

MARIA RAQUEL SILVA

**Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
no Brasil**

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
2006

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

T

S586d
2006

Silva, Maria Raquel, 1976-

Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv.
campestris no Brasil / Maria Raquel Silva. – Viçosa :
UFV, 2006.

xi, 67f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: José Rogério de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 50-55.

1. Bactérias fitopatogências.
2. *Xanthomonas campestris* - Genética.
3. *Xanthomonas campestris* - Metabolismo.
4. Ácidos graxos.
5. Eletroforese de campo pulsado.
6. Crucífera - Inoculação.
7. Crucífera - Resistência a doenças e pragas.
8. Podridão-negra - Controle. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 632.32

MARIA RAQUEL SILVA

**Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
no Brasil**

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: 31 de março de 2006.

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Conselheiro)

Dr. Ricardo Magela de Souza

Dra. Raquel Neves de Mello

Profa. Rosângela D'Arc de Lima Oliveira

Prof. José Rogério de Oliveira
(Orientador)

Ao meu bom e amado Deus
Aos melhores pais do mundo, Antônio Rafael e Hildebranda
Ao meu amigo e orientador, José Rogério
A Nação Brasileira, que investiu na minha formação
Ofereço esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Rogério de Oliveira, excelente amigo, pelos ensinamentos, orientação e sugestões, pela confiança e incentivo, pelo apoio e prontidão, e pela paciência, conduta exemplar e convívio agradabilíssimo.

Ao professor Francisco Murilo Zerbini Júnior, pela co-orientação, disponibilidade e pelas valiosas sugestões para o aperfeiçoamento do manuscrito.

Aos doutores Jeffrey B. Jones e Robert E. Stall, da Universidade da Flórida, pela ótima recepção, prontidão e contribuições na execução deste trabalho.

Ao professor Reginaldo da Silva Romeiro, pelos ensinamentos e pela co-orientação.

Aos professores Ricardo Magela de Souza (Universidade Federal de Lavras) e Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, e à Dra. Raquel Neves de Mello (Seminis Inc.), pelas sugestões e discussões bastante proveitosas.

À técnica Maria Sueli de Oliveira Cardoso e à doutoranda Ivanete Tonole da Silva, pela amizade, alegria, apoio e importante participação na execução de alguns experimentos.

Aos prezados Gerald V. Minsavage e Ellen R. Dickstein, da Universidade da Flórida, pelo auxílio fundamental e valiosas contribuições a este trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos valiosos ensinamentos transmitidos, e aos colegas de curso, pela amizade e apoio.

À Universidade Federal de Viçosa e, em especial, ao Departamento de Fitopatologia, pela formação, oportunidades e condições oferecidas para a execução dessa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida e pela oportunidade de participar do Programa de Doutorado no Brasil com Estágio no Exterior (PDEE), o qual muito contribuiu para a minha formação profissional.

Aos amigos Fanny Iriarte, Myrian Rybak, Adriana Castañeda, Mizuri Marutani, Botond Balogh, Aaron Hert, e, de modo especial, à amiga Koon-Hui Wang, pelas contribuições ao trabalho, presença constante, paciência, amizade e agradável convívio durante toda a minha estada em Gainesville.

Aos meus pais, Antônio Rafael e Hildebranda, pelos sacrifícios, estímulo constante, pelo amor que têm me dado desde o início de minha vida e por serem o meu referencial de honestidade e perseverança.

Aos meus queridos José Renato, José Victor e Ana Lúcia, Antônio Rafael e Ulla Milla, pelo carinho, incentivo e alegre presença, sempre.

Ao meu amado Deus, pelas maravilhosas oportunidades que tem me oferecido na vida e por me permitir crescer por meio de tantas experiências.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Maria Raquel Silva, filha de Antônio Rafael da Silva e Hildebranda Lucrécia da Silva, nasceu em 18 de novembro de 1976, na cidade de Uberaba, Minas Gerais.

Em março de 1995, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em janeiro de 2000. Iniciou, a seguir, o Mestrado em Fitopatologia nessa Universidade, concluído em abril de 2002.

Ainda em abril daquele ano, ingressou no Curso de Doutorado do Departamento de Fitopatologia da mesma instituição. Participou do Programa de Doutorado no Brasil com Estágio no Exterior, desenvolvendo parte de seus trabalhos de pesquisa na Universidade da Flórida, em Gainesville (Estados Unidos).

ÍNDICE

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O patógeno e a doença	1
1.2 Variabilidade	3
1.3 Utilização de substratos (Biolog™)	5
1.4 Análise de ácidos graxos (“Fatty Acids Methyl Ester”- FAME)	7
1.5 Eletroforese de Campo Pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis” – PFGE)	8
1.6 Série diferenciadora	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Geral	13
2.1.1 Isolados Bacterianos	13
2.1.2 Isolamento	13
2.1.3 Verificação da fitopatogenicidade	15
2.1.4 Preservação dos isolados bacterianos	15
2.2 Utilização de substratos (Biolog™)	15
2.3 Análise de ácidos graxos	16
2.4 Eletroforese de Campo Pulsado	17
2.5 Inoculação em série diferenciadora	18

3. RESULTADOS	21
3.1 Utilização de substratos (Biolog™)	21
3.2 Análise de ácidos graxos	23
3.3 Eletroforese de Campo Pulsado	27
3.4 Inoculação em série diferenciadora	29
4. DISCUSSÃO	35
4.1 Utilização de substratos (Biolog™)	35
4.2 Análise de ácidos graxos	38
4.3 Eletroforese de campo pulsado	41
4.4 Inoculação em série diferenciadora	42
5. RESUMO E CONCLUSÕES	47
BIBLIOGRAFIA	50
Apêndice A	56
Apêndice B	61
Apêndice C	62

RESUMO

SILVA, Maria Raquel, D.S. Universidade Federal de Viçosa, Março de 2006. **Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Brasil**. Orientador: José Rogério de Oliveira. Conselheiros: Reginaldo da Silva Romeiro e Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Isolados brasileiros e estrangeiros de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, bem como um isolado estrangeiro de *X. campestris* pv. *armoraciae* foram estudados quanto à sua variabilidade fenotípica e genotípica por meio de análises metabólicas (Biolog™), análise de ácidos graxos (FAME), eletroforese de campo pulsado (PFGE) e inoculação em série diferenciadora. Os resultados mostram que a identificação de uma mesma fitobactéria pode variar dependendo da técnica aplicada, pois 58% dos isolados estudados receberam identificação conflitante quando os resultados do Biolog e da análise de ácidos graxos foram comparados. No sistema Biolog, em cujo banco de dados não consta a presença de *X. campestris* pv. *armoraciae*, os isolados foram identificados como *X. campestris* pv. *campestris* (70%), *X. campestris* pv. *raphani* (19%), *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (5,5%) e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (5,5%). Na análise de ácidos graxos, os isolados foram identificados como *X. campestris* pv. *raphani* (46%), *X. campestris* pv. *campestris* (30%), *X. campestris* pv. *armoraciae* (11%), *X. campestris* pv. *zinniae* (11%) e *Stenotrophomonas maltophilia* (2%). Para estas duas técnicas, os resultados tiveram, em geral, maior precisão quanto menor a especificidade do nível de classificação (gênero, espécie e patovar). Portanto, uma ou ambas as técnicas não devem ser utilizadas isoladamente e sim como ferramentas auxiliares para confirmação da identidade de uma fitobactéria e sempre associadas à inoculação em gama de hospedeiros, especialmente quando a identificação for ao nível de patovar. Uma subdivisão nos bancos de dados desses sistemas, por exemplo, para espécie hospedeira de onde o material foi isolado, poderia reduzir as chances de uma identificação equivocada. Como os patovares *campestris*, *raphani* e *armoraciae* são capazes de infectar brássicas, recomenda-se também que seja feito um estudo abrangente envolvendo plantas da família *Brassicaceae* e os patovares de *X. campestris* capazes de infectá-las, visando estabelecer uma classificação mais consistente. Quando submetidos ao sistema Biolog, todos os isolados

utilizaram 14 fontes de carbono. A asparagina não foi utilizada por nenhum isolado e a sacarose não foi utilizada por alguns. Seis grupos foram formados por meio da análise de ácidos graxos. A variabilidade genética dos isolados foi observada na eletroforese de campo pulsado pela formação de 11 (enzima *Xba*I) e 12 (enzima *Spe*I) padrões diferentes de bandas nos géis, para isolados brasileiros, e sete padrões para isolados estrangeiros, independente da enzima de restrição utilizada. Foi possível fazer associação entre alguns grupos formados pela análise de ácidos graxos e perfis observados na eletroforese de campo pulsado. Nos experimentos em casa-de-vegetação, o grande número de plantas resultou em espaçamento insuficiente, o que, provavelmente, contribuiu para uma mistura de isolados, gerando inconsistência nos resultados. Mesmo assim, verificou-se que houve variação de virulência entre os isolados inoculados nas plantas da série diferenciadora e sintomas atípicos, como queima de folhas, foram observados. Estes podem, futuramente, servir de indício para a classificação de um novo patovar de *X. campestris*. Seria interessante o desenvolvimento de uma série diferenciadora somente com plantas de *Brassica oleracea*. Resposta semelhante à reação de hipersensibilidade vascular foi observada em alguns casos e deve ser melhor estudada visando a sua aplicação na epidemiologia da podridão negra e nos processos de melhoramento para resistência à *X. campestris* pv. *campestris*.

ABSTRACT

SILVA, Maria Raquel, D.S. Universidade Federal de Viçosa, March 2006. **Genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brazil.** Advisor: José Rogério de Oliveira. Committee Members: Reginaldo da Silva Romeiro and Francisco Murilo Zerbini Júnior.

Brazilian and foreign isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), as well as a foreign strain of *X. campestris* pv. *armoraciae* were studied regarding their phenotypic and genotypic variability by metabolic analysis (BiologTM), fatty acids methyl ester (FAME), pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and inoculation in differential series. Results showed that identification of a same strain may vary depending on which system is used as 58% of all strains tested were identified differently by comparing Biolog and FAME results. *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* is not present in Biolog database and the isolates were identified as *X. campestris* pv. *campestris* (70%), *X. campestris* pv. *raphani* (19%), *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (5,5%) and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (5,5%). FAME identified the isolates as *X. campestris* pv. *raphani* (46%), *X. campestris* pv. *campestris* (30%), *X. campestris* pv. *armoraciae* (11%), *X. campestris* pv. *zinniae* (11%) and *Stenotrophomonas maltophilia* (2%). Both techniques delivered preciser results when identification of a less specificity level was required (from gender to patovar). One or both tecuinies can be used as auxiliary systems to identify plant pathogenic bacteria, but should be combined with host range tests, specially if the identification is being made to patovar level. In order to reduce erros, the systems' databases could be divided, e.g. according to host. As patovars *campestris*, *raphani* and *armoraciae* are able to infect brassica plants, a broad study of brassica plants and corresponding *X. campestris* patovars should be made in order to stablish a more consistent classification. All strains used 14 carbon sources in Biolog. Asparagine was not used by any strain while sacarose was not used by some. Strain made six different groups by FAME. Genetic variability of brazilian strains was observed in PFGE with 11 different band patterns formed when restriction enzyme *Xba*I was used and 12 band patterns when *Spe*I was used. Foreign strains formed seven band patterns no matter which enzyme was used. A comparative association was made between some of FAME and PFGE groups. Insuficient space on the banchs due to an

exceedingly number of plants, which may have cause cross contamination, was probably one of the causes of inconsistent results from greenhouse experiments. Despite that, it was observed virulence variation among the strains when inoculated in plants from the differential series and atypical symptoms were observed, e.g. blight, which could be an evidence of a different *X. campestris* patovar. A differential series made only with *Brassica oleracea* species would be interesting. It was also observed a reaction similar to Vascular Hypersensitive Response, which might be an interesting subject to epidemiology of black rot and breeding for resistance to *Xcc*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O patógeno e a doença

A podridão negra é considerada a principal doença de etiologia bacteriana no cultivo das brássicas, não somente em função dos prejuízos causados mas também devido a sua ampla distribuição nas áreas de plantio (Carrijo & Rêgo, 2000). Ela é causada pela fitobactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson e está presente em muitos países do mundo, inclusive no Brasil. O patógeno ataca diversas espécies e variedades de brássicas e sobrevive bem em sementes, o que facilita a sua disseminação e introdução em áreas livres.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Xcc) é uma bactéria gram-negativa, tem a forma de um bastonete reto, medindo cerca de 0,4-0,7 x 0,7-1,6 µm, e possui um único flagelo polar. É aeróbia estrita, apresenta crescimento liso, circular e mucóide em meio de cultura, além de ser incapaz de formar endosporos. Produz pigmentos amarelos característicos do gênero, as xantomonadinas. É também grande produtora de um polissacarídeo denominado goma xantana que lhe confere proteção contra intempéries do ambiente e, por suas excelentes propriedades plásticas, é muito utilizado pelas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e petrolífera.

O patógeno tem crescimento ótimo entre 28-30°C, embora a faixa de temperatura em seu espectro de ação seja ampla (5-36°C) (Carrijo & Rêgo, 2000). Sob condições ideais, o surgimento dos sintomas da podridão negra ocorre de 10 a 14 dias após a penetração do patógeno (Williams, 1980). O sintoma característico da doença é a presença de lesões em forma de “V” (Foto 1 – Apêndice A), com o vértice voltado para o centro da folha (Cook *et al.*, 1952). Isso acontece porque a principal porta de entrada do patógeno em plantas provenientes de sementes sadias são os hidatódios, aberturas nas margens da folha que desempenham importante papel na gutação, um dos processos por meio dos quais ocorre eliminação de água pela planta. À medida que o patógeno coloniza os tecidos da folha, a lesão vai sendo formada e é delimitada pelas nervuras, adquirindo daí o formato típico.

Como *X. campestris* pv. *campestris* é uma bactéria sistêmica, ou seja, consegue se estabelecer nos feixes vasculares, um outro sintoma muito comum é o escurecimento de nervuras, desde os microvasos do limbo foliar até o pecíolo, podendo em seguida, atingir o caule e comprometer toda a planta. Esta, na tentativa de conter a infecção sistêmica, acumula fibras no seu interior que terminam por causar entupimento dos vasos, levando à deficiência de água, murcha e necrose dos tecidos foliares ao redor das nervuras infectadas (Bretschneider *et al.*, 1989, Wallis *et al.*, 1973, citados por Ignatov *et al.*, 1999). Com a progressão da doença, pode haver queda prematura das folhas (Maringoni, 1997). Por influir diretamente no aspecto da planta, a podridão negra das brássicas é especialmente importante nos cultivos de repolho, couve-de-folha e mostarda, pois deprecia o produto comercial (Carrijo & Rêgo, 2000; Galli *et al.*, 2001).

A penetração através dos estômatos é bastante limitada, uma vez que se faz necessário um filme contínuo de água para que o processo seja completado com êxito, o que, nesse caso,

praticamente não ocorre devido à alta cerosidade das folhas das brássicas (Cook *et al.*, 1952). Porém, quando o filme de água está presente ou quando a bactéria penetra por meio de ferimentos, muitas vezes provocado pela traça-das-crucíferas, a lesão que se forma é arredondada (Lopes & Quezado-Soares, 1997). Sintomas atípicos incluem também lesões amareladas ou marrons sem o formato de “V” e ausência de escurecimento de nervuras (Schaad, 1976, citado por Schultz & Gabrielson, 1986).

A disseminação do patógeno no campo de cultivo e em áreas de produção de mudas pode ocorrer a partir da água de irrigação, das chuvas, da utilização de ferramentas e maquinário contaminado, bem como por meio de tratamentos culturais e insetos (Sharma, 1980; Williams, 1980; Lopes & Quezado-Soares, 1997; Carrijo & Rêgo, 2000). A manutenção do inóculo no campo se dá principalmente por meio da sobrevivência do patógeno em brássicas silvestres, como *Lepidium virginicum* L. (mastruço) e *Raphanus raphanistrum* L. (rabanete-de-cavalo), e pela presença de plantas voluntárias (Maude, 1996), ou seja, plantas geralmente remanescentes do ciclo anterior, resultantes de propagação natural e que são hospedeiras do patógeno. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pode sobreviver em restos de cultura contaminados e não degradados por um tempo que varia de alguns meses até dois anos, dependendo das condições do clima (Strandberg, 1977, citado por Williams, 1980; Sharma, 1980). Por essa razão, tanto a eliminação dos restos culturais quanto a rotação de cultura são práticas recomendadas (Klisiewicz & Pound, 1961).

