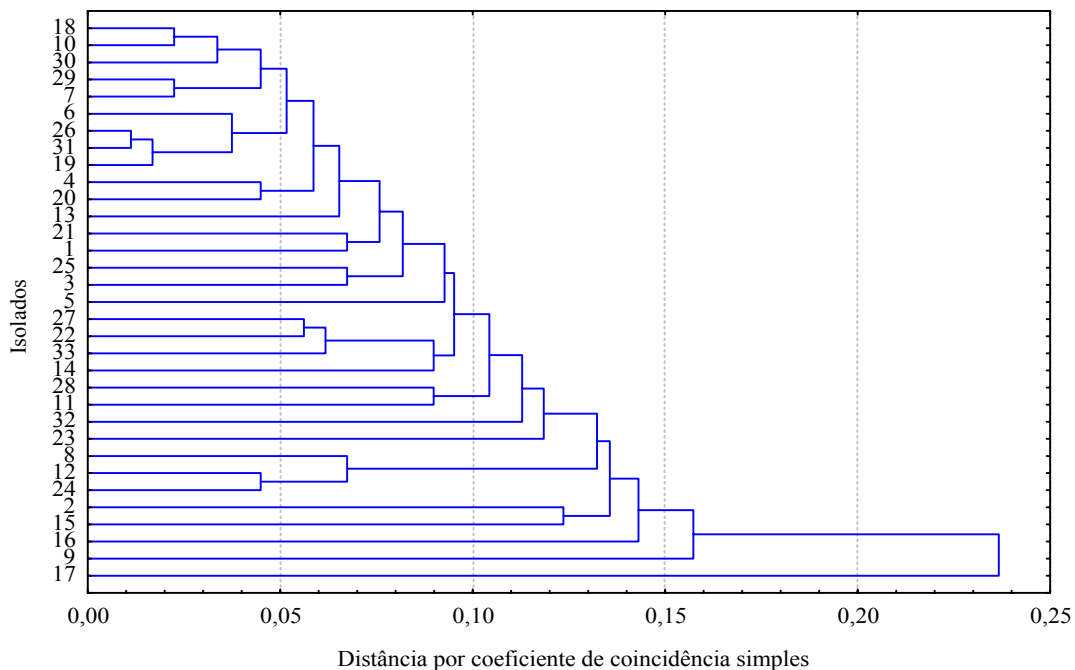


Figura 9 - Dendrograma de UPGMA referente a 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* avaliados com base nas caracterizações bioquímica, patogênica e sorológica.

