

**LÍVIO DA SILVA AMARAL**

**AVALIAÇÃO DE MEIOS SEMI-SELETIVOS E TÉCNICAS  
MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE *XANTHOMONAS  
CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS*.**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2012**

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

T

A485a  
2012

Amaral, Lívio da Silva, 1986-  
Avaliação de meios semi-seletivos e técnicas moleculares  
para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* /  
Lívio da Silva Amaral. – Viçosa, MG, 2012.  
vii, 37p. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: José Rogério de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: p. 27-32

1. *Xanthomonas campestris*. 2. Couve - Doenças e pragas.  
3. Podridão-negra. 4. *Brassica*. 5. Reação em cadeia de  
polimerase. 6. Bacteriologia - Cultura e meios de cultura.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 579.33

**LÍVIO DA SILVA AMARAL**

**AVALIAÇÃO DE MEIOS SEMI-SELETIVOS E TÉCNICAS  
MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE *XANTHOMONAS  
CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS*.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Fitopatologia, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

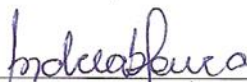
APROVADA: 13 de fevereiro de 2012.



Luis Cláudio Vieira da Cunha  
(Coorientador)



Claudine Márcia Carvalho  
(Coorientadora)



Andréa Bittencourt Moura



José Rogério de Oliveira  
(Orientador)

*Não sabendo que era impossível,  
foi lá e fez.*  
**(Jean Cocteau).**

*À minha amada família,  
minha mãe Aparecida,  
meu pai Fernando,  
meus irmãos Fernanda e Lucas,  
minha tia Creusa.*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado por toda a minha vida e colocado pessoas tão especiais em meu caminho para chegar até aqui.

Aos meus pais Fernando e Aparecida, meus irmãos Fernanda e Lucas, e minha tia Creusa, por todo amor, carinho e apoio incondicionais a mim dispensados.

À minha namorada Cristiane, pelo amor, compreensão e todos os momentos compartilhados.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade a mim dada para me formar como Agrônomo e fazer Pós-Graduação em Fitopatologia.

Ao professor José Rogério de Oliveira, pela orientação nos trabalhos, mas principalmente por ter me inspirado a trabalhar com Bacteriologia de Plantas e me dar a oportunidade de trabalhar nesta área no Mestrado.

Aos professores Luis Cláudio Vieira da Cunha e Claudine Márcia Carvalho, por toda a ajuda, apoio e pelos conselhos dados a mim.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas Cristhian, Hélivio, Maurício, Gilcianny, Poliana, Elisângela, Suely, Iane e Lilian, pelos ótimos momentos compartilhados no laboratório, e aos colegas da Pós-Graduação, pela amizade, pelas dificuldades e alegrias que compartilhamos.

A todos os meus grandes amigos conquistados no JSC, em especial Raul, Suzane, Wagner, Karine, Teu, Elisângela, Paulo Henrique, Sara, Hudson, Ana, Lú, Ramon, Daiana, Carlos, Patrícia, Maria, Élder e Samira, pelos ensinamentos e pelos ótimos momentos que já vivemos e que ainda vamos viver.

Aos amigos Victor, Alberto, Marcos, Tiago, além dos outros amigos conquistados na UFV, por tornarem minha caminhada mais prazerosa.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, em especial à Suely e ao Bruno, pela dedicação e amizade.

A Thaís Santiago, pela ajuda nos trabalhos e pela amizade desde que iniciei meus trabalhos em Fitopatologia, ainda como estagiário.

Ao professor Reginaldo da Silva Romeiro (*in memoriam*), pelos ensinamentos, incentivo e amizade.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação.

**Muito obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

LÍVIO DA SILVA AMARAL, filho de Maria Aparecida da Silva Amaral e Fernando Antônio Rodrigues do Amaral, nasceu em Viçosa, Minas Gerais - Brasil em 17 de julho de 1986.

Em março de 2005, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa - Minas Gerais, graduando-se em janeiro de 2010.

Em março de 2010, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, com concentração na área de Bacteriologia de Plantas, sob orientação do Prof. José Rogério de Oliveira, submetendo-se à defesa da dissertação em 13 de fevereiro de 2012.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A podridão negra das brássicas .....	1
1.2. Métodos de detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> .....	3
1.2.1. Meios semi-seletivos .....	3
1.2.2. Métodos moleculares .....	3
1.2.3. Testes de patogenicidade .....	4
2. METODOLOGIA .....	6
2.1. Obtenção dos isolados.....	6
2.2. Armazenamento e manutenção dos isolados .....	6
2.3. Confirmação da identidade dos isolados.....	7
2.3.1. Produção de xantomonadinas .....	7
2.3.2. Utilização de asparagina como única fonte de carbono.....	8
2.3.3. Sequenciamento .....	8
2.4. Testes de patogenicidade .....	9
2.5. Avaliação dos meios semi-seletivos .....	10
2.6. Detecção com <i>primers</i> específicos.....	10
3. RESULTADOS .....	12
3.1. Identidade dos isolados .....	12
3.2. Testes de patogenicidade .....	13
3.3. Crescimento dos isolados de Xcc nos meios semi-seletivos.....	14
3.4. Detecção com <i>primers</i> específicos.....	16
4. DISCUSSÃO .....	20
5. CONCLUSÕES .....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
7. APÊNDICE - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA.....	33

## RESUMO

AMARAL, Lívio da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Avaliação de meios semi-seletivos e técnicas moleculares para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. Orientador: José Rogério de Oliveira. Coorientadores: Claudine Márcia Carvalho e Luis Cláudio Vieira da Cunha.

Avaliou-se a eficiência de meios de cultura semi-seletivos, de testes de patogenicidade e a especificidade de *primers* para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). Para a execução dos experimentos, foram utilizados 29 isolados recebidos de diferentes regiões do Brasil. Para a confirmação da identidade dos isolados foram realizados os testes de produção de xantomonadinas e de utilização de asparagina, análise da região 16s do genoma bacteriano e testes de patogenicidade. Dos 29 isolados, 24 foram identificados como pertencentes ao gênero *Xanthomonas*. Nenhum dos isolados induziu HR nas plantas inoculadas e apenas 14 isolados induziram sintomas típicos da podridão negra em couve. O meio NSCAA foi o único capaz de suportar o crescimento de todos os isolados, enquanto os meios mCS20ABN, YTSA-CC e Xan-D permitiram o crescimento da maioria dos isolados. À exceção do isolado X03, os *primers* XCR/XCF e HrcCR2/HrcCF2 permitiram a amplificação e visualização das bandas de tamanhos esperados para Xcc.

## ABSTRACT

AMARAL, Lívio da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2012. **Assessment of semiselective media and molecular tools for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.** Adviser: José Rogério de Oliveira. Co-Advisers: Claudine Márcia Carvalho and Luis Cláudio Vieira da Cunha.

It was aimed to evaluate the efficiency of semi-selective media, for pathogenicity tests and primers specificity for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). For execution of experiments, we used 29 strains received from different regions in Brazil. For confirmation of the identity of the strains we carried out xanthomonadins production test, asparagine utilization, analysis of the 16S rDNA genes region of bacterial genome and pathogenicity tests. Of the 29 strains, 24 were identified as belonging to *Xanthomonas* genus. None of the strains induced hypersensitivity reaction (HR) in inoculated plants and only 14 strains induced typical symptoms of black rot in collard. The NSCAA medium was the uniquely to support the growth of all strains, whereas mCS20ABN, YTSA-CC and Xan-D media allowed the growth of most of strains. Except of X03 strain, the XCR/XCF and HrcCR2/HrcCF2 primers allowed the amplification and visualization of bands of expected size to Xcc.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1) A podridão negra das brássicas

A podridão negra é uma das doenças mais destrutivas de brássicas, causando perdas significativas na produção e na qualidade dos produtos (Villemet *et al.*, 2009). A doença é causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc), uma bactéria pertencente à família Xanthomonadaceae, ordem Xanthomonadales, classe Gammaproteobacteria, filo Proteobacteria, domínio Bacteria (Garrity, 2004).

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é uma bactéria Gram-negativa, estritamente aeróbia, que produz colônias amarelas, exibe crescimento mucóide em meio YDC, cresce a 35°C, hidrolisa amido e esculina, alcaliniza o leite de litmus e produz ácido a partir de arabinose (Schaad *et al.*, 2001; Romeiro, 2005).

Esse patógeno está presente em campos de produção de brássicas em todo o mundo (Villemet *et al.*, 2009; Agrios, 2005) e a sua gama de hospedeiros engloba principalmente brássicas. Garrity (2000) menciona *Brassica* spp., *Capsella bursa-pastoris*, *Lepidium sativum*, *Matthiola* spp., *Raphanus sativus* e *Amorica rusticana* como hospedeiras de Xcc, todas pertencentes à família Brassicaceae. O autor ainda cita uma possível ocorrência do patógeno em *Boerhaavia erecta* (Nyctaginaceae). Qian *et al.* (2005) relatam que Xcc é capaz de causar doença também em *Arabidopsis thaliana*.

No Brasil, Xcc é um dos patógenos bacterianos com o maior número de hospedeiros e ampla distribuição territorial (Tabela 1) e a bactéria infecta, além de brássicas, pelo menos uma espécie pertencente à família Amaranthaceae (Malavolta Jr., 2008).

O sintoma característico da doença é a mancha em forma de “V-invertido” a partir dos bordos da folha, devido à penetração da bactéria por hidatódios. A princípio ocorre uma mancha clorótica que evolui tornando-se uma lesão necrótica com bordos amarelados, a qual é utilizada na diagnose da podridão negra (Assis *et al.*, 1999). Além dos hidatódios, estômatos e ferimentos também podem ser portas de entrada para o patógeno na planta.

O principal modo de sobrevivência e dispersão de Xcc é através de sementes (Tebaldi *et al.*, 2007) A presença de apenas três sementes contaminadas com Xcc em um lote de 10.000 é o suficiente para a ocorrência de uma epidemia no campo (Lee *et al.*, 2009). Além de infestar e infectar sementes, Xcc pode causar infecção assintomática

tornando difícil a diagnose visual (Gitaitis e Walcott, 2007). O uso de sementes livres do patógeno é importante para o manejo da podridão negra das brássicas (Massomo *et al.*, 2004) e, para se dispor destas sementes, é necessária a realização de testes em laboratório, visando sua detecção.

Tabela 1. Plantas hospedeiras de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* relatadas no Brasil e local de ocorrência.

Plantas hospedeiras	Nome comum	Estado/Região
<i>Ageratum conyzoides</i>	Mentrasto	DF
<i>Amaranthus viridis</i>	Caruru	DF
<i>Brassica juncea</i>	Mostarda	RJ
<i>Brassica napus</i> var. <i>oleifera</i>	canola, colza	PR
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Couve	Amazônia, Sudeste, AM, AP, BR, DF, GO, PE, PR, RS, SE
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	couve-flor	Sudeste, AM, DF, GO, PE, PR, RS
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Repolho	Todas as regiões
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	couve-de-bruxelas	BR
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>	couve-rábano	RJ, SP
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	Brócolis	DF, MG, PR, RJ, SP
<i>Brassica rapa</i> var. <i>pekinensis</i>	repolho chinês	DF, PE, RJ, SP
Crucíferas não especificadas		BR
<i>Emilia sonchifolia</i>	falsa-serralha	DF
<i>Eruca sativa</i>	Rúcula	DF
<i>Mathiola incana</i>	Goivo	BR
<i>Brassica rapa</i>	Nabo	PE, RS
<i>Raphanus sativus</i>	Rabanete	DF, PE, PR, RJ, RS, SP
<i>Sinapis alba</i>	mostarda branca	DF, Região Nordeste
<i>Sinapis arvensis</i>	mostarda silvestre	BR

Fonte: adaptado de Malavolta Jr. (2008).