Alguns fatores como a presença do fungo *Peronospora parasitica* (Pearson) Fries, agente etiológico do míldio, e a queda natural das folhas na fase de maturação das sementes podem mascarar a presença de *X. campestris* pv. *campestris* e prejudicar o diagnóstico da podridão negra no campo (Williams, 1980; Schaad, 1982; Carrijo & Rêgo, 2000). Além disso, sob baixas temperaturas, a bactéria pode permanecer como população endofítica (interior da planta) por vários meses, tornando mais complicada a sua diagnose no campo uma vez que a planta não apresenta sintomas (Dane & Shaw, 1996).

Quando não destrói rapidamente toda a planta e devido à sua ação sistêmica, *X. campestris* pv. *campestris* consegue chegar até as partes florais e, pelo xilema do pedicelo, atingir a sutura das vagens alcançando o funículo, podendo permanecer por pelo menos 3 anos no interior das sementes; ocasionalmente, a bactéria atinge também o seu tegumento (parte externa) (Klisiewicz & Pound, 1961; Maude, 1996; Cook *et al.*, 1952). Dessa forma, sementes contaminadas se tornam importante fonte de inóculo primário e veículo de disseminação do patógeno a longas distâncias (Lopes & Quezado-Soares, 1997; Galli *et al.*, 2001; Ciafardini *et al.*, 2003). Em experimentos de campo, a incidência de doença foi alta em parcelas com, inicialmente, 0,03% ou mais de plantas infectadas, e baixa com 0,01% de plantas doentes (Schaad *et al.*, 1980b).

A infecção pode fazer com que as sementes se tornem menores e mais leves (Sharma, 1980), além de provocar escurecimento dos bordos dos cotilédones (Rodrigues Neto & Malavolta Jr., 1995). Considera-se que o local ideal para a produção de sementes de brássicas seja uma região sem histórico de podridão negra, onde ocorra o frio necessário para a vernalização (iniciação floral induzida por baixas temperaturas) e que não apresente muitas chuvas durante o

verão, na tentativa de evitar a disseminação de algum possível inóculo no campo, mas que também tenha boa umidade no solo.

Alguns dos métodos disponíveis para a detecção de *X. campestris* pv. *campestris* em sementes de brássicas incluem os testes de crescimento em casa-de-vegetação, utilização de meios semi-seletivos, sorologia e PCR (Schaad, 1982; Schaad, 1983; Randhawa & Schaad, 1984; Chang *et al.*, 1991; Alvarez & Lou, 1985; Berg *et al.*, 2005).

O tratamento de sementes infectadas pode ser feito por meio da imersão em água quente, uso de ar aquecido, aplicação de antibióticos, utilização de hipoclorito de sódio, radiação gamma, luz ultravioleta entre outros (Sharma, 1980; Shiomi, 1992; Klisiewicz & Pound, 1961; Schaad *et al.*, 1980a; Schultz *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 2001).

O controle da doença deve ser iniciado com a prevenção, utilizando-se sementes saudáveis ou, no mínimo, tratadas. Como *X. campestris* pv. *campestris* produz uma grande quantidade de inóculo e a disseminação do patógeno pode ser feita por meio de pragas, o controle destas é importante, bem como o de plantas daninhas hospedeiras. Outras medidas preventivas incluem o uso adequado da irrigação, a desinfecção do maquinário utilizado e o cuidado nos tratamentos culturais.

1.2 Variabilidade

“Um dos aspectos mais dinâmicos e significativos da biologia é que as características dos indivíduos dentro de uma espécie não são fixas, ou seja, não são idênticas e sim variáveis de um indivíduo para o outro” (Agrios, 2005). Os microrganismos têm que se adaptar a uma série de variações ambientais como mudanças na nutrição, pH, temperatura e relação com o oxigênio para conseguir sobreviver. A habilidade de se adaptar a variáveis ambientais, tanto separadamente quanto em conjunto, é função da diversidade genética, mas é refletida fisiologicamente (Caldwell, 2000).

Variações genotípicas ocorrem em razão da transferência de material genético de um indivíduo para outro por diferentes processos (Romeiro, 1995). Os principais mecanismos geradores de variabilidade em bactérias incluem os processos de mutação somática, conjugação, transformação, transdução e herança extracromossômica (plasmídios) (Azevedo, 2000). A alta plasticidade genética e o grau de dependência em relação aos fatores ambientais fazem com que fitopatógenos estejam mais sujeitos a variações genotípicas e fenotípicas do que os vegetais superiores (Costa *et al.*, 2001).

Isso leva ao surgimento de populações com diversos níveis de variabilidade. Um determinado conjunto de isolados de uma fitobactéria pode ser classificado em diferentes grupos dependendo do critério adotado como, por exemplo, patovar (diversidade patogênica), biovar (características bioquímicas), serovar (variabilidade sorológica) e genomovar (variabilidade genômica). O conhecimento da variabilidade de um fitopatógeno auxilia no entendimento da evolução da espécie, na formação de novas espécies e raças e é importante quando se trata do desenvolvimento de métodos eficientes e rápidos de diagnose, detecção em sementes, escolha

das estratégias de controle (Costa *et al.*, 2001) e tem “relevância em trabalhos de melhoramento visando resistência, criação de novas variedades etc” (Romeiro, 1988).

Devido à grande diversidade dentro do gênero *Xanthomonas*, em 1995 foi feita uma proposta de reclassificação deste com base nos resultados obtidos a partir da hibridização DNA/DNA, bem como de análises nutricionais e da composição de ácidos graxos (Vauterin *et al.*, 1995). De todas as espécies e patovares estudados, Vauterin *et al.* (1995) sugeriram que apenas os patovares que infectam brássicas (pvs. *aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *campestris*, *incanae* e *raphani*) fossem mantidos como pertencentes à espécie *Xanthomonas campestris*. Esses patovares são reconhecidos pela Sociedade Internacional de Patologia de Plantas (“International Society for Plant Pathology” – ISPP) e sua nomenclatura oficial, juntamente com os códigos dos isolados tipos de cada um deles, pode ser consultada via internet (ISPP, 2006).

Embora publicada em periódico oficial, a reclassificação do gênero *Xanthomonas* feita por Vauterin *et al.* (1995) tem sido questionada por alguns bacteriologistas de plantas que não concordam com os critérios adotados para tal procedimento (Schaad *et al.*, 2000). Posteriormente, Vicente *et al.* (2001) classificaram o patótipo NCPPB 1946 (NCPPB – “National Collection of Plant Pathogenic Bacteria”, Reino Unido) de *X. campestris* pv. *raphani*, causadora de mancha foliar, bem como o isolado tipo de *X. campestris* pv. *aberrans* como raça patogênica 5 de *X. campestris* pv. *campestris*.

Mesmo sendo um patógeno muito estudado em outros países, informações acerca da variabilidade dos isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *campestris* são escassas (Wruck, 2001). Diante disso, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- i) estudar a variabilidade de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* por meio de sua “impressão digital metabólica” (BiologTM) e análise de ácidos graxos (FAME), comparando-se os resultados de identificação mais provável da bactéria fornecidos por ambos e avaliando a sua precisão;
- ii) estudar a variabilidade no DNA dessa fitobactéria por meio da eletroforese de campo pulsado (PFGE), uma vez que não há registros de isolados brasileiros submetidos a essa técnica, e verificar se há relação entre os testes acima mencionados e os resultados da eletroforese, bem como se há correspondência com a origem geográfica dos isolados;
- iii) estudar o comportamento desses mesmos isolados quando em contato com brássicas de série diferenciadora, na procura por padrões que possam ser relacionados entre si e com a origem geográfica.

Embora o enfoque desse trabalho tenha sido sobre os isolados brasileiros, alguns isolados estrangeiros também foram estudados. As análises metabólicas (BiologTM), de ácidos graxos e a eletroforese de campo pulsado foram conduzidas na Universidade da Flórida em Gainesville (Flórida, Estados Unidos), no Laboratório de Bacteriologia do Dr. Jeffrey B. Jones. Os experimentos de inoculação em série diferenciadora foram conduzidos na Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais).

1.3 Utilização de substratos (Biolog™)

O Biolog™ foi desenvolvido com o objetivo de identificar e caracterizar microrganismos de acordo com o seu metabolismo, com base na utilização ou não de diversos substratos (Holmes *et al.*, 1994; Biolog GN2 MicroPlate™, 2001). O sistema consiste de uma microplaca com 96 cavidades e, em cada uma destas, está presente uma fonte de carbono e o indicador colorimétrico tetrazólio violeta (Miller & Rhoden, 1991; Holmes *et al.*, 1994). Uma das cavidades é marcada como controle negativo e, nas outras 95, estão representados todos os grupos bioquímicos importantes como açúcares, ácidos carboxílicos, aminoácidos, ácidos graxos e álcoois (Biolog RetroSpect™, 2005). Inicialmente, os substratos apresentam-se incolores, mas quando um deles é oxidado, há um aumento da respiração do microrganismo, o que produz troca de elétrons, levando à redução do tetrazólio e formando uma coloração púrpura no local (Miller & Rhoden, 1991). Ao final do tempo de incubação, tem-se a chamada “impressão digital metabólica” do organismo em questão. Em algumas situações, pode ocorrer dúvida na interpretação do resultado em uma ou mais cavidades e este é então classificado como indefinido (Biolog RetroSpect™, 2005). Nestes casos, uma repetição do teste deve ser feita, com nova microplaca (Holmes *et al.*, 1994). Caso o resultado seja o mesmo do anterior, fica mantido o caráter indefinido (representado, na folha de resultados, pela letra “b” de “borderline”) para tal cavidade.

A leitura das microplacas pode ser feita visualmente ou de maneira automatizada. Em um estudo conduzido por Holmes *et al.* (1994), a leitura visual apresentou desempenho superior ao da leitura automatizada, uma vez que todos os isolados de 10 espécies bacterianas (previamente identificados por outros processos) foram corretamente classificados na avaliação visual, enquanto que esse número caiu para 7 espécies com a leitura automatizada. Naquela época, os resultados considerados intermediários (coloração pouco expressiva) só podiam ser lidos “manualmente”, ou seja, não estavam programados no sistema automatizado, o que certamente contribuiu para os melhores resultados do primeiro sistema. Atualmente, o sistema automatizado reconhece esses resultados intermediários. O processamento por computador se faz necessário, principalmente quando se trata de análises de rotina em laboratórios (Holmes *et al.*, 1994). As informações obtidas são, então, comparadas com uma base de dados composta por mais de mil e novecentas espécies de bactérias aeróbias, anaeróbias, leveduras e fungos filamentosos, a partir da qual os resultados mais prováveis para cada amostra são fornecidos (Biolog RetroSpect™, 2005).

Testes bioquímicos tradicionais, embora sejam mais trabalhosos de serem preparados e demandem mais tempo que o sistema Biolog para serem concluídos, uma vez que se baseiam na visualização do crescimento bacteriano, são empregados na identificação de gêneros e na caracterização de isolados bacterianos (Schaad *et al.*, 2001; Wruck, 2001). Uma de suas vantagens reside no fato de que a sua execução independe da aquisição dos produtos da Biolog Inc., empresa que detém a patente do sistema Biolog e, por isso mesmo, não fornece todas as informações sobre seus produtos como, por exemplo, a composição do meio de cultura específico BUG utilizado para o cultivo das bactérias, mas somente a quantidade necessária para o preparo (57 g BUG, 1000 mL de água destilada).

Wruck (2001), utilizando metodologia tradicional, caracterizou 33 isolados bacterianos por meio de diversas provas bioquímicas, como a produção de ácidos a partir de arabinose, frutose, galactose, glicose, manose, sacarose e trealose, utilização de asparagina como fonte de carbono entre outras. Seus resultados permitiram confirmar que os isolados testados pertenciam à espécie *X. campestris* e, com base na gama de hospedeiros, ao patovar *campestris*, comprovando a eficácia dos testes bioquímicos tradicionais no processo de identificação de fitobactérias.

Uma das vantagens do Biolog é que ele pode ser personalizado em determinados casos (Klinger *et al.*, 1992; Verniere *et al.*, 1993). Esse sistema tem sido otimizado para a identificação de bactérias de diversos grupos, sejam elas Gram-negativas ou Gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias, bem como para fungos filamentosos e leveduras (Biolog RetroSpect™, 2005). Espécies de importância clínica dos gêneros *Pseudomonas*, *Chryseomonas* e *Comamonas* foram identificadas por meio dessa técnica (Holmes *et al.*, 1994). Quarenta e cinco isolados Gram-negativos provenientes de um protótipo do sistema de reciclagem de água, proposto para ser utilizado na estação espacial "Freedom", dos Estados Unidos, foram submetidos ao Biolog e 93% puderam ser identificadas ao final do teste (Klinger *et al.*, 1992).

Juntamente com outras técnicas como, por exemplo, a análise de ácidos graxos, o sistema Biolog foi utilizado na reclassificação de espécies do gênero *Xanthomonas* (Vauterin *et al.*, 1995). Ambos os tests foram também escolhidos para caracterizar bactérias endolíticas (ou seja, que vivem no interior de rochas) e de águas subterrâneas, coletadas em minas usadas para testes nucleares (Amy *et al.*, 1992). É interessante conhecer tais bactérias capazes de sobreviver por extensos períodos de tempo com pouca ou na completa ausência de água e nutrientes e, nesse sentido, a utilização de substratos auxilia na sua caracterização. As bactérias endolíticas raramente foram identificadas (Amy *et al.*, 1992), o que é previsível já que as informações para comparação com tais microrganismos ainda sejam escassas nos bancos de dados. Por outro lado, aquelas de águas subterrâneas foram mais facilmente identificadas ou, pelo menos, o foram com um nível de confiança maior, sendo que indivíduos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram os mais comumente encontrados (Amy *et al.*, 1992).

No solo de mangue do Canal de Bertioga (Santos, SP), populações de bactérias dos domínios *Bacteria* e *Archaea* foram submetidas ao Biolog ECO (Biolog Inc., Hayward, Califórnia), uma versão desse sistema de microplacas com 31 fontes de carbono similares às normalmente encontradas nos solos (Cury, 2002). Em 1983, a região em estudo foi afetada por um derramamento de petróleo e as informações geradas por esse teste foram úteis na avaliação do impacto causado pela ação do ser humano e para o monitoramento da microbiota do solo, contribuindo para o melhor entendimento e preservação desses ecossistemas peculiares (Cury, 2002).

O Biolog foi considerado útil não só na diferenciação entre isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *X. axonopodis* pv. *citrumelo*, como também entre os grupos A (cancro asiático), B (cancrose sul americana) e C (Key/Mexican Lime) de *X. axonopodis* pv. *citri* (Verniere *et al.*, 1993). Em outro estudo, essa técnica não foi capaz de diferenciar os isolados Xac-A e Xac-

A^w de cancro cítrico, embora tenha conseguido separá-los dos isolados de *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (Sun *et al.*, 2004).

Embora tenha utilidade no estudo da variabilidade de bactérias, o Biolog apresenta limitações. Atualmente, e considerando-se o trabalho de diversos laboratórios do mundo, estima-se que as mais de 6000 espécies de bactérias identificadas até o momento correspondam a apenas 1% do total de espécies bacterianas existentes no planeta. Além disso, deve-se considerar também a variabilidade existente em níveis infraespecíficos. Já o banco de dados do sistema Biolog é composto por cerca de 2000 espécies, o que provoca o surgimento de lacunas e pode levar a identificações imprecisas. Mesmo assim, devido ao amplo número de caracteres sobre os quais fornece informações, o sistema Biolog pode ser considerado uma ferramenta auxiliar no estudo de microrganismos (Holmes *et al.*, 1994).