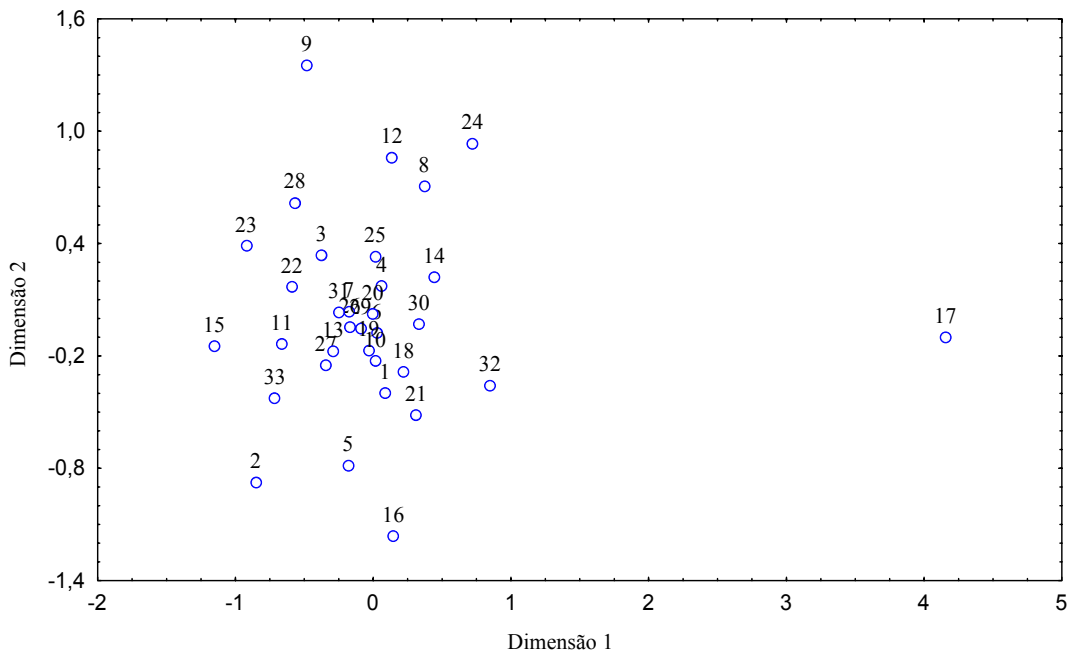


Figura 10 - Gráfico de escala multidimensional referente a 33 isolados de *X. campestris* pv. *campestris* avaliados com base nas caracterizações bioquímica, patogênica e sorológica.

5. RESUMO E DISCUSSÕES

Os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* formaram subgrupos quando caracterizados bioquímica, patogênica e sorologicamente. Entretanto, os subgrupos formados foram diferentes para cada tipo de caracterização. Adicionalmente, os isolados presentes nesses subgrupos não apresentaram qualquer relação, seja com a sua procedência, seja com o hospedeiro do qual foram obtidos. Verificou-se que isolados provenientes de diferentes hospedeiros ou localidades podiam estar presentes em um mesmo subgrupo, e isolados provenientes de um mesmo hospedeiro ou localidade foram encontrados em diferentes subgrupos.

Essa ausência de correlação pode ser decorrente do fato de o patógeno ser disseminado por sementes. As sementes de brássicas comercializadas no Brasil são importadas e vendidas diretamente ao produtor ou multiplicadas no País, para posterior venda aos produtores. Tais sementes são oriundas de diferentes países (Quadro 7), bem como multiplicadas em distintas regiões do Brasil. Conseqüentemente, diferentes isolados podem ser introduzidos nas propriedades, aumentando a variabilidade do patógeno. O sistema de produção de sementes de brássicas no Brasil contribui para que o patógeno possa efetivamente alcançar os campos de produção. Por exemplo, no Estado de Minas Gerais as Normas e Padrões de Mudas e Sementes de Olerícolas prevêm tolerância de 5% de plantas

com sintomas de podridão negra em campos de produção de sementes de brócolos, couve-flor, mostarda, rabanete e repolho. Para confirmação dessa hipótese, seria necessária a obtenção de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* ao longo do tempo, com informações acerca da origem das sementes utilizadas nas propriedades.

Outro fato a ser considerado é que em uma mesma propriedade se cultiva, normalmente, mais de um tipo de brássica, e isso, obviamente, contribui para a não- ocorrência de especialização do patógeno quanto ao hospedeiro.

Adicionalmente, os 33 isolados utilizados provenientes de 22 localidades podem ter constituído uma amostragem pequena. Em trabalhos futuros, sugere-se a utilização de maior número de isolados de uma mesma localidade e obtidos em diferentes épocas de plantio.