## **1.2) Métodos de detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

Várias técnicas têm sido elaboradas e recomendadas para a detecção de Xcc, bem como para a confirmação da identidade de colônias suspeitas. Algumas dessas técnicas são discutidas a seguir.

### **1.2.1) Meios semi-seletivos**

Para se realizar a detecção de fitobactérias, em alguns casos torna-se necessário primeiro obtê-las em cultura pura. Meios semi-seletivos constituem uma ferramenta importante para a detecção de um determinado patógeno, uma vez que o objetivo do seu uso é promover o crescimento do patógeno alvo e a inibição do crescimento de contaminantes (McGuire *et al.*, 1986). Têm como vantagens a possibilidade de quantificar células viáveis, baixo custo, maior facilidade de preparo e uso em relação a técnicas moleculares e sorológicas, embora possa permitir o crescimento de bactérias relacionadas à bactéria alvo (Lee *et al.*, 2009). Os meios NSCAA, BSCAA e SX ágar têm sido recomendados para detecção de Xcc (Randhawa e Schaad, 1984; Galli *et al.*, 2001; Tebaldi *et al.*, 2007). Além desses, os meios Xan-D (Lee *et al.*, 2009), FS e mCS20ABN (Chang *et al.*, 1991; Koenraad *et al.*, 2005), SMART-Xca (Kawanishi *et al.*, 2011) e SM ágar (Schaad *et al.*, 2001) também têm sido recomendados para a detecção desta bactéria. O meio Tween, recomendado para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, se mostrou eficiente na recuperação de isolados de Xcc (McGuire *et al.*, 1986). O meio YTSA-CC, recomendado para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*, também permite o crescimento de Xcc (Tripathi *et al.*, 2007),

### **1.2.2) Métodos moleculares**

Nas últimas décadas, um número significativo de técnicas moleculares baseadas na detecção do DNA do fitopatógeno foram desenvolvidas. Entre estas, os testes baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR; *polymerase chain reaction*) apresentam-se hoje como uma ferramenta auxiliar indispensável para se chegar a um resultado conclusivo. Técnicas moleculares, principalmente a PCR, são mais sensíveis para a detecção de patógenos, quando comparadas às outras técnicas, por serem capazes de detectar pequenas quantidades do patógeno na amostra (Sankaran *et al.*, 2010). Entretanto, a grande variabilidade genética presente entre populações no campo, uma consequência da ocorrência de frequentes mutações no genoma bacteriano, tem limitado

a sua utilização como um método de rotina por reduzir a especificidade (Gitaitis e Walcott, 2007).

Um dos problemas do uso da técnica de PCR é a detecção de células não viáveis. Para contornar este problema, uma variação da técnica, denominada Bio-PCR, tem sido utilizada. O princípio de funcionamento deste método é semelhante ao método convencional, porém, em vez de extrair o DNA bacteriano a partir de tecido infectado, primeiramente é feito o isolamento da fitobactéria em meio de cultura semi-seletivo e, a partir das colônias obtidas, o DNA é extraído (Gitaitis e Walcott, 2007). A combinação de meios semi-seletivos com técnicas moleculares baseadas na PCR tem se mostrado um método útil e seguro para a detecção de espécies de *Xanthomonas* (Lee *et al.*, 2009). Diversas variações da PCR convencional, como por exemplo, *nested* e *semi-nested* PCR tem sido utilizadas como alternativas para aumento da especificidade, porém demandam mais tempo, têm maiores riscos de contaminação e são menos sensíveis que outras técnicas (Vandroemme *et al.*, 2008).

A existência de *primers* específicos aumenta a sensibilidade da técnica. Park *et al.* (2004) utilizaram os *primers* XCR e XCF e obtiveram o produto da PCR apenas para Xcc. Zaccardelli *et al.* (2007) detectaram especificamente Xcc através de PCR usando os *primers* HrcCR2 e HrcCF2. *Primers* universais também podem ser usados para a detecção da bactéria, como demonstrado por Leite *et al.* (1994) ao utilizar os *primers* Rst21 e Rst22, e os *primers* Rst9 e Rst10.

### **1.2.3) Testes de patogenicidade**

A reação de hipersensibilidade (HR) e a inoculação de bactérias fitopatogênicas em plantas ou órgãos vegetais destacados, sendo estes suscetíveis, são os métodos biológicos existentes para testar a patogenicidade de um determinado isolado (Romeiro, 2001). Na reação de HR, uma suspensão bacteriana é infiltrada em folhas de uma planta não-hospedeira com auxílio de uma seringa. Se a bactéria for fitopatogênica, ocorrerá morte celular local em cerca de 24 horas (Bergamin Filho *et al.*, 1995).

A inoculação visa à reprodução de sintomas típicos da doença (Romeiro, 2001). Há várias maneiras de se inocular um material vegetal com bactérias, variando de acordo com o material a ser inoculado e com o organismo que se quer inocular (Mafia *et al.*, 2005). Wulff *et al.* (2002) inocularam brássicas com suspensão de Xcc, concentração de  $5 \times 10^8$  ufc/ mL, por meio de pulverização. Segundo o Manual de Análises Sanitárias de Sementes do Ministério de Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA, 2009), a inoculação deve ser feita utilizando alfinete entomológico ou estilete previamente esterilizado, para que possa estar contaminado apenas com Xcc no momento da inoculação. Procede-se então à inoculação de nervuras principais próximas à borda das duas folhas mais jovens e aguarda-se a reprodução de sintomas. Miguel-Wruck *et al.* (2010) inocularam oito espécies de brássicas com 33 isolados de Xcc pela infiltração da suspensão bacteriana e foi verificada variação entre os isolados quanto à sua patogenicidade às diferentes espécies inoculadas.

Utilizando oito meios semi-seletivos nos quais foi verificado o crescimento de Xcc, quatro pares de *primers* específicos e testes biológicos utilizados para detecção e confirmação da identidade do patógeno em questão, o objetivo do presente trabalho foi avaliar e comparar a eficiência desses meios semi-seletivos e a especificidade de *primers* para a detecção de Xcc.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1) Obtenção dos isolados

Foram recebidos 29 isolados, supostamente de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, oriundos de diversos hospedeiros e de várias regiões do Brasil (Tabela 2), que foram utilizados nos experimentos. Além dos isolados de Xcc, foi utilizado um isolado de *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Xtu), agente causal da estria bacteriana do trigo; um isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), agente causal da pinta bacteriana do tomateiro; um isolado de *Pseudomonas corrugata* (P. cor), agente causal da necrose da medula do tomateiro; e um isolado de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), agente causal do cancro bacteriano do tomateiro. Estes quatro últimos isolados foram obtidos da coleção de fitobactérias do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa e foram utilizados apenas nos testes moleculares.

Quando foram recebidos materiais vegetais sintomáticos, o procedimento de isolamento adotado foi o método padrão, como descrito por Romeiro (2001). Após a obtenção de colônias isoladas com características típicas do patógeno no meio 523 de Kado e Heskett (1970) em placas de Petri, foi feita a repicagem da bactéria para tubos contendo meio 523 sólido inclinado, seguido de incubação em B.O.D. a 28°C por 48 horas. Todos os isolados obtidos foram submetidos a testes de patogenicidade.

Quando foram recebidos isolados em tubo, placa ou em tampão fosfato, a bactéria foi repicada para placas de Petri contendo meio 523 sólido, pelo método das estrias compostas e, a partir deste ponto, o procedimento adotado foi o mesmo utilizado quando foi recebido o material vegetal infectado.

### 2.2) Armazenamento e manutenção dos isolados

O armazenamento dos isolados foi feito de duas formas diferentes (em óleo mineral e em glicerol) para garantir a manutenção de células viáveis.

Os isolados foram repicados para tubos de vidro (tipo penicilina) contendo meio 523 sólido até aproximadamente metade do seu volume e incubados em B.O.D. a 28°C por 48h. Feito isso, o crescimento foi coberto com óleo mineral autoclavado, os frascos foram tampados com tampa de borracha estéril, lacrados com lacre de alumínio e armazenados em geladeira a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ .

Para armazenamento em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foi preparada solução de glicerol a 30% e autoclavada em tubos criogênicos contendo 500  $\mu\text{L}$  da solução. Cada isolado foi

cultivado em tubo inclinado, foi preparada a suspensão com o crescimento bacteriano de cada isolado e 500 µL desta suspensão foram transferidos para um tubo contendo glicerol a 30%. Após homogeneização da suspensão os tubos foram armazenados em freezer a -80°C.

### 2.3) Confirmação da identidade dos isolados

Todos os isolados foram submetidos aos testes de utilização de asparagina e produção de xantomonadinas, além de terem a região 16S do genoma sequenciado, para confirmar se eram ou não pertencentes ao gênero *Xanthomonas*.

Tabela 2. Origem dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* utilizados para avaliação da eficiência dos meios semi-seletivos e da especificidade dos *primers*.

Código	Origem	Hospedeiro	Colaborador	Instituição
X 01	Curitiba-PR	Repolho	Ruaro, L.	UFPR
X 02	Viçosa-MG	Couve	Amaral, L. S.	UFV
X 03	Florianópolis-SC	Couve	Di Piero, R. M.	UFSC
X04	Ponta Grossa-PR	Repolho	Husch, P.	UEPG
S2	Camocim-PE	Repolho	Lima, R. M.	UFRPE
S3	Camocim-PE	Repolho	Lima, R. M.	UFRPE
S4	Camocim-PE	Repolho	Lima, R. M.	UFRPE
C13	Camocim-PE	Repolho	Lima, R. M.	UFRPE
AXcc 6	Pelotas-RS	Repolho	Moura, A. B.	UFPEl
AXcc 11	Pelotas-RS	Repolho	Moura, A. B.	UFPEl
Xcc 2	Manaus-AM	Repolho	Nagata, A. K. I.	EMBRAPA
Xcc 8	São Luís-MA	Repolho	Nagata, A. K. I.	EMBRAPA
Xcc 10	Vitória do Sto. Antonio-PE	Couve-flor	Nagata, A. K. I.	EMBRAPA
Xcc 14	Brasília-DF	Acelga	Nagata, A. K. I.	EMBRAPA
Xcc 83	Colombo-PR	Couve	Nagata, A. K. I.	EMBRAPA
Xcc 89	Orizona-GO	Brócolis	Nagata, A. K. I.	EMBRAPA
Xcc 92	Orizona-GO	Brócolis	Nagata, A. K. I.	EMBRAPA
Xcc 103	Rancho Queimado-SC	Brássica	Nagata, A. K. I.	EMBRAPA
Xcc 105	Rancho Queimado-SC	Repolho	Nagata, A. K. I.	EMBRAPA
Xcc 320	Sergipe-PE	Couve	Nagata, A. K. I.	EMBRAPA
L 2	Lavras- MG	Couve	Souza, R. M.	UFLA
L 3	Lavras- MG	Repolho	Souza, R. M.	UFLA
L 4	Lavras- MG	Couve	Souza, R. M.	UFLA
L 5	Lavras- MG	Couve	Souza, R. M.	UFLA

#### 2.3.1) Produção de xantomonadinas

Para extração de xantomonadinas, o protocolo utilizado por Angeles - Ramos *et al.* (1991) foi adotado, com algumas modificações. A bactéria foi cultivada em caldo

nutriente a 28°C por vários dias até que o meio de cultura se tornasse bastante turvo. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 10.000g/15 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas com água destilada. Esse procedimento foi repetido três vezes. Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em metanol (grau analítico), a suspensão foi transferida para tubos de ensaio e procedeu-se à extração em banho-maria a 90°C por 10 minutos. Foi feita uma centrifugação a 10.000g/15 minutos e coletado o sobrenadante contendo o pigmento extraído. Foi feita uma varredura com leituras de absorvância de 1 em 1 nm, entre 400 nm e 500 nm. Para xantomonadinas, espera-se a visualização de picos em torno de 420 nm, 441 nm e 468 nm (Starr e Stephens, 1964). Como controle positivo foi utilizado um isolado de Xtu e como controle negativo um isolado de Pst.