1.4 Análise de ácidos graxos (“Fatty Acids Methyl Ester”- FAME)

Os ácidos graxos são componentes do lipídio celular, sendo que a maior parte das moléculas desta natureza localizadas na membrana celular, como os glicolipídios, os fosfolipídios e também os ácidos graxos constituintes dos lipopolissacarídeos, possui cadeia carbônica variando de 9 a 12 átomos (Welch, 1991). Segundo Stanger & Davis (1992), devido ao grande número de ácidos graxos encontrados na parede e nas membranas celulares e também pelo fato dessas moléculas serem um traço genético estável e altamente conservado dentro de um grupo taxonômico, a composição de ácidos graxos pode ser utilizada com sucesso na identificação de bactérias. Para Dickstein *et al.* (2001), essa identificação pode ser específica ou até infraespecífica.

Na prática, as células bacterianas são tratadas para a liberação de seus ácidos graxos, os quais são convertidos para uma forma derivada de metil éster com o objetivo de torná-los voláteis para serem utilizados no cromatógrafo gasoso (Welch, 1991). A amostra é injetada numa coluna desse aparelho onde há um fluxo específico de hidrogênio, fazendo com que os ácidos graxos sejam separados pela diferença dos tempos de retenção sob aumento de temperatura, iniciando com 170°C e chegando, gradualmente, a 270°C. Quando atingem o final da coluna, um detector grava os picos e a área sob cada pico reflete a quantidade relativa de ácidos graxos. O tempo de retenção de uma mistura conhecida de ácidos graxos é utilizada como padrão para calcular o comprimento da cadeia (Welch, 1991).

O sinal eletrônico do detector do cromatógrafo gasoso é transferido para o computador onde é realizada a integração dos picos. Os dados são, então, armazenados no disco rígido e a composição de ácidos graxos da amostra é comparada a uma base de dados utilizando-se o programa de reconhecimento “Microbial Identification System” (MIDI). As denominadas “bibliotecas Sherlock”, usadas para a comparação dos resultados e identificação, consistem de mais de 100 mil análises de isolados, obtidos de coleções confiáveis de várias partes do mundo para evitar agrupamentos geográficos. Nessa técnica, existem diferentes métodos de cultivo para bactérias

aeróbias, anaeróbias e leveduras e para cada um deles há uma “biblioteca” correspondente usada na identificação final do organismo (Sasser, 2001).

Barak & Gilbertson (2003) usaram como referência da acurácia desse método um índice de similaridade médio de 95% encontrado em três análises da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*. Bactérias endolíticas também foram submetidas por Amy *et al.* (1992) à análise de ácidos graxos para sua caracterização e 23% dos isolados resultaram em alguma identificação, fornecendo um resultado melhor do que o alcançado com o sistema Biolog. Dessa forma, principalmente quando utilizado em conjunto com outras técnicas, a análise de ácidos graxos pode ser considerada uma ferramenta útil no estudo da variabilidade e identificação de bactérias.

1.5 Eletroforese de Campo Pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis” – PFGE)

“Métodos baseados no estudo do DNA geralmente permitem a detecção de diversidade intraespecífica, como a subdivisão dentro de espécies em um número de tipos distintos. Eles são um suporte adicional às análises fenotípicas, tentando revelar a diversidade de organismos muito relacionados” (Rosselló-Mora & Amann, 2001). Rápidos progressos são alcançados na biologia molecular quando se consegue separar, medir e visualizar moléculas de DNA (Basim & Basim, 2001).

O estudo da diversidade genética de membros do gênero *Xanthomonas* pode ser feito por meio de várias abordagens (Barak & Gilbertson, 2003). Análises do polimorfismo no DNA, feitas utilizando-se padrões do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphism” – RFLP), e da variabilidade na agressividade foram usados para avaliar a estrutura da população de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* na Colômbia e na Venezuela e, em ambos os casos, houve alto grau de diversidade entre isolados (Restrepo & Verdier, 1997; Verdier *et al.*, 1998). Isolados de *X. axonopodis* pv. *manihotis* provenientes de regiões com características edafoclimáticas (ECZ) distintas foram avaliados por meio da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (“Amplified Fragment Length Polymorphism” – AFLP) e os resultados foram consistentes com aqueles obtidos a partir de RFLP, sendo que algumas combinações de primer do AFLP diferenciaram isolados que não se apresentaram distintos no RFLP (Restrepo *et al.*, 1999). A mesma fitobactéria foi estudada quanto à sua diversidade genética por meio de três técnicas moleculares: reação em cadeia da polimerase com sequências repetitivas extragênicas palindrômicas (“Repetitive Extragenic Palindromic-Polymerase Chain Reaction” – rep-PCR), RFLP e AFLP, que foram eficientes em detectar variabilidade genética entre os isolados de diferentes ECZ, de campos de cultivo dentro de uma mesma ECZ e em campos com plantio de diversos genótipos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (Restrepo *et al.*, 2000).

A diversidade genética também foi analisada entre isolados de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* nas Filipinas (Raymundo *et al.*, 1999). Os padrões de RFLP e as análises de restrição foram suficientes para mostrar alta diversidade genética na coleção inteira de isolados, bem como dentro daqueles definidos de maneira espacial e temporal. Isolados de *X. oryzae* pv. *oryzae*

provenientes do Sri Lanka foram avaliados quanto à sua diversidade genética observada por meio de RFLP, o que revelou uma composição de cinco grupos filogenéticos distintos, estando cada agrupamento parcialmente relacionado a condições climáticas (Ochiai *et al.*, 2000). Quanto à sua variabilidade patogênica, utilizando 12 cultivares, cada um com um gene de resistência, foram identificados 14 patótipos (Ochiai *et al.*, 2000). Tanto rep-PCR quanto RFLP foram capazes de detectar o mesmo nível de diversidade haplotípica em isolados de *X. oryzae* pv. *oryzae* presentes em campos de produção de arroz (Cruz *et al.*, 1996).

Isolados de *X. albilineans* pertencentes a dois grupos sorológicos também puderam ser diferenciados por hibridização subtrativa do DNA e RFLP (Jaufeerally-Fakim *et al.*, 2000). Bragard *et al.* (1997) se utilizaram de resultados de testes de patogenicidade e de análises por AFLP, análise de ácidos graxos (FAME) e eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio ("Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis" – SDS-PAGE) para separar isolados de *X. translucens* em três tipos quanto à patogenicidade e os agrupamentos obtidos com o AFLP e com a análise de ácidos graxos (em menor extensão) foram consistentes com estes grupos de patogenicidade (Bragard *et al.*, 1997).

Dentro da espécie *Xanthomonas campestris*, a variabilidade observada entre seus mais de 140 patovares possibilitou a reclassificação de muitos deles como novas espécies (Vauterin *et al.*, 1995). Apenas patovares que infectam brássicas, patovares *aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *campestris*, *incanae* e *raphani*, permaneceram como pertencentes à espécie *Xanthomonas campestris*. Isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram classificados em três grupos genéticos (C1, C2 e C3) a partir de padrões de RFLP. Os isolados pertencentes aos grupos C1 e C2 causaram sintomas típicos de podridão negra quando inoculados em hospedeiro suscetível, enquanto que plantas inoculadas com os isolados pertencentes ao grupo C3 apresentaram o sintoma atípico de queima (Alvarez *et al.*, 1994). A reação em cadeia da polimerase com sequências intergênicas repetitivas consenso enterobacterianas ("Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction" – ERIC-PCR), aplicado a 25 isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *campestris*, possibilitou a visualização de variabilidade genética entre eles (Tebaldi *et al.*, 2002).

Já os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*, reclassificada como *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (Vauterin *et al.*, 1995), agente causal da queima bacteriana, mancha foliar e podridão do caule de gerânios, e *Xanthomonas campestris* pv. *hederae*, reclassificada como *Xanthomonas hortorum* pv. *hederae* (Vauterin *et al.*, 1995), agente causal da mancha foliar em hera, não apresentaram variabilidade quando avaliados por meio de ERIC-PCR (Sulzinski, 2001). Entretanto, essa variabilidade mostrou-se presente quando foi utilizado o rep-PCR e o par de primers XcpM1/XcpM2, o que gerou dúvidas se esses patógenos podem ser seguramente classificados como patovares da mesma espécie proposta *Xanthomonas hortorum*. O par de primers XcpM1/XcpM2, considerado específico para *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, também possibilitou a produção das bandas características em isolados de *X. campestris* pv. *vitians*, reclassificada como *Xanthomonas hortorum* pv. *vitians* (Vauterin *et al.*, 1995), agente causal da mancha foliar bacteriana da alface, o que indica que estes dois últimos

patovares de *Xanthomonas hortorum* podem estar altamente relacionados (Sulzinski, 2001). Em um estudo com 44 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, foi possível visualizar a formação de dois grupos (A e B) por rep-PCR (Sahin *et al.*, 2003a).

Em estudos realizados com isolados de *X. hortorum* pv. *vitians* (= *X. campestris* pv. *vitians*) provenientes de diferentes regiões geográficas, utilizando-se cinco métodos para a verificação da existência de diversidade genética (FAME, rep-PCR, análise da região ITS1 do rRNA, RFLP e DNA plasmidial), observou-se que os isolados não eram clonais, mas pertenciam a um grupo relativamente homogêneo, o que pode indicar a ocorrência de menor variabilidade genética em patovares com gama de hospedeiro mais restrita (Barak & Gilbertson, 2003). Os métodos rep-PCR e análise da região ITS1 do rRNA não detectaram diversidade entre os isolados de *X. hortorum* pv. *vitians*, mas foram eficientes em diferenciá-los de outros patovares de *Xanthomonas campestris* (Barak & Gilbertson, 2003).

A eletroforese é uma técnica simples e versátil que permite a separação de proteínas e ácidos nucléicos. Na eletroforese convencional de moléculas de DNA, este é colocado numa matriz sólida (gel) e induzido a migrar através dela sob o efeito de um campo elétrico estático. Porém, quando as moléculas são maiores do que 50 kb, os fragmentos não são bem separados, a não ser que se utilize uma baixa concentração de agarose, tornando o gel muito frágil (Basim & Basim, 2001).

Na eletroforese de campo pulsado (PFGE), o DNA é submetido a dois campos elétricos em ângulos diferentes pelo tempo de pulso programado (por exemplo, a cada 4 segundos). Cada vez que o campo é mudado, moléculas maiores levam mais tempo para alterar a sua direção e, conseqüentemente, migram mais devagar do que moléculas menores. O tempo de pulso é selecionado para fazer com que as moléculas de DNA fragmentado passem a maior parte da duração desse pulso se reorientando, ao invés de migrar ao longo do gel (como na eletroforese convencional), e por isso essa técnica consome longos períodos de tempo (Basim & Basim, 2001).

Dentre outras aplicações, a eletroforese de campo pulsado já foi usada na identificação e diferenciação de isolados de diferentes gêneros de fitobactérias, como *Xanthomonas* e *Pantoea*, visando aos estudos epidemiológicos (Egel *et al.*, 1991; Coplin *et al.*, 2002). Zhang & Geider (1997) confirmaram a reprodutibilidade do método ao observarem a formação dos mesmos padrões de bandas para os grupos de *Erwinia amylovora* em duas repetições com a enzima *Xba*I. Logo, a eletroforese de campo pulsado foi utilizada no presente trabalho com o objetivo de auxiliar no estudo da variabilidade de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* do Brasil.

1.6 Série diferenciadora

O gênero *Brassica* pertence à família botânica *Brassicaceae* (*Cruciferae*) e se destaca por reunir um número de espécies e variedades cultivadas maior do que qualquer outro gênero (Filgueira, 2002). Entre herbáceas e tuberosas, podem ser destacados: *Brassica oleracea* var. *capitata* (repolho), *B. oleracea* var. *botrytis* (couve-flor), *B. oleracea* var. *italica* (brócolis), *B. oleracea* var. *acephala* (couve-de-folha), *B. oleracea* var. *trouchuda* (couve-tronchuda), *B.*

oleracea var. *gemmifera* (couve-de-bruxelas), *B. oleracea* var. *gongylodes* (couve-rábano), *B. pekinensis* (couve-chinesa), *B. juncea* (mostarda-de-folha), *B. napus* var. *oleifera* ou *B. campestris* var. *oleifera* (canola), *Eruca sativa* (rúcula), *Raphanus sativus* (rabanete), *R. sativus* var. *acanthiformis* (rábano), *B. rapa* var. *rapa* (nabo) e *Rorippa nasturtium-aquaticum* (agrião) (Filgueira, 2002). Engloba ainda uma considerável quantidade de plantas daninhas e de espécies e híbridos selvagens como *Lepidium virginicum* L. (mastruço) e *Raphanus raphanistrum* L. (rabanete-de-cavalo). São plantas nativas do oeste da Europa, do Mediterrâneo e regiões temperadas da Ásia, utilizadas como alimento e também como ornamentais. De muitas espécies e variedades consomem-se as folhas (repolho, couve-de-folha, mostarda, agrião), raízes (rabanete, nabo), flores (brócolis, couve-flor) e sementes (mostarda, canola).

Entre essas espécies, destacam-se a *B. nigra* (conhecida como mostarda-da-Etiópia, com $n=8$ cromossomos), *B. oleracea* ($n=9$) e *B. rapa* ($n=10$), que provavelmente formaram a base para o desenvolvimento de muitas outras culturas importantes (Lagercrantz *et al.*, 1996). O chamado “Triângulo de U” representa uma teoria proposta em 1935 pelo botânico coreano Woo Jang-choon que trabalhava no Japão e adotou a tradução japonesa ‘Nagaharu U’ para o seu nome. Segundo essa teoria, três genomas ancestrais de brássicas, *B. rapa* (genoma A), *B. nigra* (genoma B), *B. oleracea* (genoma C), se combinaram, em variadas configurações, para formar os outros genomas *B. juncea* (genoma AB), *B. carinata* (genoma BC) e *B. napus* (genoma AC) (King, 2004).

Ao realizarem um estudo comparativo dos genomas de *B. rapa* (genoma A), *B. nigra* (genoma B) e *B. oleracea* (genoma C), Lagercrantz *et al.* (1996) concluíram que existe um alto grau de conservação do conteúdo genético dessas espécies, o que seria um indicativo de que os três genomas herdaram cópias inteiras, embora rearranjadas, do genoma de um ancestral comum. A diferença no número de cromossomos sugere que houve fissão/fusão dos mesmos e que foram esses processos que provocaram as mudanças nos números de cromossomos. O grau de colinearidade entre os genomas de *B. nigra* e de espécies mais cultivadas como *B. oleracea* e *B. rapa* pode afetar as possibilidades de transferência de características (traços) da primeira para as outras (Lagercrantz *et al.*, 1996), ou seja, quanto mais preservada estiver a ordem dos genes em um grupo de ligação ou cromossomo entre espécies distintas, mais facilmente esses traços poderão ser passados de uma espécie para a outra.

A busca por cultivares resistentes à podridão negra em brássicas é desejável e vem ocorrendo há décadas. Entretanto, “o melhoramento em *Brassica oleracea* visando resistência é freqüentemente empreendido sem o reconhecimento da existência de raças patogênicas” (Ignatov *et al.*, 1998). Para os melhoristas de brássicas, uma fonte potencial de resistência à podridão negra são as plantas daninhas da família *Brassicaceae*, como alguns cultivares de *B. juncea* e *B. nigra*, que apresentam alto percentual de plantas resistentes à colonização pela bactéria (Westman *et al.*, 1999). Espécies como o nabo e o rabanete também são considerados pouco suscetíveis à doença (Russel, 1898, citado por Bain, 1952).