Quadro 7 - Origem das sementes de brássicas comercializadas no Brasil e respectivas empresas produtoras e, ou, importadoras

Empresa	Brássicas							
	Brócolos	Canola	Couve	Couve-chinesa	Couve-flor	Couve-rábano	Rabanete	Repolho
a	Brasil Japão			Japão			Brasil Europa EUA	EUA Europa
b	Dinamarca				Dinamarca		EUA	Japão
c	Cangaçu (RJ)		Itália	Dinamarca	Carandaí (MG)	Cangaçu (RJ)	Cangaçu (RJ)	Carandaí (MG)
d	Nova Zelândia		EUA	Japão	Austrália Japão Dinamarca		EUA Holanda	

a, b, c e d: informações pessoais obtidas em empresas produtoras e, ou, importadoras de sementes de brássicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIDATA - Sistema de informações do agronegócio de Minas Gerais.
www.agridata.mg.gov.br. 2000.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**. 3th Edition, Garland Publishing, Inc. New York. 1994. 1294p.
- ALVAREZ, A.M., CHO, J.J. Black rot of cabbage in Hawaii: inoculum source and disease incidence. **Phytopathology**, v.68, p.1456-1459, 1978.
- ALVAREZ, A.M., LOU, K. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. **Plant Disease**, v.69, p.1082-1086, 1985.
- ALVAREZ, A.M., BENEDICT, A.A., MIZUMOTO, C.Y., HUNTER, J.E., GABRIEL, D.W. Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. **Phytopathology**, v.84, p.1449-1457, 1994.
- ALVAREZ, A.M., REHMAN, F.U., LEACH, J.E. Comparison of serological and molecular methods for detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice seed. **Seed Health Testing** - CAB International: England, p.175-183. 1997.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (Eds.) **Current protocols in molecular biology**. London: John Wiley e Sons, 2. ed., 1992.

- AZAD, H., SCHAAD, N.W. Serological relationships among membrane proteins of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. **Phytopathology**, v.78, p. 272-277, 1988.
- BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria** – CAB International: England, 1986. 332p.
- CANTEROS, B.I., MINSAVAGE, G.V., JONES, J.B., STALL, R.E. Diversity of plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, v.85, p.1482-1486, 1995.
- CHASE, A.R., STALL, R.E., HODGE, N.C., JONES, J.B. Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological and fatty acid analysis. **Phytopathology**, v.82, p.754-759, 1992.
- CHEN, J., ROBERTS, P.D., GABRIEL, D.W. Effects of a virulence locus from *Xanthomonas campestris* 528^T on pathovar status and ability to elicit blight symptoms on crucifers. **Phytopathology**, v.84, p.1458-1464, 1994.
- CIVEROLO, E.L. Indigenous plasmids in *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Phytopathology**, v.75, p. 524-528, 1985.
- COPLIN, D.L. Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.187-212, 1989.
- COSTA, V.S.O., MARIANO, R.L.R., MICHEREFF, S.J. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologia** (no prelo). 2001.
- CROSSE, J.E. Epidemiological relations of the pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. **Annual Review of Phytopathology**, v.4, p.291-310, 1966.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES versão windows aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 648p.
- DAWES, I.W., SUTHERLAND, I.W. **Microbial physiology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. London, 1992. 189p.
- DIAS, L. A. S. **Análises multidimensionais**. In: ALFENAS, A. C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574p.
- DYE, D.W., BRADBURY, J.F., GOTO, M., HAYWARD, A.C., LELLIOTT, R.A., SCHROTH, M.N. International standards for namings pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Review Plant of Pathology**, v.59, p.153-168, 1980.