### **2.3.2) Utilização de asparagina como única fonte de carbono**

Os isolados foram repicados para meio de cultura contendo asparagina como única fonte de carbono (meio Asparagina - Anexo I). Para cada isolado foram utilizados dois tubos contendo o meio, os quais, após a repicagem, foram incubados em B.O.D. a 28°C por cinco dias. Após este período, uma alíquota de 100 µl da suspensão de cada tubo foi pipetada para um novo tubo contendo o meio líquido com asparagina, os quais também foram incubados em B.O.D. a 28°C por cinco dias. Isso foi feito para certificar que a turbidez do meio se tratava de crescimento bacteriano, e não de células remanescentes da repicagem inicial. Após a incubação, procedeu-se à avaliação visual do crescimento. O meio contendo isolado capaz de utilizar asparagina como única fonte de carbono apresentou-se turvo enquanto, para os isolados incapazes de utilizar asparagina, o meio apresentou-se cristalino.

### **2.3.3) Sequenciamento**

A extração do DNA bacteriano foi feita utilizando o Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Após extração o DNA foi armazenado a -20°C.

Na reação para amplificação da região 16S do DNA bacteriano, foram utilizados os *primers* 27F e 1492 R (Tabela 3). As reações de PCR foram montadas utilizando 2 µl de DNA (20 ng/ µl), 2,5 µl de tampão (10x) contendo MgCl<sub>2</sub>, 2 µl dos dNTP's (2,5 mM), 1 µl de cada *primer*, 0,2 µl de Taq DNA polimerase (5U/ µl) e o volume foi completado para 25 µl com água destilada autoclavada.

Após adicionar os componentes da reação, procedeu-se à desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos (94°C por 45 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos) e extensão final a 72°C por 7 minutos. Alíquotas de cada amplificação foram analisadas através da eletroforese em gel de agarose 1%, voltagem a 90 V constante e corrente a 400 mA. Para corrida utilizou-se o tampão de carregamento (0,25% de azul de bromofenol e 50% de sacarose) adicionado com o corante GelRed (1 µl/mL). Foi utilizado marcador de 1 kb (Invitrogen™). O tamanho esperado da banda foi de 1465 pb (Lane *et al.*, 1991). Os géis foram fotografados utilizando-se o fotodocumentador L Pix (Loccus Biotecnologia), para posterior análise.

Para sequenciamento, os produtos da amplificação da região 16S foram purificados utilizando-se o kit de purificação de DNA Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), e enviados para sequenciamento de acordo com as especificações da empresa (Macrogen Inc.). As sequências obtidas foram editadas manualmente e analisadas por BLAST com sequências depositadas no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)).

Dos 29 isolados recebidos, 24 foram confirmados como pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, os quais foram utilizados para a realização dos experimentos seguintes.

#### **2.4) Testes de patogenicidade**

Foram feitos testes de reação de hipersensibilidade (HR) em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) e tomate (*Solanum lycopersicum*), e de inoculação artificial em couve ‘Manteiga’ (*Brassica oleracea* var. *acephala*).

Para os testes de HR os isolados foram cultivados em meio 523 a 28°C por 48h. Foi adicionada água de torneira nos tubos e preparadas suspensões contendo aproximadamente 10<sup>8</sup> células/mL de cada isolado. Com auxílio de seringa, as suspensões foram injetadas no mesófilo das folhas mais jovens das plantas de fumo e nos folíolos dos tomateiros. Após 24 horas procedeu-se a avaliação para observação de sintomas típicos de HR.

Para a inoculação artificial foram utilizadas plantas de couve ‘Manteiga’ cultivadas por 60 dias. Os isolados foram semeados em meio 523 e mantidos em incubação a 28°C por 48h. Com auxílio de alfinete entomológico estéril, células da bactéria foram transferidas para três pontos nos bordos da folha, próximos às nervuras. Foram utilizadas duas folhas por planta (as duas mais novas) e duas plantas por isolado. Foram feitas avaliações diárias para observação do aparecimento de sintomas típicos

(lesões progressivas a partir dos bordos das folhas em forma de ‘V’, necróticas, com halo amarelo e nervuras escuras).

## **2.5) Avaliação dos meios semi-seletivos**

Foram testados os seguintes meios de cultura, descritos na literatura para a detecção de Xcc: meios FS e mCS20ABN (Chang *et al.*, 1991), YDC (Schaad *et al.*, 2001), Tween (McGuire *et al.*, 1986), SX ágar (Schaad e White, 1974), BSCAA (Randhawa e Schaad, 1984), NSCAA (Schaad e Stall, 1994); YTSA-CC (Tripathi *et al.*, 2007); e Xan-D (CCF) (Lee *et al.*, 2009). O meio 523 de Kado e Heskett (1970) foi utilizado como meio padrão para cultivo dos isolados. As composições dos meios utilizados estão apresentadas no Apêndice I.

Após serem cultivados em meio 523 líquido a 28°C por 48h em mesa agitadora a 120 rpm, 30 µl da suspensão de cada isolado foram transferidos para 270 µl de solução salina estéril, em placas de microtitulação e foram feitas diluições na ordem de 1:10 até a diluição de 10<sup>-6</sup>. Foram transferidos 75 µl das três últimas diluições para placas de Petri contendo o meio de cultura a ser testado e a suspensão foi espalhada com auxílio de alça de Drigalski previamente flambada.

Após a incubação a 28°C, por até sete dias, avaliou-se, para cada isolado, crescimento, tempo para crescimento, forma, elevação, formato dos bordos, textura, cor, brilho, aspecto, crescimento mucóide, formação de halos de hidrólise de amido e lipólise de Tween.

## **2.6) Detecção com *primers* específicos**

As reações com *primers* específicos foram realizadas como descrito no item 2.3.3. Para os controles utilizou-se água destilada autoclavada e DNA extraído de Xtu, Pst, P. cor e Cmm. Foram utilizados os *primers* XCF e XCR, HrcCF2 e HrcCR2, Rst9 e Rst10, e Rst21 e Rst22 (Tabela 3).

As reações com os *primers* específicos XCF e XCR foram realizadas em termociclador com a desnaturação inicial ocorrendo a 94°C por 5 minutos precedente aos 35 ciclos, cada um com 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C, e a extensão final a 72°C por 5 minutos. Para os *primers* HrcCF2 e HrcCR2, a amplificação iniciou com a desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 15 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto e anelamento-extensão a 72°C por 1,5 minutos. Após isso houve mais 15 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, porém com o

anelamento ocorrendo a 59°C por 30 segundos e a extensão a 72°C por 1 minuto, com a extensão final a 72°C por 5 minutos. Foi testado um protocolo modificado no qual a amplificação iniciou-se com a desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 59°C por 30 segundos e a extensão a 72°C por 1 minuto, com a extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para os *primers* Rst9 e Rst10, a amplificação iniciou-se com desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos no termociclador. Cada ciclo consistiu de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A última extensão durou 5 minutos a 27°C. Quando foram testados os *primers* Rst21 e Rst22, após a desnaturação a 95°C por 10 minutos, ocorreram 35 ciclos, cada um constando de 95°C por 30 segundos, 61°C por 40 segundos e 72°C por 45s. A extensão final ocorreu a 72°C por 5 minutos.

A eletroforese e a fotodocumentação foram realizadas como descrito no item 2.3.3.

Tabela 3. *Primers* utilizados neste trabalho com suas respectivas sequências, tamanho do produto da amplificação e referências.

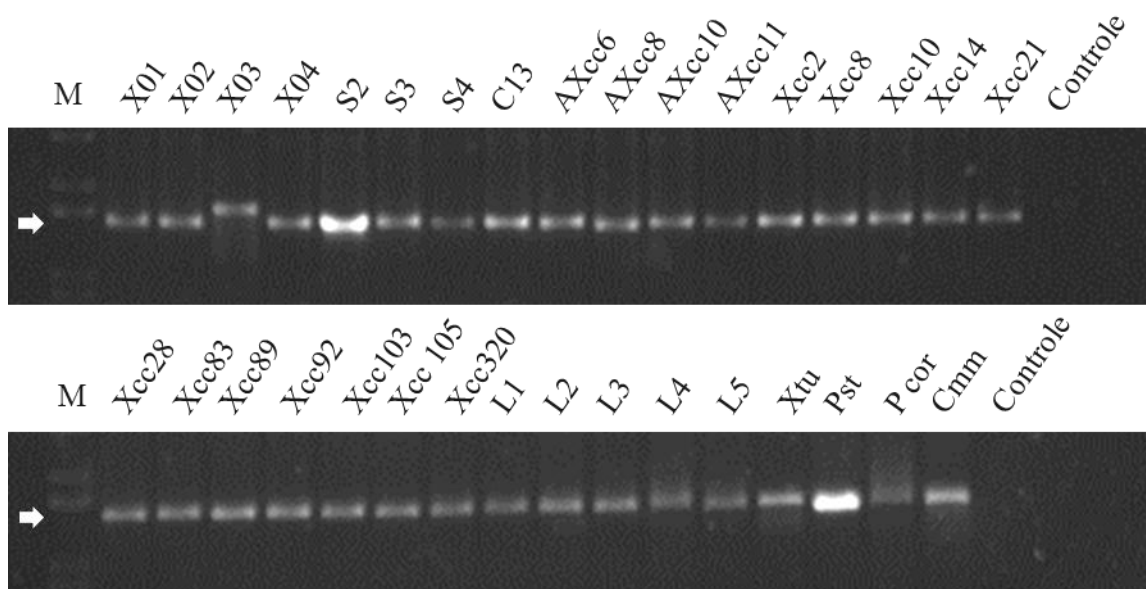
<i>Primer</i>	Sequência	Fragmento amplificado	Referência
XCR	5'-CTGTTGATGGTGGTCTGCAA-3'	535 pb	Park <i>et al.</i> , 2004
XCF	5'-CGATTCGGCCATGAATGACT-3'		
HrcCR2	5'-CAGATCTGTCTGATCGGTGTCG-3'	519 pb	Zaccardelli <i>et al.</i> , 2007
HrcCF2	5'-CGTGTGGATGTGCAGACC-3'		
Rst21	5'-GCACGCTCCAGATCAGCATCGAGG-3'	1075 pb	Leite <i>et al.</i> , 1994
Rst22	5'-GGCATCTGCATGCGTGCTCTCCGA-3'		
Rst9	5'-GGCACTATGCAATGACTG-3'	355 pb	
Rst10	5'-AATACGCTGGAAGTCTG-3'		
1492R	5'-ACCTTGTTACGACTT-3'	1465 pb	Lane <i>et al.</i> , 1991
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'		

### 3. RESULTADOS

#### 3.1) Identidade dos isolados

Dentre os 29 isolados recebidos, apenas para cinco (Axcc8, Axcc10, Xcc21, Xcc28 e L1) não foi possível visualizar a curva de absorbância característica para xantomonadinas. Os picos de absorbância característicos quando o solvente extrator é o metanol ocorrem em torno dos comprimentos de onda de 420 nm, 441 nm (pico de absorção máxima) e 468 nm (Starr e Stephens, 1964), os quais foram observados para 24 dos 29 isolados.