Genes de resistência à *X. campestris* pv. *campestris* foram identificados baseados na interação gene-a-gene com diferentes raças do patógeno (Ignatov *et al.*, 1998). Um dos genes de resistência raça-específica no genoma de brássicas é provavelmente originário do genoma A, de

B. rapa, por ser mais comumente encontrado nesse genoma e em *B. napus* (AC) (Taylor *et al.*, 2002). Segundo Ignatov *et al.* (1998), a provável origem de resistência raça-específica à podridão negra está em couves da região mediterrânea. A resistência de *B. oleracea*, *B. napus* e *B. campestris* foi testada por Guo *et al.* (1991), tendo sido comprovado que dois cultivares de *B. napus* apresentavam os níveis mais elevados de resistência encontrados em brassicáceas até então. O cultivar japonês de repolho 'Early Fuji' é reconhecido como resistente à podridão negra (Bain, 1955). Foi demonstrado que a expressão da resistência nesse cultivar é devido a um gene dominante (Williams *et al.*, 1972). Taylor *et al.* (2002) verificaram que a frequência de resistência à raça 4 foi alta em *B. rapa* e *B. napus*, enquanto que a resistência às raças 1 e 4 foi elevada em *B. nigra* e *B. carinata*. Um exemplo é a bactéria *X. campestris* pv. *raphani*, causadora de mancha foliar, cujo patótipo NCPPB 1946 foi classificado como raça patogênica 5 de *X. campestris* pv. *campestris* (Vicente *et al.*, 2001).

No Brasil, vários cultivares de repolho e couve-flor foram testados para resistência à podridão negra das brássicas. Galli *et al.* (2001) constataram que todos os genótipos de couve-flor testados apresentaram-se suscetíveis, o repolho híbrido 'Matsukase' foi moderadamente suscetível, os demais genótipos de repolho moderadamente resistentes e o repolho Roxo, resistente à bactéria. Os cultivares de repolho Saikô e de couve-flor Shiromaru-I e Shiromaru-II também foram considerados resistentes (Maringoni *et al.*, 1997). Variações observadas nas reações de resistência/suscetibilidade em diversos genótipos podem ser explicadas pelas diferenças na patogenicidade dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, bem como nos métodos de inoculação utilizados (Galli *et al.*, 2001). Kamoun *et al.* (1992) consideraram as cultivares de nabo 'Just Right' e 'Seven Top' e a de mostarda 'Florida Broadleaf' completamente imunes a alguns, mas não a todos os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* testados, mostrando que há variabilidade patogênica nesse patovar.

O desenvolvimento de cultivares com níveis elevados de resistência, bem como maior durabilidade da mesma, deve ser iniciado a partir de uma seleção de fontes de resistência genética adequada (Costa *et al.*, 2001). O sucesso de programas de melhoramento visando resistência a doenças depende do conhecimento sobre a variabilidade do patógeno (Costa *et al.*, 2001). O emprego de isolados menos agressivos ou a ausência de determinada raça pode mascarar a reação dos genótipos sem separá-los em termos de resistência (Henz *et al.*, 1987).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Geral

2.1.1 Isolados Bacterianos

Vinte e seis isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc), bem como 10 isolados estrangeiros da mesma fitobactéria e um isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* (Xca, agente causal de mancha foliar em brássicas) (TABELA 1) foram selecionados e utilizados em todos os testes e experimentos. Outros 21 isolados brasileiros e um estrangeiro de *X. campestris* pv. *campestris* (TABELA 1) foram estudados apenas quanto à sua variabilidade patogênica em série diferenciadora no Experimento 3.

2.1.2 Isolamento

O isolamento foi feito a partir de material vegetal fresco ou seco dos quais se obteve os isolados Xcc 02 a Xcc 09, Xcc 11 a Xcc 14 e Xcc 25 a Xcc 27 (TABELA 1). Os demais eram pertencentes à coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Bacteriologia II ou foram doados por cientistas de outras instituições. Os isolados Xcc 28 e Xcc 29 representam o isolado tipo de *X. campestris* pv. *campestris* depositados em coleções distintas (Estados Unidos e Bélgica respectivamente). Seus códigos originais são ATCC 33913 (ATCC – “American Type Culture Collection”) e LMG 528 (LMG - “Laboratory of Microbiology Ghent”). Ambos foram utilizados como forma de avaliar a repetibilidade espacial dos testes.

No processo de isolamento, fragmentos de 3 mm de lado foram retirados dos bordos das lesões e imersos em uma gota de água para observação, em microscópio de luz, da exsudação das células bacterianas. Após a confirmação da etiologia bacteriana da doença, foi feito o isolamento do patógeno da seguinte forma: os fragmentos mencionados acima foram imersos em solução de etanol 50% por 30 segundos, visando a quebra da tensão superficial (cerosidade). Após essa etapa, os fragmentos foram transferidos para solução de hipoclorito de sódio a 70%, nela permanecendo por 2 a 3 minutos, para desinfecção superficial do material. Em seguida, os fragmentos foram lavados, por três vezes, em água destilada estéril para retirada do excesso de hipoclorito. Foram então macerados com um bastão de vidro em uma gota de água e ali permaneceram por 5 minutos, para a saída das células bacterianas do interior dos tecidos. Após esse período, uma gota da suspensão bacteriana formada foi transferida, com uma alça de repicagem, para uma placa de Petri contendo meio de cultura 523 sólido (Kado & Heskett, 1970) (Apêndice B). As placas foram mantidas em incubadora a 28°C por 36 a 48 horas. Colônias isoladas de aspecto liso, mucóide e de cor amarela foram então transferidas para tubos contendo o meio 523 e o meio YDC (“Yeast Dextrose Carbonate”) (Wilson *et al.*, 1967) (Apêndice B).

TABELA 1. Isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* utilizados nas análises metabólicas, de ácidos graxos, eletroforese de campo pulsado e inoculação em série diferenciadora.

Código	Origem	Doador/Instituição	Hospedeiro/observação
Xcc 01	Roraima (Pacaraíma)	Dr. Bernardo A. H. Vieira/Embrapa-CPAFRR	Couve-flor
Xcc 02	São Paulo (Botucatu)	Dr. Antônio Carlos Maringoni/UNESP	Couve-flor
Xcc 03	São Paulo (Botucatu)	Dr. Antônio Carlos Maringoni/UNESP	Couve
Xcc 04	Goiás (Goiânia)	Dr. Marcos G. Cunha/UFG	Brócolis
Xcc 06	Mato Grosso do Sul	Dr. Celso D. Fernandes/Embrapa-CNPGC	Couve
Xcc 07	Espírito Santo (Venda Nova do Imigrante)	Dra. Raquel N. Mello/Seminis	Repolho
Xcc 08	Espírito Santo (Venda Nova do Imigrante)	Dra. Raquel N. Mello/Seminis	Couve
Xcc 09	Espírito Santo (Venda Nova do Imigrante)	Dra. Raquel N. Mello/Seminis	Brócolis
Xcc 10	Brasil	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	-
Xcc 11	Minas Gerais (São Joaquim de Bicas)	Dra. Raquel N. Mello/Siemens	Couve-flor
Xcc 12	Minas Gerais (Viçosa)	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Brócolis
Xcc 13	Minas Gerais (Viçosa)	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Repolho
Xcc 14	Minas Gerais (Viçosa)	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Couve
Xcc 15	Espírito Santo	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Repolho
Xcc 16	São Paulo	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Couve
Xcc 17	Minas Gerais	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Couve
Xcc 18	Santa Catarina	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Couve-flor
Xcc 19	Santa Catarina	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Repolho
Xcc 20	Espírito Santo	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Couve-flor
Xcc 21	Espírito Santo	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Couve-flor
Xcc 22	Rio Grande do Sul	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Couve
Xcc 23	Distrito Federal	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Couve
Xcc 24	Minas Gerais	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Couve
Xcc 25	Rio Grande do Sul (Passo Fundo)	Dra. Norimar D'Ávila Denardin/UPF	-
Xcc 26	Minas Gerais (Viçosa)	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Couve
Xcc 27	Minas Gerais (Viçosa)	Lab. Bacteriologia II/DFP - UFV	Brócolis
Xcc 28 ^a	Estados Unidos	-	ATCC 33913
Xcc 29 ^a	Bélgica	-	LMG 568
Xcc 30	Estados Unidos	-	Xcc 8004
Xcc 31 ^b	Trindade e Tobago	-	NG5
Xcc 32 ^b	Trindade e Tobago	-	BrA1
33 ^c	Estados Unidos	-	Xca
Xcc 34	Trindade e Tobago	-	-
Xcc 35	Trindade e Tobago	-	-
Xcc 36	Trindade e Tobago	-	-
Xcc 37	Europa	-	-
Xcc 38	Estados Unidos	-	3849A
Xcc 5 ^d	Mato Grosso do Sul	Dr. Celso D. Fernandes/Embrapa-CNPGC	Repolho
247 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Couve-flor
254 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Repolho
472 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Repolho
485 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Couve-flor
607 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Repolho
608 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Repolho
610 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Couve-flor
629 ^{de}	Estados Unidos	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	-
701 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Couve-flor
729 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Repolho
959 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Canola
1046 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Couve-flor
1068 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Couve-rábano
1075 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Couve-flor
1077 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Repolho
1079 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Couve-flor
1086 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Rabanete
1087 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Canola
1088 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Couve-chinesa
1155 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Couve-de-folha
1164 ^d	Brasil	Dr. Júlio Rodrigues Neto/Instituto Biológico (SP)	Couve-flor
Total: 59 isolados			8 hospedeiros diferentes

^a isolado tipo: ATCC ("American Type Culture Collection"), LMG ("Laboratory of Microbiology Ghent"); ATCC 33913 = LMG 568.

^b Xcc 31 é sensível ao cobre; Xcc 32 é resistente ao cobre.

^c isolado 33 = *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*.

^d isolados utilizados apenas no Experimento 3 da inoculação em plantas de série diferenciadora.

^e código 629 = ATCC 13951.

2.1.3 Verificação da fitopatogenicidade

Os isolados brasileiros Xcc 01 a Xcc 27 (TABELA 1) tiveram a sua patogenicidade testada ao serem inoculados em plantas susceptíveis de brássicas, três semanas após o plantio, mantendo-se uma planta por vaso. O preparo do inóculo se deu da seguinte maneira para cada isolado: com a alça de repicagem, uma massa de células bacterianas foi transferida dos tubos de preservação para outros tubos contendo meio 523 sólido inclinado, os quais foram então mantidos em incubadora a 28°C por 36-48 horas. Parte do crescimento bacteriano foi colocado em tubos com solução salina (NaCl 0,85%), os quais sofreram agitação para formar uma suspensão cuja concentração foi ajustada para 10⁸ UFC/mL. Optou-se pelo método de incisão em folhas, no qual tesouras foram imersas nessas suspensão bacteriana (inóculo) e se fez quatro cortes no limbo foliar, dois em cada margem da folha, nas três folhas mais jovens. Cada planta foi inoculada com apenas um isolado de *X. campestris* pv. *campestris*. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e observadas diariamente por três semanas.

Os demais isolados brasileiros e os isolados estrangeiros foram recebidos posteriormente a essa etapa e inoculados diretamente nas plantas da série diferenciadora quando da montagem do Experimento 3.

2.1.4 Preservação dos isolados bacterianos

Dois métodos foram empregados na preservação dos isolados bacterianos: em meio YDC sob óleo mineral e em meio de glicerol a -80°C. Na preservação sob óleo mineral, os isolados da bactéria foram cultivados em tubos contendo o meio de cultura YDC (Wilson *et al.*, 1967), não inclinado, uma vez que o carbonato de cálcio presente em sua composição auxilia na neutralização dos ácidos produzidos por espécies de *Xanthomonas*. Os isolados foram mantidos incubados a 28°C por 24-48 horas. Terminado o período de incubação, foi adicionado aos tubos com o crescimento bacteriano o óleo mineral Nujol® (Ind. Quim. e Farm. Schering S. A.) previamente autoclavado (121°C, 15 lb de pressão, por 15 minutos) e seco em estufa (60°C, por 24 horas). O óleo foi adicionado asépticamente a cada tubo, até a altura de 1-2 cm acima do meio. Esses tubos com óleo foram mantidos em geladeira a 4°C, na posição vertical. Os isolados cultivados em meio YDC tiveram parte do seu crescimento suspenso em meio de glicerol (8 g/L de caldo nutriente e 150 mL/L de glicerol) e uma alíquota de 1 mL dessa mistura foi adicionada a tubos plásticos com 2 mL de capacidade cada e tampa rosqueável, adequados à criopreservação, os quais foram vedados e mantidos em ultra-congelador a -80°C (Romeiro, 2001).

2.2 Utilização de substratos (Biolog™)

Os isolados bacterianos (TABELA 1) foram cultivados a 30°C, por 24 horas em meio BUG, de propriedade da Biolog™ Inc., conforme recomendação do fabricante. Uma massa de células

bacterianas foi colhida da placa e transferida para o fluido de inoculação GN/GP (0,4 g de NaCl, 0,3 g de Pluronic F68 [Sigma-Aldrich Corp., # P7061], 0,1 g de “Gellan Gum” [“Phytigel”, Sigma-Aldrich Corp., # P8169], 1000 mL de água destilada), para microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos, formando uma suspensão que foi ajustada para atingir os padrões de turbidez recomendados pelo fabricante. Uma alíquota de 150 µL dessa suspensão foi adicionada às cavidades da microplaca GN2 (Biolog Inc., Hayward, Califórnia), específica para organismos Gram-negativos. Cada microplaca possui 95 fontes de carbono e o controle (negativo) foi feito com água. Para cada isolado foi utilizada uma microplaca que, após receber a suspensão, foi transferida para incubadora a 30°C, onde permaneceu por 16-24 horas. A leitura automatizada foi feita usando-se o programa MicroLog3 e os resultados comparados com a base de dados para microrganismos Gram-negativos. Juntamente com a identificação do organismo, foram fornecidos a probabilidade de acerto e os índices de similaridade.

2.3 Análise de ácidos graxos

Trinta e sete isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram submetidos à análise de ácidos graxos, sendo 26 isolados brasileiros (Xcc 01 a Xcc 27, exceto Xcc 05) e 11 estrangeiros (Xcc 28 a Xcc 38) (TABELA 1). O processo foi iniciado com o preparo das amostras para a cromatografia gasosa, o que ocorreu em quatro etapas, de acordo com protocolo pré-determinado (MIDI Inc.). Os isolados foram cultivados em meio TSBA (“Trypticase Soy Broth Agar”, meio sólido tripticase-soja), a 28°C, por 24 horas. Com uma alça de repicagem de tamanho padrão, aproximadamente 40 mg de células bacterianas foram transferidos da placa para tubos, a cada um dos quais foi adicionado 1 mL de uma solução de metanol e hidróxido de sódio (reagente 1), para a extração e a saponificação dos ácidos graxos totais da célula.

Após rápida agitação (5-10 segundos), os tubos foram mantidos em água a 100°C por 5 minutos. Os tubos foram novamente agitados e levados à água fervente por mais 25 minutos, completando o processo de saponificação. Aos tubos já resfriados foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido hidrocloreto e metanol (reagente 2) para a metilação. Nova agitação foi feita (5-10 segundos) e os tubos, colocados em água a 80°C por 10 minutos.

A etapa seguinte iniciou-se com a adição de 1,25 mL de uma mistura de hexano e éter metil terciário butílico (reagente 3) aos tubos já resfriados, com o objetivo de transferir os ácidos graxos metilados esterificados da fase aquosa para a orgânica. Após leve agitação, a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica, tratada com 3 mL de uma solução de lavagem de hidróxido de sódio (reagente 4), para a remoção de resíduos ácidos incorporados durante a metilação, o que ajuda a aumentar a vida útil da coluna do cromatógrafo gasoso. Em seguida, 2/3 da fase orgânica foram transferidos para a bandeja e esta, levada para o cromatógrafo gasoso, onde 2 µL da amostra, ao serem injetados automaticamente, foram volatilizados na coluna de hidrogênio. Os resultados foram submetidos ao “Software” de identificação microbiana (MIS – “Microbial Identification System”, utilizando a base de dados para microrganismos aeróbios Sherlock TSBA50 versão 5.0), que forneceu as identificações mais prováveis para cada amostra, bem como os

índices de similaridade. A partir desses resultados, foi gerado um dendrograma visando agrupar os isolados relacionados.