- EL-SHARKAWY, T.A., HUISINGH, D. Electrophoretic analysis of esterases and other soluble proteins from representatives of phytopathogenic bacterial genera. **Journal of General Microbiology**, v.68, p.149-154, 1971a.
- EL-SHARKAWY, T.A., HUISINGH, D. Differentiation among *Xanthomonas* species by polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins. **Journal of General Microbiology**, v.68, p.155-154, 1971b.
- FAHY, R.C., PERSLEY, G.J. **Plant bacterial diseases - a diagnostic guide**. Sidney: Academic Press, 1983. 393p.
- FRANKEN, A.A.J.M., KAMMINGA, G.C., SNIJDERS, W., VAN DER ZOUWEN, P.S., BIRNBAUM, Y.E. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seed by immunofluorescence microscopy and dilution plating. **Netherlands Journal Plant Pathology**, v.99, p.125-137, 1993.
- GABRIEL, D.W. Four plasmid DNA variants distinguished in 1984 Florida citrus canker epiphytotic. **Phytopathology**, v.75, p.1320, 1985. (Abstract).
- GILBERTSON, R.L., MAXWELL, D.P., HAGEDORN, D.J., LEONG, S.A. Development and application of a plasmid DNA probe for detection of bacteria causing common bacterial blight of bean. **Phytopathology**, v.79, p.518-525, 1989.
- GOTTWALD, T.R., ALVAREZ, A.M., HARTUNG, J.S., BENEDICT, A.A. Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* strains associated with epidemics of citrus bacterial spot in Florida citrus nurseries: correlation of detached leaf, monoclonal antibody, and restriction fragment length polymorphism assays. **Phytopathology**, v.81, p.749-753, 1991.
- HAMMOND, J. Western blotting and the use of membranes to adsorb antisera and to affinity purify antibodies. In: HAMPTON, R., BALL, E., De BOER, S. **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1993. 389p.
- HARTUNG, J.S., CIVEROLO, E.L. Genomic fingerprints of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America, and Florida. **Phytopathology**, 77, p.282-285, 1987.
- HAYWARD, A.C., MARIANO, R.L.R. Mecanismos de virulência e patogenicidade de procariotos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.5, p.199-234, 1997.

- HENZ, G.P., TAKATSU, A., REIFSCHNEIDER, F.J.B. Avaliação da virulência e variabilidade em isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.350-353, 1987.
- HUNTER, J.E., DICKSON, M.H., LUDWIG, J.W. Source of resistance to black rot of cabbage expressed in seedlings and adult plants. **Plant Disease**, v.71, p.263-266, 1987.
- IGNATOV, A., KUGINUKI, Y., HIDA, K. Vascular stem resistance to black rot in *Brassica oleracea*. **Canadian Journal of Botany**, v.77, p.442-446, 1999.
- JACH, R.W., TAGG, J.R., RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, p.171-200, 1995.
- JONES, D., KRIEG, N. Serological and Chemotaxonomy. In: SNEATH, P.H., MAIR, N.S., SHARPE, M.E., HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.2, 1986.
- KADO, C.I., HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.
- KERR, A. Biological control of crow gall through production of agrocin 84. **Plant Disease**, v.64, p.25-30, 1980.
- KIRÁLY, Z., KLEMENT, Z., SOLYMOSSY, F. **Methods in plant pathology with special reference to breeding for disease resistance**. Budapest: Akadémiai kiadó, 1970. 509p.
- KLEMENT, Z., RUDOLPH, K., SANDS, D.C. **Methods in phyto bacteriology**. Budapest: Académiai Kiado, 1990. 568p.
- KRIEG, N.R., HOLT, J.G. (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore/London, Williams & Wilkins, v.1, 1984. 660p.
- LAZO, G.R., GABRIEL, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, v.77, p.448-453, 1987.
- LAZO, G.R., GABRIEL, D.W. Described "races" of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* are mixtures. **Phytopathology**, v.74, p.837, 1984. (Abstract).
- LAZO, G.R., GABRIEL, D.W. Use of plasmid DNAs to differentiate pathovars of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, v.75, p.1320, 1985. (Abstract).