Apenas os isolados Axcc8, Axcc10 e S2 foram capazes de utilizar asparagina como única fonte de carbono e, em relação ao sequenciamento, os isolados Axcc8 e Axcc10 foram confirmados como pertencentes ao gênero *Curtobacterium* e à família Enterobacteriaceae, respectivamente. Para os isolados X03, Xcc14, Xcc105 e Xcc320 não foi possível obter as sequências provavelmente devido a alguma falha na purificação do produto da amplificação da região 16S (Figura 1). A amplificação da região 16S rDNA serviu também como controle positivo para os testes com *primers* específicos. Com estes resultados, os demais experimentos foram conduzidos com os 24 isolados que foram positivos para a produção de xantomonadinas.



**Figura 1.** Produto da amplificação da região 16S de cada isolado bacteriano com tamanho de 1465 pb. Foram utilizados os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (X01 a L5), *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Xtu), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Pseudomonas corrugata* (P cor) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

(Cmm). A seta à esquerda indica a posição da banda no gel comparada ao marcador (M).

### 3.2) Testes de patogenicidade

Os resultados dos testes mostraram variação dos isolados quanto à capacidade tanto em induzir HR quanto em induzir sintomas típicos da podridão negra em plantas de couve (Tabela 4).

Tabela 4. Tempo após inoculação para aparecimento dos sintomas nos testes de indução de reação de hipersensibilidade e inoculação artificial, e hospedeiro de onde foi obtido cada isolado.

Isolado	HR		Patogenicidade Couve	Hospedeiro
	Fumo	Tomate		
X 01	36h	48h	12 dias	Repolho
X 02	-	-	9 dias	Couve
X 03	36h	48h	9 dias	Couve
X 04	-	-	9 dias	Repolho
S2	48h	48h	-	Repolho
S3	-	-	-	Repolho
S4	-	48h	9 dias	Repolho
C13	48h	48h	10 dias	Repolho
AXcc 6	-	-	9 dias	Repolho
AXcc 11	-	-	9 dias	Repolho
Xcc 2	36h	-	9 dias	Repolho
Xcc 8	-	48h	-	Repolho
Xcc 10	48h	-	-	Couve-flor
Xcc 14	48h	48h	9 dias	Acelga
Xcc 83	-	-	-	Couve
Xcc 89	-	-	-	Brócolis
Xcc 92	48h	-	-	Brócolis
Xcc 103	48h	-	9 dias	Brássica
Xcc 105	60h	-	-	Repolho
Xcc 320	-	48h	12 dias	Couve
L 2	-	48h	14 dias	Couve
L 3	-	48h	9 dias	Repolho
L 4	48h	-	-	Couve
L 5	-	48h	-	Couve

Dos 24 isolados inoculados em plantas de fumo, apenas 11 induziram sintomas semelhantes aos de HR (Figura 2A) os quais apareceram entre 36 e 60 horas. Em tomateiro, apenas 11 isolados induziram sintomas semelhantes aos de HR. Neste caso, o aparecimento dos sintomas ocorreu às 48 horas após a inoculação para todos os isolados. Tanto para o fumo quanto para o tomateiro, considerou-se que não houve desenvolvimento de sintomas típicos de HR.

Quando inoculados em plantas de couve, os sintomas apareceram entre 9 e 15 dias. Dos 24 isolados inoculados por este método, 14 isolados induziram sintomas nas plantas (Figura 2B). Em nenhum dos casos ocorreu o aparecimento dos sintomas em todos os 12 pontos de inoculação.



**Figura 2.** Testes de patogenicidade: (A) Folha de tomateiro inoculada com suspensão de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* exibindo sintomas semelhantes aos da reação de hipersensibilidade. (B) Folha de couve exibindo sintoma típico da podridão negra (mancha cuneiforme partindo dos bordos da folha com escurecimento de nervuras).

### 3.3) Crescimento dos isolados de Xcc nos meios semi-seletivos

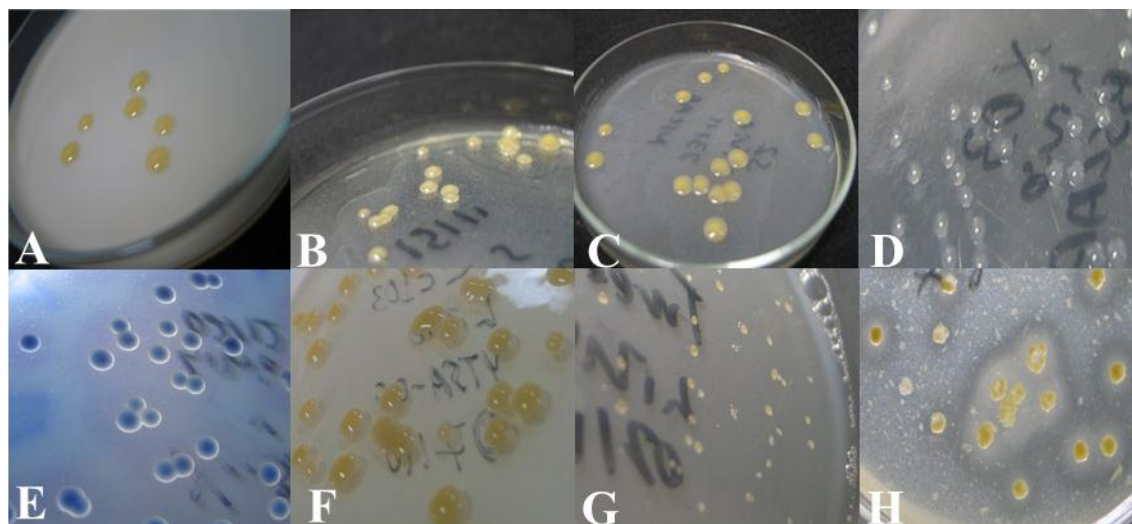
Quando foi avaliado o crescimento dos isolados, verificou-se que apenas o meio NSCAA, dentre os meios semi-seletivos, permitiu o crescimento de todos os isolados (Tabela 5). O meio YDC (padrão) suportou o crescimento de todos os isolados após 1-2 dias de incubação.

Tabela 5. Porcentagem de isolados que cresceram nos diferentes meios de cultura semi-seletivos e tempo decorrido após semeio da suspensão bacteriana para o desenvolvimento das colônias.

	YDC	FS	mCS20ABN	NSCAA	BSCAA	Tween	SX	YTSA-CC	Xan-D
<b>% Isolados</b>	100	0	95,8	100	87,5	16,7	41,7	91,7	95,8
<b>Tempo (dias)</b>	1-2	-	2-5	3-4	5-7	5	4-5	2-3	3-4

Quanto às características exibidas pelos isolados de Xcc, em meio YDC as colônias cresceram circulares, com bordos regulares, elevadas, lisas, amarelo palha,

brilhantes com aspecto mucóide ou plástico (Figura 3A). Em meio mCS20ABN, os isolados cresceram circulares, com bordos regulares, elevados, lisos, amarelo palha, brilhantes com aspecto mucóide ou plástico e apresentando halo de hidrólise de amido (Figura 3B). No meio mCS20ABN, o isolado Xcc 83 não cresceu. Nenhum isolado foi capaz de crescer em meio FS.



**Figura 3.** Colônias isoladas de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* crescendo nos meios YDC (A), mCS20ABN (B), NSCAA (C), BSCAA (D), SX (E), YTSA-CC (F), Tween (G) e Xan-D (H).

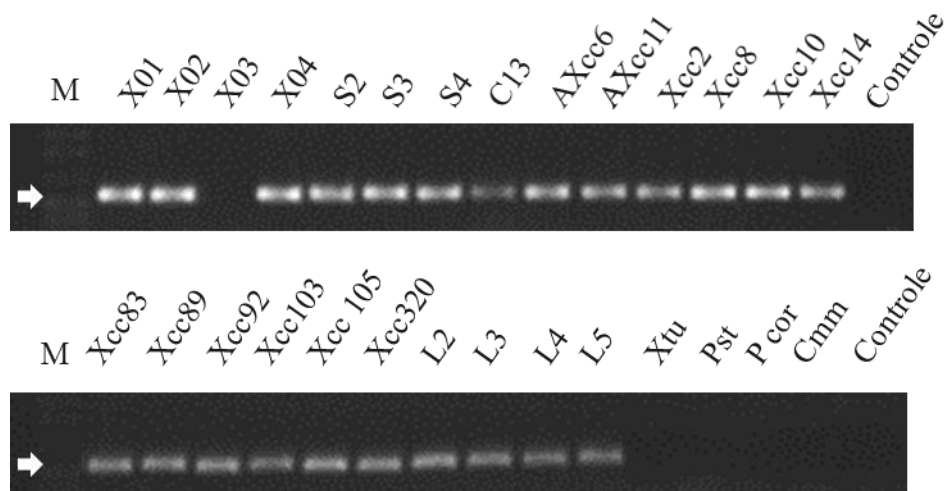
Em meio BSCAA, as colônias cresceram circulares, com bordos regulares, elevadas, lisas, coloração variando entre incolor (Figura 3D), esbranquiçada, esverdeada e amarela, brilhantes, translúcidas, circundadas por halo de hidrólise de amido que rapidamente coalesciam e não puderam mais ser vistas ao longo do crescimento bacteriano no meio. Os isolados, Xcc 83, Xcc 89 e Xcc 92 não foram capazes de crescer em meio BSCAA. Quando semeadas em meio NSCAA, os isolados cresceram circulares, com bordos regulares, elevados, lisos, com cor amarelo palha, brilhantes e com aspecto mucóide, plástico, oleoso ou de “ovo frito”. Colônias de três isolados (S2, Xcc 105 e L5) apresentaram halo de hidrólise de amido nesse meio de cultura (Figura 3C). No meio SX ágar, após 4 a 5 dias de incubação, apenas 10 isolados de Xcc (X03, X04, S2, S4, C13, Axcc 11, Xcc 14, Xcc 320, L2 e L3) cresceram exibindo colônias circulares, com bordos regulares, elevadas, lisas, coloração variando entre azul e azul clara, brilhantes, com aspecto de “ovo frito” e circundadas por halo de hidrólise de amido (Figura 3E).

Em meio YTSA-CC, os isolados cresceram circulares, com bordos regulares, elevados, lisos, com coloração amarelo palha, brilhantes, com aspecto plástico, mucóide ou oleoso (Figura 3F). Apenas os isolados Xcc 10 e Xcc 83 não cresceram nesse meio.

Os meios Xan-D e Tween possuem Tween 80 em suas composições. No meio Xan-D, os isolados apresentaram colônias circulares, com bordos irregulares, elevadas, rugosas, com coloração esbranquiçada ou amarela clara, pouco brilhantes, aspecto plástico ou mucóide e podendo apresentar halo de lipólise de Tween (Figura 3G). O isolado AXcc 6 não foi capaz de crescer nesse meio e os isolados AXcc 11, Xcc 8 e Xcc 92 não formaram halo de lipólise de Tween. Apenas 4 isolados cresceram em meio Tween (C13, Xcc 2, L2 e L5), apresentando colônias circulares, com bordos regulares, elevados, lisos, amarelo claros, brilhantes e mucóides (Figura 3H).