2.4 Eletroforese de Campo Pulsado

O DNA genômico total dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* (TABELA 1) foi extraído utilizando-se o protocolo descrito por Egel *et al.* (1991), com pequenas modificações. Todos os isolados foram cultivados em meio ágar nutriente. Colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio caldo nutriente (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 1000 mL de água destilada) e mantidas em incubadora a 28°C sob agitação constante (220 rpm) por 24 horas. Uma alíquota de 0,5 mL da suspensão bacteriana (5×10^9 UFC/mL) foi centrifugada em microcentrífuga a 14.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de água estéril para nova centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos, com o objetivo de lavar as células bacterianas. O sobrenadante foi novamente descartado e ao pellet foram adicionados 250 µL de TE (Tris-Acetato EDTA [pH 8.0]).

A essa suspensão, foram misturados 250 µL de uma solução de agarose LMP (low melting point) (9,8 mL de água deionizada, 99 µL de Tris 1 M [pH 8.0], 100 µL de MgCl₂ 1 M, 4 µL de EDTA 250 mM [pH 8.0], 0,2 g agarose LMP), previamente autoclavada e mantida em banho-maria a 55°C. Uma alíquota da mistura foi pipetada para moldes de plástico, para a formação de pequenos blocos, e mantida a 4°C por 15 minutos para a solidificação da agarose. Os blocos formados foram removidos e transferidos para tubos contendo 2 mL da solução de lise (46,65 mL de água deionizada autoclavada, 2 mL de uma solução de Sarcosil a 25%, 1,25 mL de SDS 20%, 100 µL de EDTA 250 mM [pH 9.5], 25 mg de Proteinase K). Esses tubos foram mantidos em banho-maria a 55°C por 24 horas.

Os blocos foram lavados com 5 mL de TE por lavagem, num total de 5 a 6 lavagens, com intervalo de 30 a 40 minutos entre elas. De cada bloco, cortou-se um quadrado de 3 mm de lado que foram transferidos para tubos contendo 200 µL da solução de restrição (fornecido junto com a enzima pelo fabricante) e mantidos em gelo. A parte não utilizada dos blocos foi mantida em EDTA 250 mM (pH 8.0) a 4°C (geladeira), para uso em géis posteriores.

Decorridos 15 minutos, a solução foi retirada e nova adição de 200 µL da mesma solução de restrição foi feita, juntamente com 20 U da enzima de restrição, *Xba*I (seqüência de reconhecimento TCTAGA) ou *Spe*I (seqüência de reconhecimento ACTAGT). Os tubos foram mantidos inclinados em incubadora a 37°C por pelo menos 12 horas. A solução com a enzima foi, então, retirada e às amostras (pequenos blocos) foram adicionados 500 µL da solução de lavagem (1 mL Sarcosil a 25%, 50µL de EDTA 250 mM [pH 9.5], 24 mL de água deionizada estéril). Essas amostras permaneceram em banho-maria a 50-55°C por duas horas. Em seguida, a solução de lavagem foi trocada e as amostras permaneceram sobre a bancada (temperatura ambiente) por mais duas horas.

O gel de agarose a 1% foi preparado (80 mL TBE [Tris-Borato EDTA]; 0,8 g de agarose; 12,7 x 13,9 cm) e deixado para resfriamento por 15 minutos. Passado esse tempo, o gel foi carregado com as amostras (20 amostras por gel). Cada cavidade foi então coberta com agarose LMP, responsável por manter as amostras nas cavidades. O tampão usado na unidade de eletroforese foi TBE (2 L). A unidade de eletroforese utilizada foi a CHEF-DRII (“Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields”, Bio-Rad), que possui 24 eletrodos espaçados igualmente na forma hexagonal, contornando o local onde o gel é depositado, e geram um campo elétrico uniforme. O equipamento foi programado com tempo de corrida e de pulso adequados para cada enzima (*Xba*I 4s por 1h e 8s por 18h; *Spe*I 3 a 30s por 22h). Após esse período, o gel foi transferido para uma solução de brometo de etídio por 25 minutos e fotografado em transiluminador (luz ultra-violeta).

Para o gel com as amostras tratadas com a enzima *Xba*I, foi usado como marcador de tamanho o DNA cromossomal de *Sacharomyces cerevisiae* (Bio-Rad), que produz bandas de 225 kb (menor), 285 kb, 365 kb, 450 kb, entre outras, até alcançar 2.200 kb (maior). Por meio de avaliação visual, os isolados que apresentaram padrões de bandas não-idênticos foram separados em diferentes grupos.

2.5 Inoculação em série diferenciadora

Foram realizados três experimentos envolvendo a inoculação dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* em plantas de brássicas que compõem duas séries diferenciadoras (Kamoun *et al.*, 1992; Vicente *et al.*, 2001) (TABELA 2 e Foto 2 – Apêndice A).

TABELA 2. Plantas das séries diferenciadoras para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* utilizadas nos experimentos de inoculação.

Série diferenciadora	Cultivar	Tipo ^c	Nome científico	Nome comum	Genoma	Origem das sementes	
Série 2 ^b	Série 1 ^a	'Wirosa' F1	H	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabauda</i>	couve-de-Sabóia	CC	Bejo Zaden NV. (Holanda)
		'Just Right'	H	<i>B. rapa</i> var. <i>rapifera</i>	nabo	AA	Otis S. Twilley Seed Co. (Estados Unidos)
		'Florida Broadleaf'	PA	<i>B. juncea</i>	mostarda	AABB	Otis S. Twilley Seed Co. (Estados Unidos)
		'Seven Top'	PA	<i>B. rapa</i> var. <i>rapifera</i>	nabo	AA	Otis S. Twilley Seed Co. (Estados Unidos)
	'Miracle' F1	H	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	couve-flor	CC	Bejo Zaden NV. (Holanda)	
	PI 199947	PA	<i>B. carinata</i>	mostarda-da-Etiópia	BBCC	USDA/ Lisa Earle ^d	

^a série desenvolvida por Kamoun *et al.* (1992).

^b Vicente *et al.* (2001); utiliza grande parte dos cultivares sugeridos por Kamoun *et al.* (1992), acrescida de outros cultivares. Há uma sétima variedade de planta nessa série diferenciadora que foi excluída do presente trabalho por fornecer resultado semelhante à 'Just Right'.

^c H = híbrido; PA = polinização aberta.

^d sementes provenientes dessas duas fontes (USDA e Lisa Earle) foram utilizadas.

Experimento 1

Vasos contendo o substrato MetroMix 300 (Scotts-Sierra Horticultural Products Company) receberam as sementes das diferenciadoras (mínimo de 3 sementes/vaso) e foram mantidos em casa-de-vegetação a aproximadamente 30°C. O desbaste foi realizado dez dias após a semeadura, deixando-se apenas uma plântula mais vigorosa em cada vaso, realizando-se, também, uma fertilização (3 g/L de NPK 20-20-20, Peters Professional®). A inoculação foi realizada quatro semanas após o plantio, seguindo o procedimento de Ignatov *et al.* (1999), com modificações. O instrumento de inoculação, semelhante a uma pinça, foi o “mouse tooth forceps” adaptado (Foto 4 - Apêndice A). Essa adaptação foi feita com o objetivo de se causar ferimentos nas folhas sem esmagá-las. Foram inoculadas as três folhas mais jovens de cada planta, sendo cada folha uma repetição, com um mínimo de 5 pontos de inoculação por folha. Somente um isolado foi inoculado em cada planta.

Para o preparo do inóculo, os isolados (TABELA 1) foram cultivados em meio Ágar Nutriente (Difco), a 28°C, por aproximadamente 48 horas. Células bacterianas foram transferidas para tubos contendo 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e passaram por agitação, gerando uma suspensão concentrada. Uma alíquota foi transferida para novos tubos e ajustou-se a concentração dessa suspensão em espectrofotômetro para $OD_{540} = 0,30$. Chumaços de algodão foram completamente embebidos na suspensão bacteriana e presos nas pontas do “mouse tooth forceps”. O controle foi feito apenas com solução salina. A imersão por no mínimo um minuto em uma solução de hipoclorito de sódio foi feita para a lavagem da pinça entre as inoculações dos diferentes isolados. As plantas de todas as diferenciadoras foram mantidas em casa-de-vegetação, dispostas ao acaso na bancada, observadas diariamente e avaliadas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação, com base em uma escala de notas (TABELA 3). Esse experimento foi realizado no período de 19 de novembro de 2004 a 07 de janeiro de 2005.

TABELA 3. Escala de notas utilizada nas avaliações da inoculação de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em plantas da série diferenciadora. As plantas receberam uma ou mais notas em cada avaliação.

Escala de avaliação	Sintomas
0	folha inoculada sem qualquer sintoma da doença
1	pequeno escurecimento (reação de resistência) ao redor dos pontos de inoculação
1,5	leve clorose associada ou não ao escurecimento de micro nervuras em até 3 pontos da folha inoculada
2	clorose e escurecimento de nervuras, perda de turgidez em menos de 25% da folha inoculada, máximo de 2 lesões
2,5	clorose, escurecimento de nervuras, perda de turgidez em menos de 50% da folha inoculada, formação de 2 a 5 lesões
3	um ou mais dos seguintes sintomas em até 50% da área da folha inoculada: lesões coalescidas, seca, clorose, escurecimento de nervuras, perda de turgidez, anasarca. Cerca de 50% de área verde ainda na folha
3,5	cerca de 75-90% da folha inoculada com os sintomas da nota 3
4	folha inoculada completamente afetada pelos sintomas da doença, mas ainda aderida à planta
5	folha inoculada desprendida da planta, seja por senescência ou decorrente da ação da fitobactéria
6	folha(s) não inoculada(s) exibindo sintomas da doença (essa nota pode ser associada a outras da escala)

Experimento 2

Semelhante ao experimento 1, tendo-se testado três diferenciadoras de cada vez com o objetivo de reduzir o número de plantas nas bancadas e aumentar o espaçamento entre elas. Foram plantadas primeiramente 'Wirosa', 'Just Right' e 'Florida Broadleaf' e, posteriormente, 'Seven Top', 'Miracle' e PI 199947. Os controles, em número de dois, foram feitos com solução salina e, entre as inoculações, utilizou-se uma solução de etanol a 70% para lavagem do "mouse tooth forceps", com tempo de imersão de um minuto entre isolados. Esse experimento foi realizado nos períodos de 26 de janeiro a 16 de março de 2005 (primeira parte) e de 25 de fevereiro a 15 de abril do mesmo ano (segunda parte).

Experimento 3

As diferenciadoras foram testadas duas a duas: 'Wirosa' e 'Florida Broadleaf', 'Seven Top' e 'Miracle', e 'Just Right' e PI 199947. Foram mantidas até duas plantas por vaso, mas apenas uma delas foi inoculada. Cada isolado (TABELA 1) foi inoculado nas três folhas mais jovens de duas plantas (dois vasos). O substrato utilizado foi uma mistura de solo, areia e matéria orgânica (esterco bovino curtido). Esse experimento foi realizado nos períodos de 11 de novembro a 02 de dezembro de 2005 (primeira parte), 19 de novembro de 2005 a 06 de janeiro de 2006 (segunda parte) e 13 de janeiro a 03 de março de 2006.

O organograma apresentando o esquema de montagem dos três experimentos está apresentado na FIGURA 1.

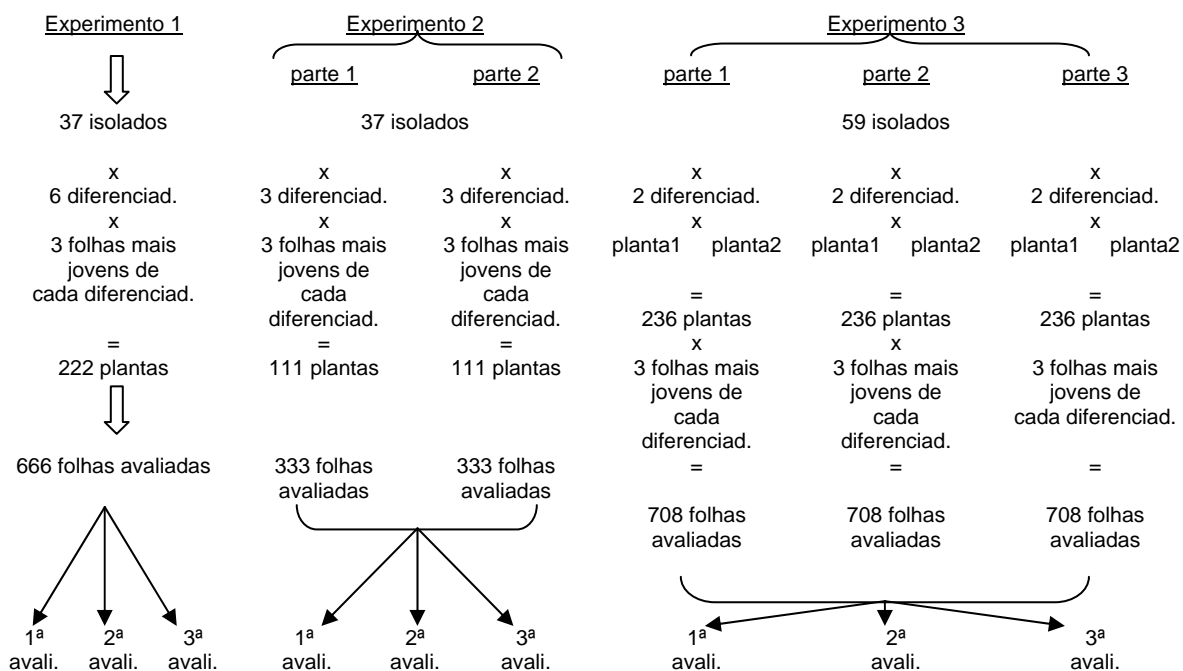


FIGURA 1. Esquema de montagem e avaliação dos três experimentos de inoculação de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em plantas diferenciadoras.

3. RESULTADOS

3.1 Utilização de substratos (Biolog™)

Os resultados de utilização de substratos encontram-se nas TABELAS 13A e 13B (Apêndice C) e a identificação baseada no sistema Biolog está apresentada na TABELA 4.

TABELA 4. Identificação dos isolados brasileiros e estrangeiros de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pelo sistema Biolog™, com probabilidade de acerto e índice de similaridade.

Isolado	Identificação 1*	Prob. (%)	Sim.	Identificação 2**	Prob. (%)	Sim.
Xcc 01	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	98	0.75	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	1	0.01
Xcc 02	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	99	0.85	-	-	-
Xcc 03	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	99	0.54	-	-	-
Xcc 04	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	82	0.65	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	15	0.11
Xcc 06	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.68	-	-	-
Xcc 07	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.64	-	-	-
Xcc 08	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.63	-	-	-
Xcc 09	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	93	0.58	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	4	0.02
Xcc 10	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.70	-	-	-
Xcc 11	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.80	-	-	-
Xcc 12	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	94	0.81	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	3	0.02
Xcc 13	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	98	0.80	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	1	0.01
Xcc 14	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	97	0.67	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>poinsettiicola</i>	3	0.02
Xcc 15	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.66	-	-	-
Xcc 16	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	99	0.76	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>poinsettiicola</i>	1	0.01
Xcc 17	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	80	0.56	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	18	0.12
Xcc 18	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	98	0.62	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	1	0.01
Xcc 19	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.70	-	-	-
Xcc 20	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	89	0.75	<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	8	0.06
Xcc 21	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.73	-	-	-
Xcc 22	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.76	-	-	-
Xcc 23	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.69	-	-	-
Xcc 24	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.60	-	-	-
Xcc 25	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	96	0.83	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>poinsettiicola</i>	3	0.02
Xcc 26	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	99	0.74	-	-	-
Xcc 27	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.69	-	-	-
Xcc 28	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	99	0.74	-	-	-
Xcc 29	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	99	0.78	-	-	-
Xcc 30	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	95	0.61	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	4	0.03
Xcc 31	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	90	0.70	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>diffenbachiae</i>	8	0.06
Xcc 32	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	94	0.50	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>poinsettiicola</i>	3	0.01
33(Xca)	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	98	0.80	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	1	0.01
Xcc 34	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	97	0.77	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	1	0.01
Xcc 35	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.76	-	-	-
Xcc 36	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	100	0.74	-	-	-
Xcc 37	<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	95	0.87	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	4	0.03
Xcc 38	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	99	0.70	-	-	-

* Identificação 1 (primeira opção encontrada pelo banco de dados no resultado final).