- LEITE JR. R.P., JONES, J.B., SOMODI, G.C., MINSAVAGE, G.V., STALL, R.E. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. **Plant Disease**, v.79, p.917-922, 1995.
- LELLIOT, R. A., STEAD, D.E. **Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants**. Oxford: Balckwell Scientific, v.2, 1987. 216p.
- LI, X., DeBOER, S.H. Selection of polimerase chain reaction primers from RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. **Phytopathology**, v.85, p.837-842. 1995.
- LIEW, K.W., ALVAREZ, A.M. Phage typing lysotype distribution of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, v.71, p.274-276, 1981.
- LOPES, C.A., QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças – diagnose e controle**. Brasília, DF: Embrapa, 1997. 70p.
- MAAS, J.L., FINNEY, M.M., CIVEROLO, E.L., SASSER, M. Association of unusual strain of *Xanthomonas campestris* with apple. **Phytopathology**, v.75, p.438-445, 1985.
- MARINGONI, A.C. In: KIMATI, H., AMORIN, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia v.2 Doenças das Plantas Cultivadas**. Ceres. SP, 1997. 774p.
- McGUIRE, R., JONES, J.B., SASSER, M. Tween media for semiselctive isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. **Plant Disease**, v.70, p.887-891, 1986.
- MEZÊNCIO, J.M.S. **Cinética da produção de anticorpos em coelhos e relacionamento antígeno entre estirpes de *Rhizobium japonicum***. Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1981. 42p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1981.
- MINSAGE, G.V., SCHAAD, N.W. Characterization of membrane proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Phytopathology**, v.73, p.747-755, 1983.
- MOURA, A.B. **Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro**. Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1996. 64p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- NGUYEN, A.H., TOMITA, T., HIROTA, M., SATO, T., KAMIO, Y. A simple purification method and morphology and component analyses for

carotovoricina Er, a phage-tail-like bacteriocin from the plant pathogen *Erwinia carotovora* Er. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.63, p.1360-1369, 1999.

OLIVEIRA, J.R. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro**. Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1995. 98p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.

PEREIRA, J.L.A. **Virulência e variabilidade genômica de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli***. Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1999. 45p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.

PROSEN, D., HATZILOUKAS, E., SCHAAD, N.W., PANAPOULOS, N.J. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polimerase chain reaction - based amplification of a phaseolo toxin gene region. **Phytopathology**, v.83, p.965-970, 1993.

ROBBS, C.F., RODRIGUES NETO, J. Taxonomia de *Xanthomonas*. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, 1993. 417p.

ROBERTS, S.J., HILTUNEN, L.H., HUNTER, P.J., BROUGH, J. Transmission from seed to seedling and secondary spread of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in brassica transplants: effects of dose and watering regime. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.879-889, 1999.

RODRIGUES NETO, J. e MALAVOLTA JR., V.A. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe Agropecuário**, v.17(183), p.56-59, 1995.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, MG:UFV, 1995. 283p.

ROMEIRO, R.S., FUKUDA, S. Método simples para determinação do título de aglutinação/ou precipitação do antissoro ou do antígeno. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p.93-95, 1983.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa, MG:UFV, 2001. 283p.

ROMEIRO, R.S., MOURA, A.B., OLIVEIRA, J.R., SILVA, H.S.A., BARBOSA, L.S., SOARES, F.M.P., PERES, F. Evidences of constitutive multiple resistance to antibiotics in some plant pathogenic bacteria. **Summa Phytopathologica**, v.24, p.220-225, 1998.

RYU, E. A simple method for differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. **Kitazato Archives of Experimental Medicine**, v. 17, p.58-63, 1940.