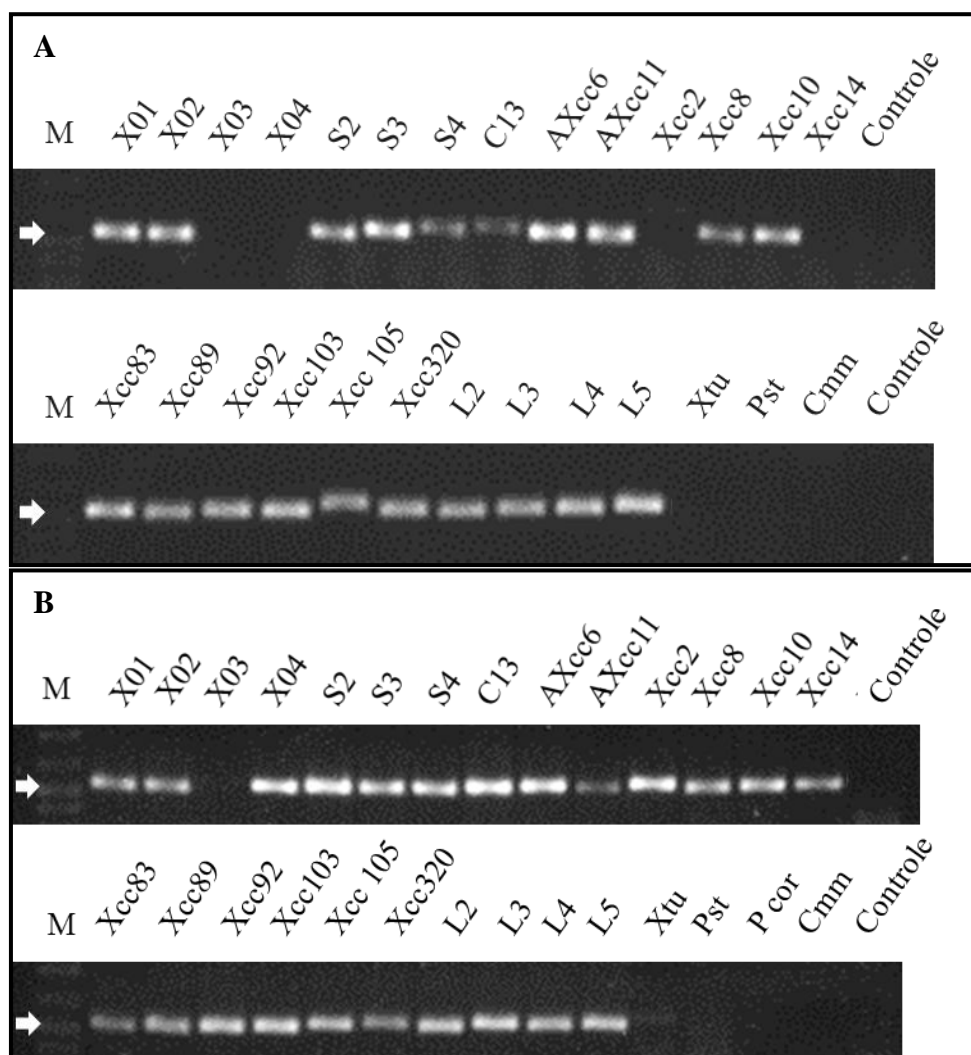
### 3.4) Detecção com *primers* específicos

Com relação à amplificação com os *primers* específicos XCR e XCF, os quais amplificam a região *hrpX*, responsável pela patogenicidade das espécies de *Xanthomonas* a seus hospedeiros, houve amplificação para 23 isolados de Xcc (Figura 4). Não houve amplificação para os isolados de Xtu, Pst, P. cor e Cmm, utilizados como controle negativo.



**Figura 4.** Produto da amplificação com os *primers* XCR e XCF com tamanho de 535 pb. Foram utilizados os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (X01 a L5), *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Xtu), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Pseudomonas corrugata* (P cor) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). A seta à esquerda indica a posição da banda no gel comparada ao marcador (M). A presença da banda indica que o isolado é de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

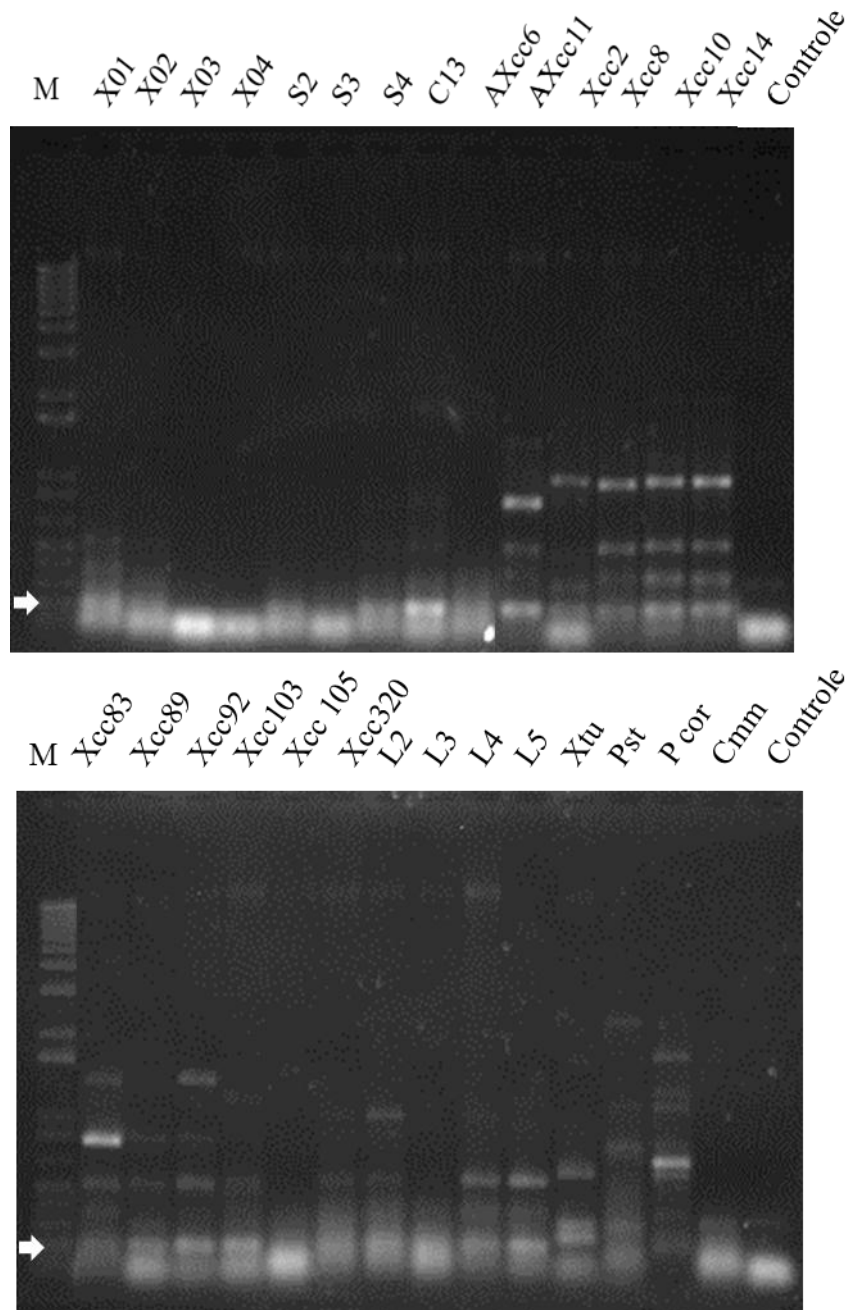
Quando utilizados os *primers* HrcCR2 e HrcCF2, seguindo o protocolo da reação de PCR proposto por Zaccardelli *et al.* (2007), houve amplificação apenas para 21 isolados (Figura 5A), mas quando se utilizou o protocolo modificado, os resultados obtidos foram idênticos aos obtidos com os *primers* XCR e XCF (Figura 5B).



**Figura 5.** Produto da amplificação com os *primers* HrcCR2 e HrcCF2 com tamanho de 519 pb. (A) protocolo utilizado por Zaccardelli *et al.* (2007). (B) protocolo modificado. Foram utilizados os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (X01 a L5), *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Xtu), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Pseudomonas corrugata* (P cor) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). A seta à esquerda indica a posição da banda no gel comparada ao marcador (M). A presença da banda indica que o isolado é de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

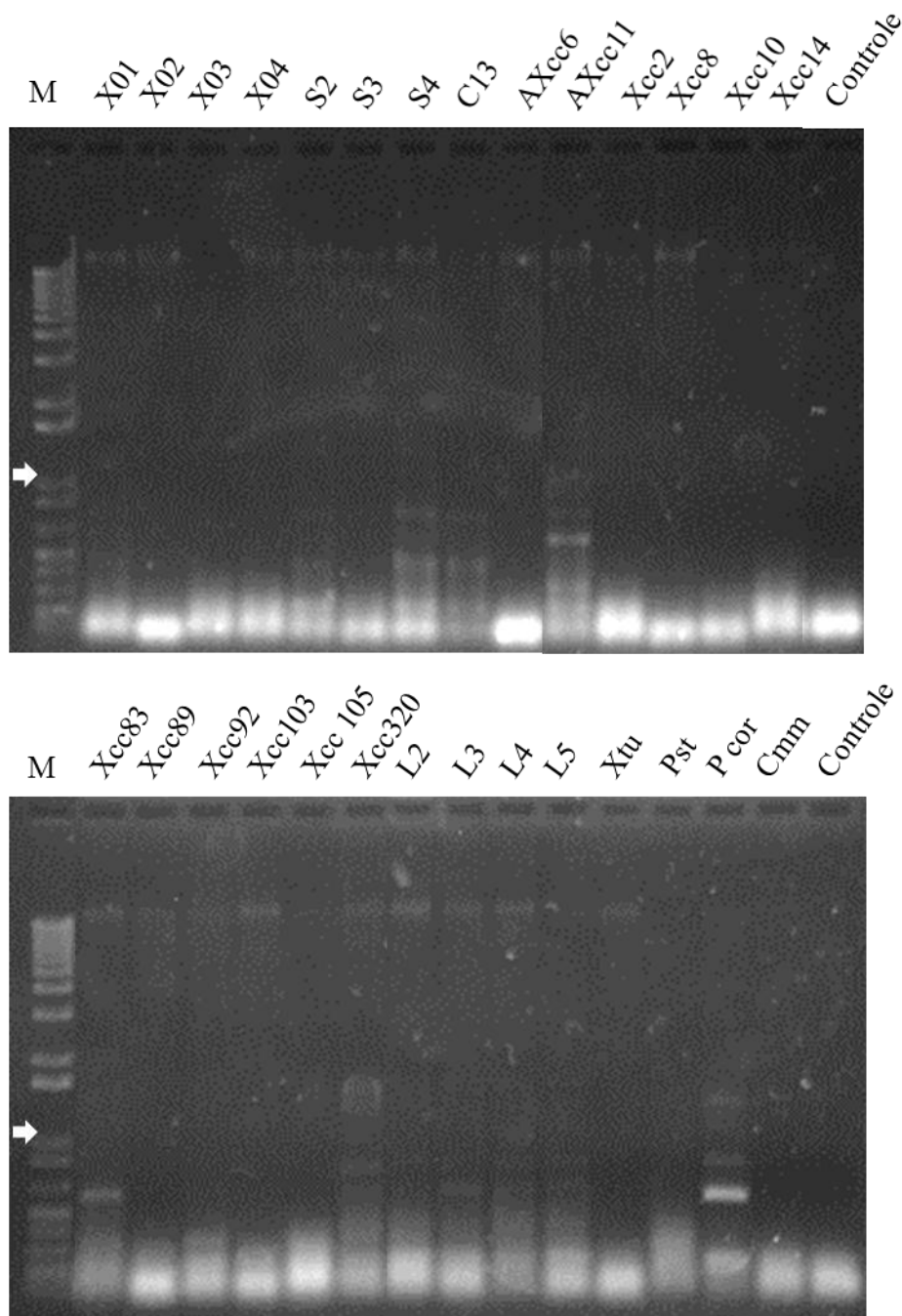
Os resultados obtidos para os *primers* Rst9 e Rst10, bem como para os *primers* Rst21 e Rst22, não foram satisfatórios. Estes *primers* supostamente amplificam a região onde se encontram os genes *hrp* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Para o

primeiro par de *primers* testado, além da difícil visualização pela formação de *primer dimer* (dimerização dos *primers*), já que o tamanho da banda específica é de 355 pb (Figura 6), houve amplificação de diversas partes do genoma dos isolados resultando na produção de bandas inespecíficas no gel.