** Identificação 2 (segunda opção encontrada pelo banco de dados no resultado final).

A porcentagem de isolados identificados como *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *raphani*, *X. axonopodis* pv. *malvacearum* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* encontram-se na TABELA 5. Cem por cento dos isolados utilizados foram identificados, pelo menos quanto ao gênero *Xanthomonas* e 89% quanto à espécie *Xanthomonas campestris*.

TABELA 5. Valores aproximados (%) dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* identificados pelo sistema Biolog em espécies e patovares do gênero *Xanthomonas*.

Identificação	Total (37 isolados)	Isolados brasileiros (26 isolados)	Isolados estrangeiros (11 isolados)
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	70,0%	54,0%	16,0%
<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	19,0%	13,5%	5,5%
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	5,5%	2,7%	2,7%
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	5,5%	0%	5,5%
Total	100%	70%	30%

Analisando-se somente os isolados brasileiros, verifica-se que 77% deles foram identificados como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, 19% como *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* e 4% como *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Esse valor 4% representa um único isolado, originário de Roraima, Região Norte do Brasil.

O isolado tipo (Xcc 28 – ATCC 33913) foi corretamente identificado como *X. campestris* pv. *campestris* com índice de similaridade igual a 0.74. Enquanto os índices de similaridade variaram de 0.54 (Xcc 3) a 0.85 (Xcc 2) para os isolados brasileiros, esses valores foram de 0.50 (Xcc 32) a 0.87 (Xcc 37) para os isolados estrangeiros. O isolado 33 (*X. campestris* pv. *armoraciae*) foi incorretamente identificado como *X. campestris* pv. *raphani*, com similaridade igual a 0.80.

As 14 fontes de carbono utilizadas por todos os isolados (brasileiros e estrangeiros) são Celobiose, D-Frutose, Gentiobiose, α -D-Glicose, D-Manose, D-Melibiose, D-Trealose, Metilpiruvato, Monometilsuccinato, Ácido α -Cetoglutárico, Ácido Succínico, Ácido Bromosuccínico, Ácido L-Glutâmico e L-Serina (TABELAS 13A e 13B - Apêndice C).

Por outro lado, nenhum dos isolado deste estudo (brasileiros e estrangeiros) foi capaz de crescer na presença unicamente de Água, α -Ciclodextrina, N-Acetil-D-galactosamina, Adonitol, L-Arabinose, D-Arabitól, meso-Inositol, α -D-Lactose, D-Manitol, L-Ramnose, D-Sorbitol, Turanose, Xilitol, Ácido Fórmico, Ácido Galactônico, Ácido D-Galacturônico, Ácido Glucônico, Ácido Glucosamínico, Ácido Glucurônico, Ácido β -Hidroxi-butírico, Ácido γ -Hidroxi-butírico, Ácido α -Cetoaléico, Ácido Quínico, Ácido Sebácico, Glucuronamida, L-Asparagina, Ácido Glicil-L-aspartico, L-Histidina, Hidroxi-L-prolina, L-Leucina, L-Ornitina, L-Fenilalanina, Ácido L-Piroglutâmico, D-Serina, D,L-Carnitina, Ácido γ -Aminobutírico, Ácido Urocânico, Timidina, Fenil etilamina, Putrescina, 2-Aminoetanol ou 2,3-Butanediol (TABELAS 14A e 14B).

Nenhum dos isolados estudados foi capaz de utilizar asparagina como única fonte de carbono. Todos os isolados estrangeiros cresceram na presença de Dextrina e Sacarose, mas nem todos os isolados brasileiros conseguiram catabolizar tais açúcares. Os isolados brasileiros Xcc 02, 12, 14, 25 e 26, diferentemente dos demais, foram capazes de utilizar a D-Alanina, tendo sido identificados como *X. campestris* pv. *raphani*. Aparentemente, não houve qualquer relação entre o fato de alguns isolados terem sido identificados como *X. campestris* pv. *raphani* e sua origem geográfica ou espécie hospedeira.

3.2 Análise de ácidos graxos

As porcentagens de identificação de isolados em espécies e patovares de *Xanthomonas* estão apresentadas na TABELA 6.

TABELA 6. Valores aproximados da porcentagem de isolados (brasileiros e estrangeiros) identificados como primeira, segunda ou terceira opção para as diferentes espécies/patovares de *Xanthomonas*.

Nome	Identificação dos isolados		
	1º opção	2º opção	3º opção
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i>	46%	21%	17%
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	30%	35%	22%
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>zinniae</i>	11%	19%	27%
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>	11%	16%	5%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2%	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	-	3%	19%
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (citri A)	-	3%	5%
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	-	3%	-
<i>Xanthomonas pisi</i>	-	-	5%
Total	100%	100%	100%

Considerando-se todos os isolados (brasileiros e estrangeiros), 46% foram primeiramente identificados como *X. campestris* pv. *raphani*, 30% como *X. campestris* pv. *campestris* e 11% como *X. campestris* pv. *armoraciae*. Os outros 11% foram identificados como *X. axonopodis* pv. *zinniae*, embora tal patovar da espécie *X. axonopodis* não tenha sido encontrado, seja como classificação antiga ou recente (Bradbury, 1986; ISPP, 2006). Portanto, fez-se um ajuste para a nomenclatura correta, isto é, *X. campestris* pv. *zinniae*. Os resultados da análise de ácidos graxos por isolado encontram-se na TABELA 7.

TABELA 7. Identificações (ID #) mais prováveis dos isolados brasileiros e estrangeiros de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em gênero, espécie e patovar feita pela análise de ácidos graxos, com o respectivo Índice de Similaridade (IS) apresentado abaixo do nome. ID #1 representa a identificação com maior probabilidade de acerto, seguida da ID #2, ID #3 e assim sucessivamente.

Isolado	Identificação mais provável (índice de similaridade)						
	ID #1 (IS)	ID #2 (IS)	ID #3 (IS)	ID #4 (IS)	ID #5 (IS)	ID #6 (IS)	ID #7 (IS)
Xcc 01	<i>X. c. pv. campestris</i> ^a (0.746)	<i>X. c. pv. raphani</i> ^a (0.699)	<i>X. a. pv. manihotis</i> ^b (0.621)	<i>X. c. pv. zinniae</i> ^a (0.596)	<i>X. a. pv. citrumelo</i> ^b (0.522)	<i>X.a. pv. dieffenbachiae</i> ^b (0.458)	-
Xcc 02	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.877)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.782)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.775)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> ^a (0.738)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.722)	<i>X. a. pv. citrumelo</i> (0.569)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> ^b (0.530)
Xcc 03	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.780)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.737)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.720)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.709)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.706)	-	-
Xcc 04	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.778)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.777)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.574)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.563)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.488)	<i>X. pisi</i> ^c (0.469)	-
Xcc 06	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.843)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.789)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.600)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.585)	-	-	-
Xcc 07	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.758)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.736)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.625)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.620)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.538)	-	-
Xcc 08	<i>X. c. zinniae</i> (0.789)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.753)	<i>X. a. pv. citri</i> ^b (0.571)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.553)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.551)	<i>X. a. pv. malvacearum</i> ^b (0.478)	-
Xcc 09	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.811)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.790)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.746)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.736)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.717)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.491)	-
Xcc 10	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.819)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.770)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.569)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.553)	-	-	-
Xcc 11	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.723)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.611)	<i>X. pisi</i> (0.491)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.477)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.457)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.457)	-
Xcc 12	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.746)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.654)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.638)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.582)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.546)	<i>S. maltophilia</i> ^d (0.515)	-
Xcc 13	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.717)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.716)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.709)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.667)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.659)	<i>S. maltophilia</i> (0.458)	<i>X. a. pv. fici</i> ^b (0.434)
Xcc 14	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.900)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.852)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.812)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.748)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.746)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.649)	<i>X. a. pv. dieffenbachiae</i> (0.608)
Xcc 15	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.757)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.726)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.640)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.625)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.539)	<i>X. a. pv. citri</i> (0.482)	<i>X. a. pv. begoniae</i> ^b (0.458)
Xcc 16	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.861)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.806)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.632)	<i>X. a. pv. citri</i> (0.556)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.555)	<i>X. a. pv. malvacearum</i> (0.541)	<i>S. maltophilia</i> (0.524)
Xcc 17	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.725)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.678)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.647)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.577)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.563)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.493)	-

^a Patovares identificados da espécie *Xanthomonas campestris*: *campestris*, *raphani*, *armoraciae* e *zinniae*.

^b Patovares identificados da espécie *Xanthomonas axonopodis*: *manihotis*, *citrumelo*, *dieffenbachiae*, *vesicatoria*, *citri*, *malvacearum*, *fici* e *begoniae*.

^c *Xanthomonas pisi*

^d *Stenotrophomonas maltophilia* (antigamente denominada *Xanthomonas maltophilia*).

cont...

TABELA 7. cont....

Isolado	Identificação mais provável (índice de similaridade)						
	ID #1	ID #2	ID #3	ID #4	ID #5	ID #6	ID #7
Xcc 18	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.823)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.783)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.773)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.696)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.672)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.525)	-
Xcc 19	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.792)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.786)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.710)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.694)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.669)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.508)	-
Xcc 20	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.802)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.771)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.678)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.666)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.559)	<i>X. a. pv. citri</i> (0.510)	<i>X. a. pv. begoniae</i> (0.483)
Xcc 21	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.783)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.766)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.654)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.596)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.540)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.485)	-
Xcc 22	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.787)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.741)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.582)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.554)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.492)	-	-
Xcc 23	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.800)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.797)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.622)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.592)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.508)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.502)	-
Xcc 24	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.852)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.844)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.666)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.628)	<i>X. a. pv. citri</i> (0.560)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.534)	-
Xcc 25	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.874)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.759)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.749)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.662)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.651)	<i>S. maltophilia</i> (0.544)	-
Xcc 26	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.866)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.800)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.796)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.742)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.707)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.623)	<i>X. a. pv. citri</i> (0.554)
Xcc 27	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.860)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.787)	<i>X. a. pv. citri</i> (0.608)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.563)	-	-	-
Xcc 28	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.692)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.628)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.614)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.487)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.452)	<i>X. a. pv. citri</i> (0.433)	-
Xcc 29	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.762)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.715)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.647)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.629)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.574)	-	-
Xcc 30	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.498)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.496)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.495)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.409)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.394)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.338)	<i>X. a. pv. begoniae</i> (0.326)
Xcc 31	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.899)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.860)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.807)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.802)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.759)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.587)	-
Xcc 32	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.898)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.839)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.703)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.648)	<i>X. a. pv. citri</i> (0.619)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.571)	-
33 (Xca)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.740)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.692)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.635)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.576)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.575)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.555)	<i>X. pisi</i> (0.497)
Xcc 34	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.774)	<i>X. a. pv. citri</i> (0.658)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.636)	<i>X. a. pv. malvacearum</i> (0.562)	<i>S. maltophilia</i> (0.553)	<i>X. a. pv. pahseoli</i> (0.523)	-
Xcc 35	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.688)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.645)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.640)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.501)	<i>X. a. pv. citri</i> (0.434)	<i>S. maltophilia</i> (0.419)	-
Xcc 36	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.899)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.836)	<i>X. a. pv. manihotis</i> (0.794)	<i>X. c. pv. armoraciae</i> (0.739)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.715)	<i>X. a. pv. dieffenbachiae</i> (0.580)	<i>X. a. pv. vesicatoria</i> (0.580)
Xcc 37	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.666)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.622)	<i>X. pisi</i> (0.538)	<i>X. a. pv. begoniae</i> (0.484)	<i>X. a. pv. citri</i> (0.429)	<i>X. c. pv. campestris</i> (0.422)	-
Xcc 38	<i>S. maltophilia</i> (0.807)	<i>X. a. pv. malvacearum</i> (0.743)	<i>X. c. pv. zinniae</i> (0.588)	<i>X. a. pv. phaseoli</i> (0.583)	<i>X. h. pv. pelargonii</i> (0.493)	<i>X. c. pv. raphani</i> (0.488)	-

Com o ajuste na nomenclatura, 100% dos isolados brasileiros (Xcc 1 à Xcc 27) foram identificados primeiramente como pertencentes à espécie *Xanthomonas campestris*, sendo 39% como *X. campestris* pv. *raphani*, 35% como *X. campestris* pv. *campestris* e 15% como *X. campestris* pv. *armoraciae*, correspondendo a 89% da identificação como patovares que infectam brássicas. Os 12% restantes foram identificados como *X. campestris* pv. *zinniae*.

Os índices de similaridade (IS) para a primeira opção de identificação variaram de 0,717 (Xcc 13) a 0,900 (Xcc 14) para os isolados brasileiros, e 0,498 (Xcc 30) a 0,899 (Xcc 31 e 36) para os isolados estrangeiros, tendo sido de 0,692 para o isolado tipo ATCC 33913 (Xcc 28) (TABELA 6). Com a exceção dos isolados 33 (*X. campestris* pv. *armoraciae*), Xcc 34, Xcc 36 e Xcc 38, todos os outros isolados estrangeiros, ou seja, 64% deles, foram identificados como *X. campestris* pv. *raphani*.

Um dendrograma foi gerado a partir dos resultados da análise de ácidos graxos, formando seis grupos (FIGURA 2 e TABELA 8).

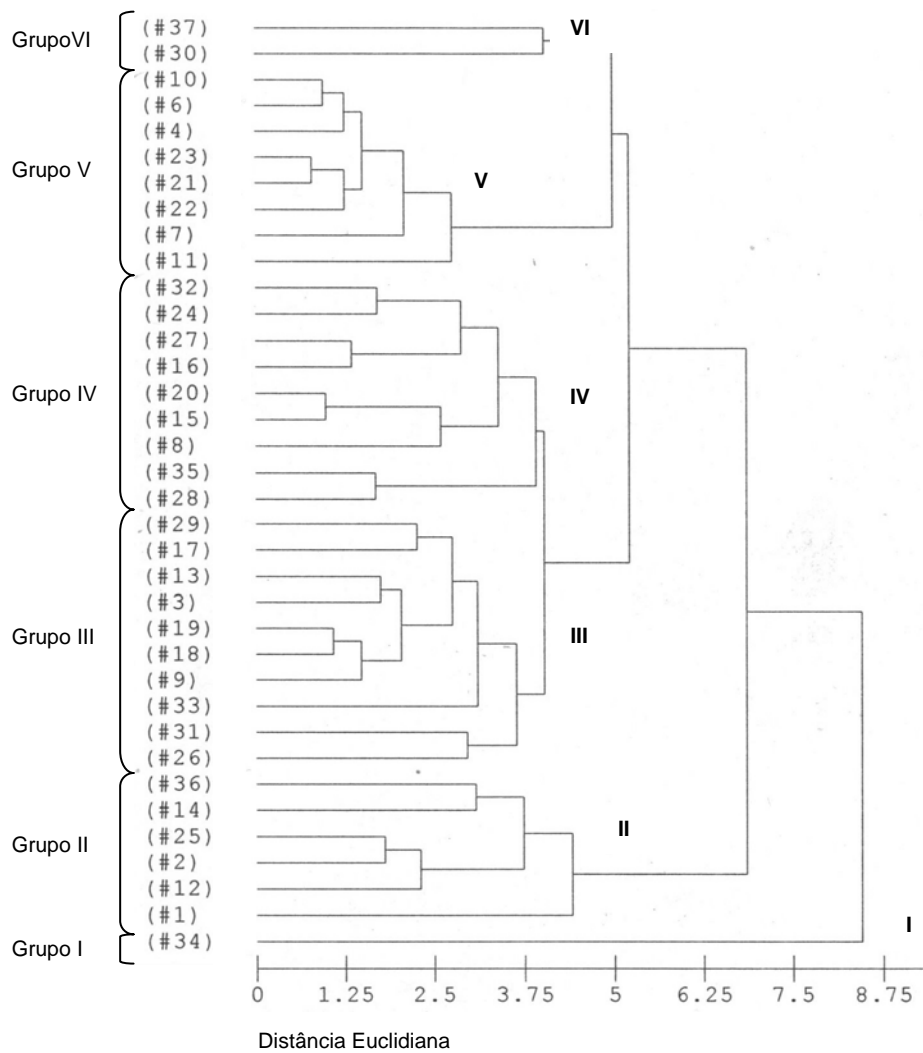


Figura 2. Dendrograma apresentando o agrupamento dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* com base na análise de ácidos graxos (FAME). Quanto menor o valor da distância euclidiana entre dois organismos ou grupos, mais próximos eles se apresentam.