- SAETTLER, A.W., SCHAAD, N.W., ROTH, D.A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. APS Press, St. Paul, Minnesota, 1989. 122p.
- SAMBROOK, J., FRITISCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. ed. v. 1, 1989.
- SCHAAD, N.W., ALVAREZ, A. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G. e CIVEROLO, E.L. **Xanthomonas**. Beltsville: USDA-ARS, 1993. 399p.
- SCHAAD, N.W., STALL, R.E. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.W. (ed.) **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2. ed., p. 81-94, 1988
- SCHAAD, N.W. Immunological comparison and characterization of ribosomes of *Xanthomonas vesicatoria*. **Phytopathology**, v.66, p.770-776, 1976.
- SCHAAD, N.W. Relationship of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. **Plant Disease**, v.64, p.91-92, 1980.
- SCHAAD, N.W. Serological identification of plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.17, p.123-147, 1979.
- SCHAAD, N.W. Use of direct and indirect immunofluorescence tests for identification of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, v.68, p.249-252, 1978.
- SCHAAD, N.W., DIANESE, J.C. Cruciferous weeds as source of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. **Phytopathology**, v.71, p.1215-1220, 1981.
- SCHAAD, N.W., VIDAVER, A.K., LACY, G.H., RUDOLPH, K., JONES, J.B. Evaluation of proposed amended names of several pseudomonads and xanthomonads and recommendations. **Phytopathology**, v.90, p.208-213, 2000.
- SCHAAD, N.W., JONES, J.B., LACY, G.H. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.W., JONES, J.B., CHUN, W. (Eds.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2001. 373p.
- SIQUEIRA, T.S. **Cultura de brássicas**. Viçosa, MG:UFV, 1981. 30p.
- SNEATH, P.H.A. **International Code of Nomenclature of Bacteria and Statutes of the International Committee on Systematic Bacteriology and Statutes of the Bacteriology and Applied Microbiology Section of the**

International Union of Microbiological Societies. Bacteriological Code. 1990 Revision. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1992.

STARR, M.P., WEISS, J.E. Growth of phytopathogenic bacteria in a synthetic asparagin medium. **Phytopathology**, v.33, p.314-318, 1943.

STATSOFT, INC. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, USA. 1997.

STRIPECKE, R., ROSATO, Y.B. Variabilidade no perfil eletroforético de alfa-esterases e plasmídeos em patovares de *Xanthomonas campestris*. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, p.358-361, 1988.

THAVEECHAI, N., SCHAAD, N.W. Comparison of different immunogen preparations for serological identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Phytopathology**, v.74, p.1065-1070, 1984.

THAVEECHAI, N., SCHAAD, N.W. Serological and electrophoretic analysis of a membrana protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from Thailand. **Phytopathology**, v.76, p.139-147, 1986.

TUITE, J. **Plant pathological methods**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239p.

VAUTERIN, L., HOSTE, B., YANG, P., ALVAREZ, A., KERSTERS, K., SWINGS, J. Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G., CIVEROLO, E.L. (Eds.). *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 156-191, 1993.

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

VERDIER, V.I., MOSQUERA, G., ASSIGBÉTSÉ, K. Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v.82, p.79-83. 1998.

VERNIERE, C., PRUVOST, O., DUBOIS, C., COUTEAU, A. LUISETTI, J. Variations among the strains of *Xanthomonas* isolated from citrus in the sensibility to antibiotics. **Plant Pathogenic Bacteria**, p.247-251, 1992.

VIDAVER, A.K. Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. **Annual Review Phytopathology**, p.451-465, 1976.

VILELA, M.R. Brássicas, hortaliças de alto valor alimentício. **Informe Agropecuário**. v.9(98), p.1, 1983.

- WESTMAN, A.L., KRESOVICH, S., DICKSON, M.H. Regional variation in *Brassica nigra* and other weedy crucifers for disease reaction to *Alternaria brassicicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Euphytica**, v.106, p.253-259, 1999.
- WILLIAMS, P.H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, v.64, p.736-742, 1980.
- YOUNG, J.M.D., DYE, D.W., BRADBURY, J.F., PANAGOPOULOS, C.G., ROBBS, C.F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal Agricultural Research**, v.21, p.153-177, 1978.
- YUEN, G.Y., ALVAREZ, A.M., BENEDICT, A.A., TROTTER, K.J. Use of monoclonal antibodies to monitor the dissemination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Phytopathology**, v.77, p.366-370, 1987.
- ZUTRA, D., SHABI, E., LAZAROVITZ, G. Fire blight on pear, a new disease in Israel. **Plant Disease**, v.70, p.1071-1073, 1986.