**Figura 6.** Produto da reação de PCR com os *primers* Rst9 e Rst10. Foram utilizados os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (X01 a L5), *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Xtu), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Pseudomonas corrugata* (P cor) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). A seta à esquerda indica onde deveria aparecer a banda correspondente a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (355 pb) comparada ao marcador (M).

Para os *primers* Rst21 e Rst22, observou-se a ocorrência de bandas inespecíficas na amplificação (Figura 7), e a banda correspondente ao tamanho de fragmento esperado (1075 pb) não foi observada.



**Figura 7.** Produto da reação de PCR com os *primers* Rst21 e Rst22. Foram utilizados os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (X01 a L5), *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (Xtu), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), *Pseudomonas corrugata* (P cor) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). A seta à esquerda indica onde deveria aparecer a banda correspondente a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (1075 pb) comparada ao marcador (M).

#### 4. DISCUSSÃO

Para confirmar a identidade dos isolados, o principal critério de seleção utilizado foi a produção de xantomonadinas, uma vez que, dentre as bactérias fitopatogênicas, apenas as do gênero *Xanthomonas* produzem esse pigmento (Garrity *et al.*, 2004). O teste de utilização de asparagina e a análise das sequências amplificadas da região 16S rDNA de cada isolado foram utilizados como critérios secundários. Há relatos de isolados de *Xanthomonas* que são capazes de utilizar asparagina (Trébaol *et al.*, 2000; Nowbuth *et al.*, 2005; Shenge *et al.*, 2005), o que pode explicar a capacidade do isolado S2 em utilizá-la como única fonte de carbono. Sabe-se que falhas durante a purificação do produto da amplificação da PCR podem acarretar em resultados não confiáveis (Sankaran *et al.*, 2010). Tal fato pode explicar a não obtenção das sequências dos produtos das amplificações da região do 16S rDNA para os isolados X03, Xcc 14, Xcc 105 e Xcc 320.

O uso de plantas de fumo e de tomateiro para o teste de HR não se mostraram eficientes. Apenas 11 isolados induziram sintomas nas plantas de fumo inoculadas, os quais apareceram entre 36 e 60 horas. Também, em tomateiro apenas 11 isolados induziram sintomas, os quais ocorreram às 48 horas após a inoculação. Embora tenha havido a reprodução de sintomas, HR é caracterizada por indução dos sintomas típicos rapidamente (24 horas após a inoculação). Portanto, tanto para o fumo quanto para o tomateiro, considerou-se que não houve desenvolvimento de sintomas típicos de HR. Romeiro (2001) afirma que muitas espécies bacterianas fitopatogênicas, inclusive espécies de *Xanthomonas*, não são capazes de induzir HR em diversas plantas não hospedeiras. Portanto, outras plantas não-hospedeiras podem ser testadas e utilizadas. Kamoun *et al.* (1992), por exemplo, utilizaram plantas de pimenta para indução de HR por Xcc e *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* (Xca) e obtiveram sintomas típicos para todos os isolados testados. Já Janse *et al.* (2001) inocularam 18 espécies vegetais com *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, mas apenas *Epipremnum aureum* exibiu sintomas de HR. Embora o teste de indução de HR em fumo e tomateiro não tenha sido um bom indicador de patogenicidade para Xcc, é interessante encontrar uma planta que produza sintomas típicos de HR quando inoculada com a bactéria em questão, pois os resultados são mais rápidos que o teste de patogenicidade por inoculação artificial em plantas hospedeiras.

Alguns isolados não induziram sintomas de podridão negra nas plantas de couve inoculadas. Há que se considerar, neste caso, a variabilidade patogênica de Xcc, conforme já relatado por alguns autores (Vicente *et al.*, 2006; Ignatov *et al.*, 2007; Miguel-Wruck *et al.*, 2010). O teste de patogenicidade por meio da inoculação artificial foi feito apenas em couve, para todos os isolados, independente de terem sido ou não isolados de couve. Além disso, isolados que não foram patogênicos à couve foram detectados pelo uso de *primers* específicos para Xcc. Miguel-Wruck *et al.* (2010) verificaram que 19 de 33 isolados de Xcc testados apresentaram especificidade de hospedeiro e classificaram estes em 3 grupos de similaridade. Utilizando uma série diferenciadora, Jense *et al.* (2010) encontraram 4 das 6 raças até então conhecidas de Xcc, mais uma raça denominada raça 7, em plantações de repolho no Nepal. Foram detectadas 5 das 6 raças conhecidas de Xcc, além de outras diferentes, em brássicas silvestres na Califórnia-EUA (Ignatov *et al.*, 2007). De acordo com Vicente *et al.* (2006), existem pelo menos 4 patovares de *X. campestris* capazes de causar doença em brássicas sendo elas *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *armoraciae* (Xca), *X. campestris* pv. *incanae* (Xci) e *X. campestris* pv. *raphani* (Xcr), a qual pode também causar doença em tomateiro, *Xanthomonas campestris* isolada de *Cheiranthus cheiri* e *X. campestris* isolada de *Iberis* sp.. Fargier *et al.* (2010) ainda citam, além de Xcc, Xca, Xci e Xcr, *X. campestris* pv. *aberrans* e *X. campestris* pv. *barbareae*, mas sugere que esta última seja reclassificada. No Brasil não há estudos conclusivos a respeito da ocorrência dos outros patovares de *X. campestris* causando doença em brássicas.

Outro fato a ser considerado, em relação à não indução de sintomas da doença por alguns isolados, se refere ao método de inoculação utilizado. Cada isolado foi inoculado em três pontos de inoculação por folha, sendo duas folhas por planta e duas plantas por isolado, totalizando 12 pontos de inoculação. Quando ocorreu a indução dos sintomas da podridão negra nas plantas inoculadas por 14 dos 24 isolados, não houve, em nenhum dos casos, o aparecimento dos sintomas em todos os pontos de inoculação. A falta de reprodutibilidade na expressão dos sintomas mostra que, nas condições em que foi realizado, este não é um método de inoculação confiável. Bhat *et al.* (2010) testaram quatro métodos de inoculação de Xcc em brássicas. Os métodos testados foram o de inoculação por hidatódios, por estômatos, por corte com tesoura e por ferimentos nas nervuras com alfinete entomológico, o qual demonstrou ser o método mais eficiente por resultar na infecção de 100% das plantas inoculadas. Algumas diferenças em relação ao presente trabalho, porém, devem ser ressaltadas. No trabalho de Bhat *et al.*

(2010), os ferimentos não foram feitos nos bordos das nervuras e, após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida, o que propicia ao patógeno condições mais adequadas para movimentação e penetração. Tais diferenças podem ser determinantes para o aparecimento de sintomas e confirmação da patogenicidade da bactéria. Seabra Jr. *et al.* (2008) utilizaram o método de inoculação com palito em caule de brócolis e Sousa *et al.* (2003) utilizaram o método da imersão de raízes em suspensão de Xcc para determinação de genótipos resistentes. Ambos os métodos foram considerados bons pelos seus autores para tal finalidade e são alternativas para a determinação da patogenicidade de isolados desta bactéria.

A porcentagem de crescimento dos isolados de Xcc no meio NSCAA foi a maior (100%) dentre os meios semi-seletivos avaliados (Tabela 5). A exemplo dos resultados obtidos neste trabalho, o meio NSCAA foi mais eficiente na recuperação de isolados de Xcc que os meios SX e BSCAA nos trabalhos de Galli *et al.* (2001) e Tebaldi *et al.* (2007). Devido a isso, seria um excelente meio de cultura para utilização na detecção de Xcc. Em contrapartida, quando comparado aos meios FS e mCS20ABN, a eficiência do meio NSCAA foi menor em outros trabalhos (Chang *et al.*, 1991; Koenraadt *et al.*, 2005). Além disso, segundo Roberts *et al.* (2004) e Koenraadt *et al.* (2005), o meio NSCAA não se mostrou um bom meio semi-seletivo por permitir um maior crescimento de saprófitas que os meios FS e mCS20ABN. Por exemplo, Roberts *et al.* (2004) verificaram maior crescimento de isolados de Xcc em meio FS do que em meio mCS20ABN, o contrário do que foi observado no presente trabalho (Tabela 5). Nenhum dos 24 isolados de Xcc cresceu no meio FS, enquanto 95,8% deles cresceu no meio mCS20ABN. Também, Koenraadt *et al.* (2005) verificaram que os meios FS e mCS20ABN apresentaram melhores resultados que os outros meios testados (NSCAA e NSCA) e os recomendaram para a detecção de Xcc em sementes de brássicas. Isto mostra que existem diferenças entre isolados de Xcc do Brasil e de outros países. Portanto, a utilização de meios de cultura e outros métodos para detecção de Xcc desenvolvidos sem a utilização de isolados brasileiros podem não ser eficientes quando aqui utilizados. Tal fato, em uma análise de sementes, poderia produzir um resultado falso-negativo, liberando um lote infectado para ser comercializado, permitindo o desenvolvimento da doença no campo.

Os meios mCS20ABN, Xan-D, YTSA-CC e BSCAA permitiram o crescimento de um alto percentual dos isolados (Tabela 5), mostrando-se promissores para a detecção de Xcc por meio da utilização conjunta de dois ou mais dos mesmos.

Entretanto, o uso combinado dos meios mCS20ABN, YTSA-CC e BSCAA deve ser evitado, pois um mesmo isolado (Xcc 83) foi incapaz de crescer em ambos. Já os meios Tween e SX permitiram uma baixa recuperação dos isolados de Xcc (Tabela 5) e, assim como o meio FS, não são úteis para a detecção de Xcc no Brasil, pois podem permitir a obtenção de resultados falso-negativos.

Neste trabalho, apenas a capacidade de crescimento e as características dos isolados nos meios semi-seletivos foram observadas. Portanto, torna-se necessária a avaliação da supressividade e da repressividade nos meios semi-seletivos, para auxiliar na escolha do(s) melhor(es) meio(s) para detecção de Xcc. .