TABELA 8. Grupos formados a partir da análise de ácidos graxos dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Estão apresentados o número de isolados pertencentes a cada grupo e os patovares identificados em cada grupo.

Grupo #	Número de isolados			Patovar(es) identificado(s) no grupo	Código de identificação do isolado
	Total	Brasil	Exterior		
Grupo I	1	0	1	<i>X.c. pv. zinniae</i>	Xcc 34
Grupo II	6	5	1	<i>X.c. pv. campestris</i> // <i>X.c. pv. raphani</i>	Xcc 01, Xcc 14 e Xcc 36// Xcc 02, Xcc 12, , Xcc 25
Grupo III	10	8	2	<i>X.c. pv. campestris</i> // <i>X.c. pv. raphani</i>	Xcc 33, Xcc 18, Xcc 03// Xcc 26, Xcc 31, Xcc 09, Xcc 19, Xcc 13, Xcc 17 e Xcc 29
Grupo IV	9	6	3	<i>X.c. pv. raphani</i> // <i>X.c. pv. zinniae</i>	Xcc 28, Xcc 35, Xcc 15, Xcc 20, Xcc 24, Xcc 32// Xcc 08, Xcc 16 e Xcc 27
Grupo V	8	8	0	<i>X.c. pv. campestris</i> // <i>X.c. pv. armoraciae</i>	Xcc 11, Xcc 07, Xcc 21, Xcc 04// Xcc 22, Xcc 23, Xcc 06 e Xcc 10
Grupo VI	2	0	2	<i>X.c. pv. raphani</i>	Xcc 30 e Xcc 37

O Grupo I foi formado por apenas um isolado identificado como *X. campestris* pv. *zinniae* e o Grupo VI por dois isolados identificados como *X. campestris* pv. *raphani*. Nesses dois grupos há presença somente de isolados estrangeiros. Os Grupos II e III foram formados tanto por isolados do Brasil quanto do exterior que foram identificados como patovares *campestris* e *raphani*, independentemente da origem. O Grupo IV foi formado por 9 isolados, sendo 6 deles brasileiros, e nenhum identificado como *X. campestris* pv. *campestris*. O Grupo V foi o único formado somente por isolados brasileiros (8 no total), identificados como *X. campestris* pv. *campestris* e *X. campestris* pv. *armoraciae*.

3.3 Eletroforese de Campo Pulsado

As FIGURAS 3 e 4 representam fotos dos géis com os diferentes padrões de bandas formados quando a clivagem do DNA foi realizada pelas enzimas *Xba*I e *Spe*I respectivamente.

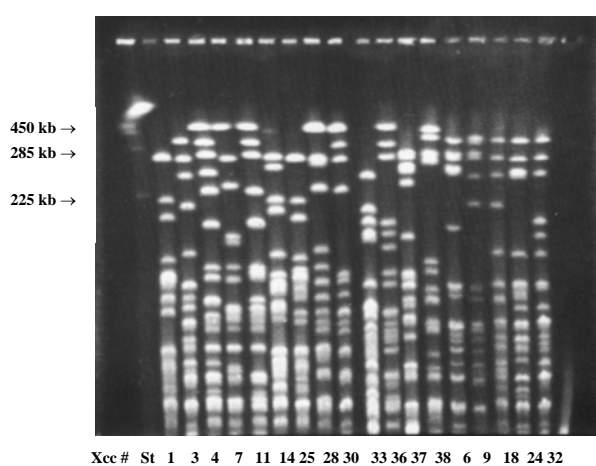


Figura 3. Padrões de bandas observadas em gel de PFGE, quando foi usada a enzima *Xba*I. Estão presentes um representante de cada grupo formado. Como marcador de tamanho (St, "standard"), foi usado o DNA cromossomal de *S. cerevisiae*. As quatro bandas visíveis no marcador correspondem a 450 kb, 365 kb, 285 kb e 225 kb.

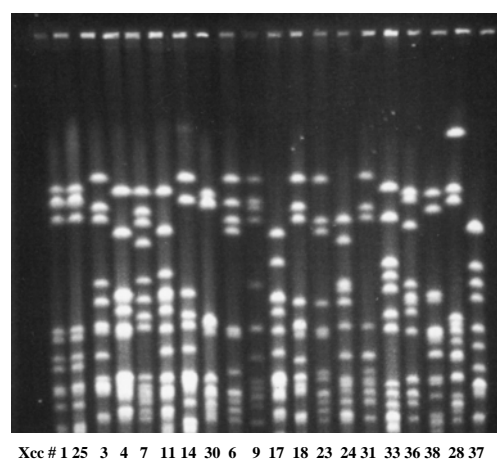


Figura 4. Padrões de bandas observadas em gel de PFGE, quando foi usada a enzima *Spe*I. Estão presentes um representante de cada grupo formado, com exceção do Xcc 01 e Xcc 25, que ficaram no mesmo grupo (P-I).

A TABELA 9 apresenta os perfis observados no gel, de acordo com a enzima de restrição utilizada e os isolados agrupados em cada perfil. A digestão com a enzima *Xba*I promoveu a formação de dezoito perfis diferentes, B1 a B11 e E1 a E7, sendo os onze primeiros formados apenas por isolados brasileiros e os sete restantes, apenas por isolados estrangeiros.

TABELA 9. Isolados brasileiros e estrangeiros de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* agrupados de acordo com os diferentes padrões de bandas observados na eletroforese de campo pulsado utilizando as enzimas de restrição *Xba*I e *Spe*I.

Grupos (perfis)	Enzima de restrição	
	<i>Xba</i> I	<i>Spe</i> I
*B1	Xcc 01 (RR), Xcc 02 (SP) e Xcc 12 (MG)	Xcc 01 (RR), Xcc 02 (SP), Xcc 12 (MG) e Xcc 25 (RS)
B2	Xcc 03 (SP) e Xcc 13 (MG)	Xcc 03 (SP) e Xcc 13 (MG)
B3	Xcc 04 (GO)	Xcc 04 (GO)
B4	Xcc 06 (MS), Xcc 10 (Bras.), Xcc 21 (ES), Xcc 22 (RS) e Xcc 23 (DF)	Xcc 06 (MS), Xcc 10 (Brasil), Xcc 21 (ES) e Xcc 22 (RS)
B5	Xcc 07 (ES)	Xcc 07 (ES)
B6	Xcc 09 (ES)	Xcc 09 (ES)
B7	Xcc 11 (MG) e Xcc 17 (MG)	Xcc 11 (MG)
B8	Xcc 14 (MG) e Xcc 26 (MG)	Xcc 14 (MG) e Xcc 26 (MG)
B9	Xcc 18 (SC) e Xcc 19 (SC)	Xcc 18 (SC) e Xcc 19 (SC)
B10	Xcc 24 (MG)	Xcc 24 (MG)
B11	Xcc 25 (RS)	-
B12	-	Xcc 17 (MG)
B13	-	Xcc 23 (DF)
**E1	Xcc 28 (Estados Unidos), Xcc 29 (Bélgica) e Xcc 35 (Trindade e Tobago)	Xcc 28 (Estados Unidos), Xcc 29 (Bélgica) e Xcc 35 (Trindade e Tobago)
E2	Xcc 30 (Estados Unidos)	Xcc 30 (Estados Unidos)
E3	Xcc 31 e Xcc 32 (ambos de Trindade e Tobago)	Xcc 31 e Xcc 32 (ambos de Trindade e Tobago)
E4	33 (<i>X. campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>) (Estados Unidos)	33 (<i>X. campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>) (Estados Unidos)
E5	Xcc 34 (Trindade e Tobago) e Xcc 37 (Europa)	Xcc 34 (Trindade e Tobago) e Xcc 37 (Europa)
E6	Xcc 36 (Trindade e Tobago)	Xcc 36 (Trindade e Tobago)
E7	Xcc 38 (Estados Unidos)	Xcc 38 (Estados Unidos)

* B = perfil formado somente por isolado(s) brasileiro(s).

** E = perfil formado somente por isolado(s) estrangeiro(s).

Com a enzima *Xba*I, cinco dos perfis brasileiros (B) tiveram representante único: B3 (GO), B5 (ES), B6 (ES), B10 (MG) e B11 (RS). Seis isolados foram classificados dois a dois nos perfis B7 (ambos procedentes de MG), B8 (procedentes de MG) e B9 (procedentes de SC). O B1 reuniu três isolados, procedentes de Minas Gerais, São Paulo e Roraima. *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* (33) foi classificada sozinha no grupo E4. Os isolados Xcc 08, 15, 16, 20 e 27 não produziram bandas no gel.

Quanto à digestão com a enzima *Spe*I, foram observados dezenove padrões de bandas diferentes, doze deles exclusivamente formados por isolados brasileiros e os mesmos sete padrões observados com *Xba*I para os isolados estrangeiros. O isolado Xcc 25 (RS), único representante do B11 de *Xba*I, apresentou o mesmo perfil B1 (MG, SP e RR) quando tratado com a enzima *Spe*I, enquanto que os dois isolados de MG do B7 de *Xba*I foram separados em grupos diferentes, como representantes únicos dos perfis B7 e B12 de *Spe*I. Também um isolado do DF (Xcc 23) passou do grupo B4 (*Xba*I) a ser o único isolado do grupo B13 (*Spe*I).

3.4 Inoculação em série diferenciadora

Durante a execução dos experimentos com diferenciadoras, alguns acontecimentos tiveram impacto negativo no trabalho como a dificuldade de cultivo para certos isolados (produção de inóculo), razão pela qual alguns deles não foram utilizados para inoculação em uma ou mais diferenciadoras (por exemplo, Xcc 01, 14, 30, 31, 32, 34, 35, 37, 38, e os isolados número 1075 e 1086 no terceiro experimento). Houve também, no Experimento 3, uma perda de plantas devido à queima pela radiação solar que incidiu fortemente durante um período sobre uma área de bancada na casa-de-vegetação. Considerando-se os resultados dos três experimentos com as plantas das séries diferenciadoras, houve variação ou indefinição nos resultados gerados, principalmente, por duas causas distintas: isolados não inoculados (como mencionado acima) e falta de repetibilidade nos resultados, provavelmente em função da mistura de isolados (contaminação cruzada). É provável que muitos dos dados coletados correspondam à realidade. Porém, devido à possibilidade de contaminação cruzada, não há como determinar quais são eles. Por essas razões, apenas a 3ª avaliação do Experimento 3 será apresentada, como exemplo do processo de avaliação (TABELAS 10, 11 e 12 e Fotos 3-30 – Apêndice A).

TABELA 10. Notas atribuídas às plantas diferenciadoras 'Wirosa' e 'Florida Broadleaf' como resultado da terceira avaliação do Experimento 3 em que foram inoculados os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nas três folhas mais jovens de duas plantas de cada diferenciadora. Quando presente, a nota '6' (representada por "/6") aparece sempre associada à nota da 'folha 3', embora tenha significado para a planta como um todo.

Isolado	Terceira avaliação do Experimento 3											
	'Wirosa'						'Florida Broadleaf'					
	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	
Xcc 01	NI ^a	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 02	5	5	5/6	5	5	5/6	5	4	1-1,5 ^b	2,5	1,5-2	1,5
Xcc 03	5	5	5/6	5	5	5/6	5	2,5	FMJ ^c	3	2,5-3	2
Xcc 04	5	4	3,5	5	5	3,5	2,5-3	3-3,5	1,5-2	1,5	1	1-1,5
Xcc 06	5	5	FMJ ^c	5	4	FMJ	5	2,5-3	2,5	2,5-3	2,5	2,5
Xcc 07	5	5	5	5	5	5/6	5	2,5-3	2-2,5	2,5	2-2,5	2,5
Xcc 08	5	5	5/6	5	5	5	4	2,5-3	2	5	2,5	2,5
Xcc 09	5	5	5/6	5	5	3/6	4	2	2	5	3-3,5	2
Xcc 10	4-5 ^b	4-5	4-5/6	4-5	4-5	4-5/6	5	2,5	2	5	5	2,5-3
Xcc 11	5	5	5/6	5	5	5/6	5	1,5-2	1,5	1,5	2,5	1,5-2
Xcc 12	5	5	5/6	5	5	5/6	4	1,5	1,5	FV	1 FV	1,5
Xcc 13	5	5	5/6	5	5	3-3,5	5	FV	2,5	2,5 FV	2-2,5	2
Xcc 14	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 15	5	5	4/6	5	5	5	5	3,5	2	1-3	3-3,5	1-1,5
Xcc 16	5	5	4/6	5	5	5/6	5	5	1,5	5	5	2,5
Xcc 17	5	5	5/6	5	5	5/6	4 FV	1 FV	FV	FV	FV	1,5

cont...

^a NI = 'não inoculada'.

^b Onde aparecem duas notas separadas por hífen (exemplo 1-1,5), indica que os sintomas observados estavam passando da primeira nota para a segunda.

^c FMJ = 'folha muito jovem', de tamanho insuficiente para a inoculação com o 'mouse tooth forceps'.

^d FV = 'folha velha'. Isso indica que os sintomas observados podem ter sido, pelo menos em parte, de senescência.

^e PM = 'planta morta' devido à ação da fitobactéria.

^f LG = 'lesão grande' em folha, em geral sem a presença de clorose ou escurecimento de vasos. Aparentemente, esse sintoma é devido à ação da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*.

TABELA 10. cont...