Nos meios em que não houve o crescimento dos isolados, a ação das substâncias antimicrobianas presentes parece ser a razão para a inibição do crescimento. Variações na sensibilidade de isolados bacterianos a uma mesma substância antimicrobiana são conhecidas. Oliveira (1995) verificou a existência de variação na sensibilidade de isolados de *X. campestris* pv. *vesicatoria* a diferentes substâncias antimicrobianas. A mesma variação na sensibilidade foi, também, relatada por Miguel-Wruck (2001) para isolados de *X. campestris* pv. *campestris*.

A não amplificação pelos *primers* XCF e XCR para os isolados de Xtu, Pst, P. cor e Cmm comprovam a especificidade do *primer* a nível de espécie, mas não ao nível de patovar. Park *et al.* (2004) utilizaram 46 isolados bacterianos sendo 10 de Xcc, 30 de outras espécies de *Xanthomonas* e 4 de outros gêneros para testar a especificidade destes *primers*. Apenas para os isolados de Xcc houve amplificação. O isolado X03, a exemplo dos isolados Xcc14 e Xcc320, foi capaz de causar doença em couve, mas não foi detectado pelos *primers*. Como Park *et al.* (2004) não utilizaram nenhum outro patovar de *Xanthomonas campestris* capaz de causar doença em brássicas para testar a especificidade dos *primers*, é possível que os isolados não detectados não sejam de Xcc mas sim de outro patovar. Outra possibilidade seria a incapacidade destes *primers* em detectar todos os isolados de Xcc ou, ainda, a ocorrência de alguma falha na execução das reações.

Quanto às amplificações utilizando os *primers* HrcCR2 e HrcCF2, o número de ciclos pode ter afetado a amplificação. Essa hipótese pode ser levantada porque quando o protocolo proposto por Zaccardelli *et al.*, (2007) foi utilizado, 3 isolados de Xcc não tiveram as bandas correspondentes amplificadas e, quando utilizado o protocolo modificado, apenas o isolado X 03 não foi amplificado. As implicações para o uso dos

*primers* HrcCR2 e HrcCF2 são as mesmas que para XCR e XCF, uma vez que também nesse caso não houve amplificação para o isolado X 03.

A diminuição na concentração dos *primers* Rst9 e Rst10 na reação e o aumento da temperatura de anelamento dos mesmos ao DNA podem resultar na produção apenas do fragmento de 355 pb. Leite *et al.* (1994) não obtiveram amplificação para nenhum patovar de *Xanthomonas campestris* patogênico a brássicas, porém, quando utilizaram a técnica de Southern Blot, houve hibridização para essas bactérias. Embora, neste último caso, os resultados tenham sido satisfatórios, foram menos específicos por terem detectado outras espécies de *Xanthomonas*.

Embora no presente trabalho os resultados obtidos não tenham sido satisfatórios, Leite *et al.* (1994) utilizando os *primers* Rst21 e Rst22, obtiveram ampliações para diversos patovares de *Xanthomonas campestris*, inclusive para *X. c. pv. armoraciae*, Xcc, *X. c. pv. incanae* e *X. c. pv. raphani*, patogênicas a brássicas. É interessante aperfeiçoar a técnica, se isso for possível, pensando na detecção de *Xanthomonas campestris* que causam doenças em brássicas, independente do patovar ou, se possível, sequenciar o produto da amplificação para detectar diferenças significativas entre as sequências de cada patovar.

Além de ser uma técnica sensível, a PCR é também uma técnica rápida e que, portanto, pode ser muito útil na detecção de Xcc em lotes de sementes infectados. Uma vez que foi observada a banda correspondente ao produto da amplificação no gel de eletroforese, considerando ser o *primer* específico capaz de detectar todos os isolados de Xcc, o laudo comprovando a presença de Xcc naquele lote pode ser emitido imediatamente, mas se a banda não for observada, então deve se proceder ao teste de patogenicidade para confirmação de que aquele isolado é realmente de Xcc.

Os *primers* aqui selecionados foram testados para detecção de Xcc, mas não para os outros patovares de *Xanthomonas campestris* capazes de causar doença em brássicas. Portanto, após estudos de variabilidade e epidemiologia desses patovares e também de raças de Xcc no Brasil, bem como testes para confirmar se a especificidade do *primer* se restringe apenas a isolados de Xcc ou se engloba os outros patovares, outros *primers* poderão ser testados ou mesmo desenhados para atender ao objetivo da metodologia de detecção a ser desenvolvida. Outra alternativa interessante seria o uso de 2 ou mais pares de *primers* para compor uma PCR multiplex com a finalidade de detectar Xcc, suas diferentes raças ou os diferentes patovares de *Xanthomonas campestris* patogênicos a brássicas. No presente trabalho, o produto da amplificação com os

*primers* XCR e XCF e o produto da amplificação com os *primers* HrcCR2 e HrcCF2 possuem tamanho muito próximo (535 pb e 519 pb, respectivamente), o que inviabilizaria o uso dos dois pares de *primers* em uma mesma reação para compor uma PCR multiplex. Testar outros *primers* que produzam fragmentos de tamanhos diferentes o suficiente para serem separados no gel poderia resultar na elaboração de uma reação de PCR multiplex para detecção de Xcc e de outros patovares de *Xanthomonas campestris* patogênicos a brássicas.

Todos os *primers* testados neste trabalho foram desenhados a partir da região *hrp* de *Xanthomonas*. Essa região é responsável pela patogenicidade da bactéria a um determinado hospedeiro ou grupo de hospedeiros, o que faz com que *primers* desenvolvidos para amplificação de sequências dentro dessa região sejam específicos ao nível de gênero (Leite *et al.*, 1994), espécie (Berg *et al.*, 2006) e até mesmo ao nível de patovar (Park *et al.*, 2004; Zaccardelli *et al.*, 2007). Embora essa região seja conservada até entre isolados de Xcc, outras regiões do genoma bacteriano podem ser exploradas para confecção de *primers* específicos. A região *estA*, responsável pela lipólise de Tween, foi utilizada por Lee *et al.* (2009) para confecção de *primers* específicos para espécies de *Xanthomonas*.

No Brasil, há poucos estudos acerca da presença e importância de outros patovares de *Xanthomonas campestris* patogênicos a brássicas, além do patovar *campestris*. Também, não se conhece a ocorrência e a distribuição das raças de Xcc no Brasil. Portanto, um estudo da variabilidade de isolados de Xcc, bem como um levantamento da ocorrência de outros patovares de *Xanthomonas campestris* patogênicos a brássicas, no Brasil, faz-se necessário para que uma metodologia bem definida para detecção destas bactérias possa ser desenvolvida.

## 5. Conclusões

Dos 29 isolados recebidos, 24 foram confirmados como pertencentes ao gênero *Xanthomonas* pelos testes de produção de xantomonadinas, utilização de asparagina como única fonte de carbono e análise da sequência da região 16S rDNA.

Uma vez que não foi observado o desenvolvimento de sintomas típicos da reação de hipersensibilidade 24 horas após a inoculação, não é recomendado o uso de plantas de fumo e tomate para realização do teste de indução de HR para *X. campestris* pv. *campestris*.

Devido à variabilidade de isolados de *Xanthomonas* patogênicos a brássicas, não é recomendado o uso de plantas de couve ‘Manteiga’, apenas, para a realização do teste de patogenicidade.

O meio NSCAA permitiu o crescimento dos 24 isolados utilizados neste trabalho, enquanto os meios YTSA-CC, mCS20ABN, Xan-D e BSCAA permitiram o crescimento da maioria dos isolados, podendo esses serem utilizados em combinação para detecção de Xcc. Os meios Tween, SX e FS não se mostraram úteis para serem utilizados para a detecção de isolados de Xcc oriundos do Brasil.

Os *primers* XCR e XCF podem ser utilizados para detecção de Xcc. Os *primers* HrcCR2 e HrcCF2 também podem ser utilizados para tal finalidade se adotado o protocolo modificado proposto no presente trabalho. Os *primers* Rst 9 e Rst 10, bem como os *primers* Rst 21 e Rst 22, não se mostraram eficientes e não devem, portanto, ser utilizados para a detecção isolados de Xcc do Brasil.

## 6. Referências Bibliográficas

Agrios, N. G. **Plant Pathology**. San Diego: Elsevier, 2005. 947p.

Angeles-Ramos, R.; Vidaver, A. K.; Flynn, P. Characterization of epyphitic *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic xanthomonads recovered from symptomless weeds in the Dominican Republic. **Phytopathology**, v.81, p.677-681, 1991.

Assis, S. M. P.; Mariano, R. L. R.; Michereff, S. J.; Silva, G.; Maranhão, E. A. A. Antagonism of yeasts to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in field. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.191-195, 1999.

Berg, T.; Tesoriero, L.; Hailstones, D. L. A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p.624-630, 2006.

Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. v.1 São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1995. 941p.

Bhat, N. A.; Syeed, N. ; Bhat, K. A.; Mir, S. A. Pathogenicity and host range of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* – incitant of black rot of crucifers. **Journal of Phytology**, v.2, n.10, p.1-5, 2010.

Chang, C. J.; Donaldson, R.; Crowley, M.; Pinnow, D. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. **Phytopathology**, v.81, p. 449-452, 1991.

Fargier, E.; Le Saux, M. F.; Manceau, C. A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer attacking pathovars of this species. **Systematic and Applied Microbiology**, v.34, p.156–165, 2011.

Galli, J. A.; Panizzi, R. C.; Sader, R.; Camargo, M. Efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na germinação de sementes de couve-flor e eficiência de meios de

cultura na detecção do patógeno em sementes de repolho. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.171-176, 2001.

Garrity, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2000. 1135p.

Garrity, G. M.; Bell, J. A.; Lilburn, T. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2004. 401p.

Gitaitis, R.; Walcott, R. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v.45, p.371-397, 2007.

Ignatov, A.; Sechler, A.; Schuenzel, E. L.; Agarkova, I.; Oliver, B.; Vidaver, A. K.; Schaad, N. W. Genetic diversity in populations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cruciferous weeds in central coastal California. **Phytopathology**, v.97, p.803-812, 2007.

Janse, J. D.; Rossi, M. P.; Gorkink, R. F. J.; Derks, J. H. J.; Swings, J.; Janssens, D.; Scortichini, M. Bacterial leaf blight of strawberry (*Fragaria (x) ananassa*) caused by a pathovar of *Xanthomonas arboricola*, not similar to *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King. Description of the causal organism as *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (pv. nov., comb. nov.). **Plant Pathology**, v.50, p.653-665, 2001.

Kado, C. J.; Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.

Kamoun, S.; Kamdar, H. V.; Tola, E.; Kado, C. I. Incompatible interactions between crucifers and *Xanthomonas campestris* involve a vascular hypersensitive response: role of the *hrpX* locus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.5, n.1, p.22-33, 1992.

Kawanishi T, Shiraishi T, Okano Y, Sugawara K, Hashimoto M, Maejima, K.; Komatsu, ; Kakizawa, ; Yamaji, ; Hamamoto, ; Oshima, ; Namba, S. New detection systems of bacteria using highly selective media designed by SMART: Selective Medium-design Algorithm Restricted by Two constraints. **PLoS ONE**, v.6, 2011.

Koenraad, H.; Van Bilsen, J. G. P. M.; Roberts, S. J. Comparative test of four semi-selective agar media for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in brassica seeds. **Seed Science and Technology**, v.33, n.1, p.115-125, 2005.

Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. p.115-175. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York, NY: John Wiley and Sons, 1991. 329p.

Lee, Y. A.; Sung, A. N.; Liu, T. F.; Lee, Y. S. Combination of chromogenic differential medium and *estA*-specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.21, p.6831-6838, 2009.

Leite Jr., R. P.; Minsavage, G. V.; Bonas, U.; Stall, R. E. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.4, p.1068-1077, 1994.

Mafia, R. G.; Alfenas, A. C.; Gonçalves, R. C. Detecção, Isolamento e Inoculação de Bactérias Fitopatogênicas. p.139-160. In: Mafia, R. G.; Alfenas, A. C. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2005. 382p.

Malavolta Jr., V. A.; Beriam, L. O. S.; Almeida, I. M. G.; Rodrigues Neto, J.; Robbs, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, spe. suppl., p.9-88, 2008.

**Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 200p.

Massomo, S.M.S.; Mabagala, R.B.; Swai, I.S.; Hockenhull, J.; Mortensen, C.N. Evaluation of varietal resistance in cabbage against the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Tanzania. **Crop Protection**, v.23, p.315-325, 2004.

McGuire, R. G.; Jones, J. B.; Sasser, M. Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. **Plant Disease**, v.70, p.887-891, 1986.

Miguel-Wruck, D. S.; Oliveira, J.R.; Dias, L.A.S. Especificidade de hospedeiro nas interações *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - brássicas. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.129-133, 2010.

Nowbuth, P.; Khittoo, G.; Venkatasamy, S. Phenotypic diversity of *Xanthomonas* strains isolated from onion blight using metabolic fingerprinting. **MAS**, p.375-381, 2005.

Oliveira, J. R. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. Viçosa: UFV, 1995. 98p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1995.

Park, Y. J.; Lee, B. M.; Ho-Hahn, J.; Lee, G. B.; Park, D. S. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species-specific primers based on *hrpF* gene sequences. **Microbiological Research**, v.159, p.419-423, 2004.

Qian, W.; Jia, Y.; Ren, S.; He, Y.; Feng, J.; Lu, L.; Sun, Q.; Ying, G.; Tang, D.; Tang, H.; Wu, W.; Hao, P.; Wang, L.; Jiang, B.; Zeng, S.; Gu, W.; Lu, G.; Rong, L.; Tian, Y.; Yao, Z.; Fu, G.; Chen, B.; Fang, R.; Qiang, B.; Chen, Z.; Zhao, G.; Tang, J.; He, C. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**, v.15, p.757-767, 2005.

Rachid, D.; Ahmed, B. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.7, p.697-702, 2005.

Randhawa, P. S.; Schaad, N. W. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. **Phytopathology**, v.74, p.268-272, 1984.

Roberts, S. J.; Brough, J.; Everett, B.; Redstone, S. Extraction methods for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from brassica seed. **Seed Science and Technology**, v.32, n.2, p.439-453, 2004.

Romeiro, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279p.

Romeiro, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2. ed. atual. e ampl. - Viçosa: Editora UFV, 2005. 417p.

Sankaran, S.; Mishra, A.; Ehsani, R.; Davis, C. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. **Computers and Eletronics in Agriculture**, v.72, p.1-13, 2010.

Schaad, N. W.; White, W. C. A selective medium for soil isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, v.64, p.876-880, 1974.

Schaad, N. W.; Stall, R. E. *Xanthomonas*. p.81-94. In: Schaad, N. W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 2. ed. Saint Paul: APS Press, 1994. 174p.

Schaad, N. W.; Jones, J. B.; Chun, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 3 ed. St. Paul: APS Press, 2001. 385p.

Seabra Jr., S.; Paixão, G. S.; Maringoni, A. C.; Goto, R.; Camara, R. C. Reação de híbridos de brócolis ‘tipo cabeça única’ à podridão negra. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, p.76-77, 2008.

Shenge, K. C.; Mabagal, R. B.; Mortensen, C. N. Identification and characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Tanzania by biolog system and sensitivity to antibiotics. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.1, p.015-022, 2007.

Sousa, C. S.; Haber, L. L.; Santana, D. G.; Arruda, A. S.; Takatsu, A. Método de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pelo sistema radicular para avaliação rápida de resistência do repolho à podridão negra. **Bioscience Journal**, v.19, n.1, p.53-56, 2003.

Starr, M. P.; Stephens, W. L. Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Journal of Bacteriology**, v.87, n.2, p.293-302, 1964.

Tebaldi, N. D.; Panizzi, R. C.; Sader, R. Detecção, Transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.290-293, 2007.

Trébaol, G.; Gardan, L.; Manceau, C.; Tanguy, J; Tirilly, Y.; Boury, S. Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae* sp. nov., a new species that causes bacteria bract spot of artichoke (*Cynara scolymus* L.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.1471-1478, 2000.

Tripathi, L.; Tripathi, J. N.; Tushemereirwe, W. K.; Bandyopadhyay, R. Development of a semi-selective medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* from bananas plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.117 p.177-186, 2007.

Tripathi, L.; Tripathi, J. N. Relative susceptibility of banana cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.20, p. 5343-5350, 2009.

Vandroemme, J.; Baeyen, S.; Van Vaerenbergh, J.; De Vos, P.; Maes, M. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. **Plant Pathology**, v.57, p.438-444, 2008.

Vicente, J. G.; Everett, B.; Roberts, S. J. Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. **Phytopathology**, v.96, p.735-745, 2006.

Villeth, G. R.; Reis Jr., F. B.; Tonietto, A.; Huergo, L.; Souza, E. M.; Pedrosa, F. O.; Franco, O. L.; Mehta, A. Comparative proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the susceptible and the resistant cultivars of *Brassica oleracea*. **FEMS Microbiology Letters**, v.298, p.260-266, 2009.

Wulff, E. G.; Mguni, C. M.; Mortensen, C. N.; Keswani, C. L.; Hockenhull, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p.317-325, 2002.

Zaccardelli, M.; Campanile, F.; Spasiano, A.; Merighi, M. Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/ type III secretion system gene *hrcC*. **European Journal of Plant Pathology**, v.118, p.299-306, 2007.

## 7. APÊNDICE

### COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

---

#### Meio FS

Chang, C. J.; Donaldson, R.; Crowley, M.; Pinnow, D. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds.

**Phytopathology**, v.81, p. 449-452, 1991.

---

Amido solúvel	10g
Extrato de levedura	0,1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,8g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
Verde de metila	1,5 mL
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL
<b>Após autoclavagem:</b>	
Cicloheximida	200 mg (1 mL de solução 200 mg/mL álcool 70%)
D-metionina	3 mg (1 mL de solução 3 mg/mL álcool 50%)
Piridoxina HCl	1 mg (1 mL de solução 1 mg/mL álcool 50%)
Cefalexina	50 mg (1 mL de solução 50 mg/mL álcool 70%)
Gentamicina	0,4 mg (0,4 mL de solução 1 mg/mL água)
Trimetoprima	30 mg (3 mL de solução 10 mg/mL álcool 70%)

---

---

#### Meio SX ágar

Schaad, N. W.; White, W. C. A selective medium for soil isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, v.64, p.876-880, 1974.

---

Amido solúvel	10g
Extrato de carne	1g
Cloreto de amônio	5g
Fosfato dipotássio	2g
Violeta de metila 2B	1 mL de solução 1% em etanol 20%
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL
<b>Após autoclavagem:</b>	
Cicloheximida	2 mL de solução 1%

---

---

### Meio mCS20ABN

Chang, C. J.; Donaldson, R.; Crowley, M.; Pinnow, D. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds.

**Phytopathology**, v.81, p. 449-452, 1991.

---

Peptona de soja	2g
Triptona	2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,59g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,33g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4g
L-glutamina	6g
L-histidina	1g
Dextrose	1g
Amido solúvel	25g
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL
<b>Após autoclavagem:</b>	
Cicloheximida	200 mg (1 mL de solução 200 mg/mL álcool 70%)
Neomicina	40 mg (1 mL de solução 40 mg/mL álcool 20%)
Bacitracina	100 mg (1 mL de solução 100 mg/mL álcool 50%)

---

---

### Meio NSCAA

Schaad, N. W.; Stall, R. E. *Xanthomonas*. p.81-94. In: Schaad, N. W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 2. ed. Saint Paul: APS Press, 1994. 174p

---

Ágar nutriente	23g
Amido solúvel	15g
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL
<b>Após autoclavagem:</b>	
Cicloheximida	5 mL de solução 5% em metanol 10%
Nitrofurantoína	1mL de solução 0,01% em dimetilformamida 50%
Vancomicina	1mL de solução 1ppm

---

---

### Meio BSCAA

Randhawa, P. S.; Schaad, N. W. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv, *campestris* from crucifer seeds. **Phytopathology**, v.74, p.268-272, 1984

---

Amido solúvel	10g
Glicina	0,2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2g
Verde de metila	0,2 mL
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL

#### Após autoclavagem:

Cicloheximida	5mL de solução 5% em metanol 10%
---------------	----------------------------------

---

---

### Meio Xan-D

Lee, Y. A.; Sung, A. N.; Liu, T, F.; Lee, Y. S. Combination of chromogenic differential medium and estA-specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.21, p.6831-6838, 2009

---

Bacto-Soytone	10g
Tween 80	10mL
KBr	10g
Ágar	15g
Água destilada	500 mL

#### Solução Skim Milk:

Skim Milk	10g
Água destilada	500 mL

#### Autoclavar separadamente e misturar, ainda quente, assepticamente:

Azul de bromotimol	1,5mL de solução 1,6% em etanol
Cicloheximida	75 mg/L
Cefalexina	65 mg/L
5-fluorouracil	12 mg/L

---

---

### Meio Tween

Schaad, N. W.; Jones, J. B.; Chun, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 3 ed. St. Paul: APS Press, 2001. 385p.

---

Peptona	10g
Brometo de potássio	10g
Cloreto de cálcio	250mg
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL
<b>Após autoclavagem:</b>	
Tween 80	10 mL
Cefalexina	25mg
5-fluorouracil	6mg
Tobramicina	0,4mg
Cicloheximida	75mg

---

---

### Meio YTSA-CC

Tripathi, L.; Tripathi, J. N.; Tushemereirwe, W. K.; Bandyopadhyay, R. Development of a semi-selective medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* from bananas plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.117 p.177-186, 2007

---

Extrato de levedura	10g
Triptona	10g
Sacarose	10g
Ágar	15g
Água destilada	1000 mL
<b>Após autoclavagem:</b>	
Cefalexina	50 mg/L
Cicloheximida	150 mg/L

---

---

### Meio YDC

Schaad, N. W.; Jones, J. B.; Chun, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 3 ed. St. Paul: APS Press, 2001. 385p.

---

Extrato de levedura	10g
Dextrose	20g
Carbonato de cálcio	20g
Ágar	17g
Água destilada	1000 mL

---

---

### Meio 523

Kado, C. J.; Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970

---

Sacarose	10g
Extrato de levedura	4g
Caseína hidrolisada	8g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2g
Ágar	18g
Água destilada	1000 ml

---

---

### Meio Asparagina

Rachid, D.; Ahmed, B. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.7, p.697-702, 2005.

---

Asparagina	6g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2g
Água destilada	1000 ml

---

---

### Meio Ágar Nutriente

Schaad, N. W.; Jones, J. B.; Chun, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 3 ed. St. Paul: APS Press, 2001. 385p.

---

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Água destilada	1000 mL

---