Isolado	Terceira avaliação do Experimento 3											
	'Wirosa'						'Florida Broadleaf'					
	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	
Xcc 18	5	5	4	5	5	5	4 FV	2,5 FV	1,5	4 FV	5	3
Xcc 19	5	5	5	5	5	5/6	5	3,5-4	3,5	3	2-2,5	2
Xcc 20	5	5	5/6	5	5	4/6	5	1,5	1,5	4 FV	2,5-3	2
Xcc 21	5	5	5/6	5	5	5/6	5	5	3	5	2,5	2
Xcc 22	5	5	4/6	5	4	4/6	5	2,5-3	2,5-3	5	3	2,5
Xcc 23	PM ^e			5	5	5/6	5	4	3	4	2	2
Xcc 24	5	5	4-5	5	5	3,5-4	5	5	1,5-2	5	5	3,5
Xcc 25	5	5	3-3,5	5	5	2,5-3	1,5	2-2,5	1	5	1 FV	1
Xcc 26	5	5	3,5-4	5	5	5/6	5	1	1-1,5	1,5-2	2	1,5-2
Xcc 27	5	5	3	5	5	4-5	4	2-2,5	2,5	5	3	2,5-3
Xcc 28	5	5	5/6	5	5	3	4 FV	3,5-4	2	4	5	1,5
Xcc 29	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 30	5	5	3	-	5	2,5-3	0	0-1	0	0	0	0
Xcc 31	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 32	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
33(Xca)	5	5	2,5/6	5	5	5/6	5	5	0-1	1,5	1,5	1,5
Xcc 34	5	5	3/6	5	5	2,5-3	1,5	1-1,5	0	0-1	0-1	0-1
Xcc 35	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 36	5	5	2,5-3	5	5	2,5-3	0	0	0	0	0-1	0
Xcc 37	5	5	3-3,5	5	5	FMJ	4	2-2,5	0	1	4	2,5
Xcc 38	5	5	3,5	5	5	3-3,5	5	0-1	0	4	1,5	2,5
Xcc 05	5	5	5/6	5	5	FMJ	5	3	1,5	4	2,5 FV	1,5
247	5	5	4-5	5	5	3-3,5	5	5	2	5	4	2-2,5
254	5	5	5/6	5	5	5/6	5	5	4	5	5	2-2,5
472	5	5	4/6	5	5	5	5	2,5	1,5	4	2	1,5-2
485	5	5	5/6	5	5	5	4	2,5	2	5	2-2,5	1,5
607	5	5	2,5/6	5	3,5	4/6	4	4	1,5-2	4	2,5-3	2
608	2,5	2,5	FMJ	5	3-3,5	2	1 FV	1	1-1,5	5	4	1,5
610	5	5	5/6	5	5	5/6	5	1,5-2	1-1,5	5	2,5	1-1,5
629	5	3-3,5	FMJ	PM	PM	PM	5	5	3-3,5	5	5	3
701	5	5	5	5	5	4	5	2 FV	2	5	2-2,5	2
729	5	5	5/6	5	5	5	2-5	2-2,5	1,5-2	2 FV	2,5	2
959	5	5	-	5	5	FMJ	5	3	3	5	5	4 FV
1046	5	5	5/6	5	5	5/6	5	5	1,5	2	1,5	1,5
1068	5	5	5/6	5	5	4/6	3-3,5	2,5	2	5	1,5	1
1075	5	5	3	5	5	5/6	5	1,5	1	4 FV	1,5-2	1,5-2
1077	5	5	5/6	5	5	5/6	5	4 FV	1,5	4 FV	2 FV	2
1079	5	5	5/6	5	5	4/6	5	1,5	2,5	5	5	4
1086	1 LG ^f	1 LG	1 LG	1 LG	1 LG	1 LG	5	3,5	3	2 FV	2,5	2,5
1087	5	5	5	4-5	4-5	4-5/6	5	4-5	3	5	5	3
1088	5	5	5	5	5	5/6	4	2	2	5	4	2-2,5
1155	5	5	5/6	5	5	5/6	5	5	3	5	3-3,5	2-2,5
1164	5	5	4/6	5	5	5	5	2	2	1-4	1,5	2
Contr.	5	5	3-3,5	5	5	3,5-4	5	0	0	FV	5	0

TABELA 11. Notas atribuídas às plantas diferenciadoras 'Miracle' e 'Seven Top' como resultado da terceira avaliação do Experimento 3 em que foram inoculados os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nas três folhas mais jovens de duas plantas de cada diferenciadora. Quando presente, a nota '6' (representada por "/6") aparece sempre associada à nota da 'folha 3', embora tenha significado para a planta como um todo.

Isolado	Terceira avaliação do Experimento 3											
	'Miracle'						'Seven Top'					
	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	
Xcc 01	NI ^a	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 02	5	5	5/6	5	5	5/6	5	1	1	5	1,5	1
Xcc 03	5	5	5/6	5	5	5/6	1,5	1,5	1	2	1,5-2 ^b	1-1,5
Xcc 04	3	2-2,5 ^b	1,5-2	2,5	2	1,5-2	FV ^c	1-1,5	1,5	1,5	1,5	1
Xcc 06	5	5	5	5	5	5	1,5	2	1	1,5	1	1
Xcc 07	5	5	5/6	5	5	5/6	5	3	2,5	5	3	2,5
Xcc 08	5	5	5/6	5	5	5/6	2,5	2-2,5	2	5	5	3-3,5/6
Xcc 09	5	5	5/6	5	5	5/6	FV	2,5	1	1 FV	1	1
Xcc 10	5	5	4-5/6	5	5	5/6	5	5	3,5/6	5	5	3,5-4
Xcc 11	2,5	1,5	1,5	2	2	1	1,5	1,5	1	5	5	2,5
Xcc 12	5	5	5/6	5	5	4	FV	2	1,5	5	1,5-2	1,5
Xcc 13	5	5	5/6	5	5	5/6	1,5-2	1,5-2	1	5	2	1,5
Xcc 14	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 15	5	5	5/6	5	5	5/6	5	3,5	3	5	5	FV
Xcc 16	5	5	5/6	5	5	5/6	5	3	3	FV	FV	3
Xcc 17	5	5	5/6	5	5	5/6	5	5	4	5	5	5
Xcc 18	5	5	5/6	5	5	5/6	FV	2,5-3	3	FV	2	1,5
Xcc 19	5	5	5/6	5	5	5/6	1-1,5	1-1,5	1	1	1	1,5
Xcc 20	5	5	5	5	5	5/6	5	3	3	5	4	3,5
Xcc 21	5	5	5	5	5	5	5	5	3,5/6	5	4	4
Xcc 22	5	5	5	5	5	5	5	4	3,5-4	4-5	4-5	4-5
Xcc 23	5	5	5/6	5	5	5/6	5	5	5	3,5	4	4
Xcc 24	5	5	5/6	5	5	5/6	FV	2	1,5	FV	2,5	2
Xcc 25	5	5	4	5	5	3,5/6	1	1	1,5	FV	1,5	1
Xcc 26	5	5	5	5	5	5	FV	1,5	1	FV	1,5	1,5
Xcc 27	5	4	4	5	5	5/6	FV	2	1-1,5	1	1	1
Xcc 28	3	2,5	3-3,5	5	3,5	2-2,5	2,5	2	1,5	FV	2	2
Xcc 29	2	1,5-2	2	2,5-3	1,5	2,5	2-2,5	2	1,5	FV	2	2
Xcc 30	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 31	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 32	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
33(Xca)	1	1	0-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Xcc 34	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 35	2	1,5	2,5-3	2,5	2	1-1,5	5	5	1 PM ^d	5	4	2,5
Xcc 36	5	5	3-3,5	5	3,5	3	5	FV	1,5	2	1,5-2	1,5
Xcc 37	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 38	4	2,5	2	1,5	1,5-2	1,5	1-1,5	1-1,5	1-1,5	FV	FV	2
Xcc 05	5	5	5	5	5	5	1-1,5	1-1,5	1	1	1	1
247	5	5	5/6	5	5	5	5	4	4	5	3-3,5	2,5
254	5	5	5/6	5	5	5/6	1,5	1	1	5	1	1
472	5	5	5	5	5	4	5	5	2	2,5	3	3,5
485	5	5	4	5	5	5/6	5	5	3-3,5	2,5-3	2,5	2
607	5	5	5/6	5	5	5/6	2	1,5	1	FV	1	1,5
608	5	5	5	5	4	3,5	2	2	1,5	2,5-3	2,5	2-2,5
610	5	5	5/6	5	5	5/6	1,5	1	1	1,5-2	1,5	1
629	2,5	2-2,5	1,5-2	Q ^e	1,5-2	1,5-2	4	4	4/6	5	5	5/6
701	5	5	5/6	5	5	5	1,5-2	1	1	2	1,5	1,5
729	5	5	5	5	5	5	FV	1	1,5	5	5	2,5
959	3,5	5	3,5	2,5	2,5	2,5-3	5	2	2,5	2,5	2-2,5	1,5

cont...

^a NI = 'não inoculada'.

^b Onde aparecem duas notas separadas por hífen (exemplo 1-1,5), indica que os sintomas observados estavam passando da primeira nota para a segunda.

^c FV = 'folha velha'. Isso indica que os sintomas observados podem ter sido, pelo menos em parte, de senescência.

^d PM = 'planta morta' devido à ação da fitobactéria.

^e Q = 'planta queimada' devido à ação de intensa radiação solar numa área de bancada da casa-de-vegetação.

TABELA 11. cont...

Isolado	Terceira avaliação do Experimento 3											
	'Miracle'						'Seven Top'					
	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	
1046	5	5	5/6	5	5	5/6	1,5	1,5	1,5	5	3	3
1068	5	4	1,5-2	3,5	2,5-3	2	FV	2,5	2-2,5	2	1	1
1075	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
1077	5	5	5/6	5	5	5/6	1,5	0-1	0-1	5	5	5/6
1079	5	5	5/6	5	5	5/6	FV	3,5 FV	4	5	5	5
1086	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
1087	5	5	5	5	3	3,5	3	4	3,5	5	5	3,5
1088	5	5	5	5	5	5	FV	1,5	1	5	1	1
1155	5	5	5/6	5	5	5/6	5	1,5	1	FV	2	2
1164	5	5	5	5	5	5/6	5	FV	1,5	5	5	2
Controle	5	5	5/6	3	5	5	0	0	0	0-1	0-1	0

TABELA 12. Notas atribuídas às plantas diferenciadoras PI 199947 e 'Just Right' como resultado da terceira avaliação do Experimento 3 em que foram inoculados os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nas três folhas mais jovens de duas plantas de cada diferenciadora. Quando presente, a nota '6' (representada por "/6") aparece sempre associada à nota da 'folha 3', embora tenha significado para a planta como um todo.

Isolado	Terceira avaliação do Experimento 3											
	PI 199947 (Lisa Earle)			PI 199947 (USDA)			'Just Right'					
	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	
Xcc 01	NI ^a	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 02	5	5	1,5	5	5	5	2-2,5 ^b	2,5	1,5-2	5	5	2,5-3
Xcc 03	5	5	1,5	5	5	5	1	2	1,5	1,5	1,5	2 LG ^c
Xcc 04	5	4 FV ^d	1,5	5	5	5	2,5	2,5	3,5	2,5	3	2,5
Xcc 06	5	5	1,5	5	5	5	2,5-3	2,5	2,5-3	3	4	2
Xcc 07	5	1,5	1	5	5	5	5	5	5/6	5	5	5/6
Xcc 08	5	5	2 LG ^c	5	5	5	5	5	5/6	5	5	5/6
Xcc 09	1	1	1	5	5	5	2,5	1,5-2	1,5	2	2,5	1,5-2
Xcc 10	5	5	3,5	5	5	5	PM ^e	PM	PM	PM	PM	PM
Xcc 11	1-1,5 ^b FV	1-1,5	1	5	5	5	2,5	4	3	5	3-3,5	2,5-3
Xcc 12	5	FV	1,5	5	5	5	1,5	1,5	1,5	2	2,5	1,5-2
Xcc 13	5	1,5	1	5	5	5	1	1	1	2	2	1,5-2
Xcc 14	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 15	5	FV	1,5	5	5	5	5	5	5/6	5	5	5/6
Xcc 16	1	1	1	5	5	5	2	2	2-2,5	5	5	2,5
Xcc 17	5	1,5-2	1	5	5	5/6	5	5	5/6	5	5	5/6
Xcc 18	1	1	1	5	5	5	1	1	2	1	2	2
Xcc 19	5	2-2,5 FV	2-2,5 FV	5	5	5	2,5	2	1,5-2	3	2-2,5	2-2,5
Xcc 20	5	1,5	1	5	5	5	5	5	5/6	PM	PM	PM
Xcc 21	5	1,5	1	5	5	5	5	5	5/6	5	5	5/6
Xcc 22	1,5-2	1-1,5	1	5	5	5	PM	PM	PM	5	5	5/6
Xcc 23	5	5	2	5	5	5	PM	PM	PM	PM	PM	PM
Xcc 24	5	5	2	5	5	5	2	2	1,5-2	2,5	2	2
Xcc 25	1	1	1	5	5	5	1	1,5	1,5	5	1	1
Xcc 26	5	1,5	1	5	5	5	1,5	1,5	1,5	1,5	2	2-2,5
Xcc 27	5	4	3	5	5	5	1,5	2	1	1-1,5	2,5	1,5

cont...

^a NI = 'não inoculada'.

^b Onde aparecem duas notas separadas por hífen (exemplo 1-1,5), indica que os sintomas observados estavam passando da primeira nota para a segunda.

^c LG = 'lesão grande' em folha, em geral sem a presença de clorose ou escurecimento de vasos. Aparentemente, esse sintoma é devido à ação da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*.

^d FV = 'folha velha'. Isso indica que os sintomas observados podem ter sido, pelo menos em parte, de senescência.

^e PM = 'planta morta' devido à ação da fitobactéria.

^f Q = 'planta queimada' devido à ação de intensa radiação solar numa área de bancada da casa-de-vegetação.

TABELA 12. cont...

Isolado	Terceira avaliação do Experimento 3											
	PI 199947 (Lisa Earle)			PI 199947 (USDA)			'Just Right'					
	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3	folha1	folha2	folha3
Xcc 28	1	1,5	1	5	5	5	5	5	5/6	5	5	5/6
Xcc 29	1	1	1	5	5	3,5-4	3	2,5-3	3	3-3,5	3-3,5	3
Xcc 30	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 31	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 32	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
33(Xca)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 34	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 35	5	1	1	5	5	5	3,5	3	3,5	3	3,5-4	3
Xcc 36	FV	1-1,5	1	5	5	5	1	1	1	1-1,5	1	1-1,5
Xcc 37	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 38	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Xcc 05	5	1,5-2 FV	1,5	5	5	5	2,5	2,5	2	2	1,5	1,5-2
247	5	FV	1	5	5	5	1,5	2,5	2	1,5	1,5	1,5
254	1,5-2	1	1	5	5	5/6	1,5	1,5	1,5-2	1,5	2	1-1,5
472	5	5	1,5	5	5	5	5	3-3,5	2-2,5	2,5	2	2
485	5	1,5	1	5	5	5	2-2,5	2	2	5	1,5 FV	1,5
607	5	4 FV	1,5	5	5	5/6	1,5	1,5	1	1,5	1-1,5	1,5
608	1	1	1	5	5	5	1	1	1	1	1	1
610	5	5	1	5	5	5	1,5	2	1,5-2	1-1,5	1,5	1,5
629	5	5	5/6	5	5	5	5	5	5/6	5	5	5/6
701	5	1,5 FV	1	5	5	5	2	2,5	2	1,5	2-2,5	1,5-2
729	5	1,5	1,5	5	5	5	2	2	1,5	1,5	1,5	1,5
959	5	5	3	5	5	5	1,5	1,5-2	1	2	1,5-2	1
1046	1,5	1	1	5	5	5	2	1,5-2	1,5-2	Q ^f	Q	Q
1068	5	5	3	5	5	5/6	5	4	3	2	2,5	2
1075	5	5	5	5	5	5/6	1,5	2	1	1,5-2	1,5	2
1077	5	1,5 FV	1	5	5	5	1,5	1,5	2	2,5	2,5-3	2
1079	1,5	1-1,5	1	5	5	5	5	5	5/6	5	5	5/6
1086	2 LG	1 LG	1 LG	5	5	3-3,5	1,5 LG	1 LG	1 LG	2 LG	2 LG	2 LG
1087	5	5	5	5	5	5	5	5	5/6	5	5	5/6
1088	5	1,5 FV	1,5	5	5	5	2-2,5	2	2	2	2-2,5	1,5-2
1155	FV	1	1	5	5	5	2	1,5-2	2	2,5	1,5-2	2
1164	1,5 FV	1	1	5	5	5	2	1,5-2	1,5-2	1,5-2	1,5-2	1,5-2
Controle	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0

Os sintomas mais comuns, sozinhos ou em conjunto, em maior ou menor grau, foram: clorose, escurecimento de nervuras, anasarca, lesões necróticas, perda de turgidez do limbo foliar, apodrecimento de pedúnculos e caule, seca de folhas sem clorose, necrose de extensas áreas do painel foliar. Devido à alta temperatura e, principalmente, à alta umidade dentro da casa-de-vegetação, foi possível observar também sinais do patógeno, com a exsudação de pus bacteriano em algumas plantas de 'Just Right' já na segunda avaliação do terceiro experimento (Fotos 19, 20 e 22 - Apêndice A).

Plantas inoculadas com o isolado 33 (Xca) apresentaram, na maioria dos casos, apenas lesões localizadas em folhas, mas em algumas situações, observou-se também uma certa clorose e escurecimento de nervuras. O isolado 1086, recebido com a identificação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, apresentou padrão de lesões semelhante ao produzido pelo isolado 33.

Foi possível observar uma variação do nível de doença nas plantas, sendo que algumas não foram afetadas pelo patógeno enquanto que outras morreram em decorrência da infecção sistêmica. Muitas vezes, observou-se que a reação de resistência ocorria com maior frequência nas folhas mais jovens. Durante o período de avaliação, foi observado que as folhas inoculadas e

com sintomas da doença, inclusive escurecimento de nervuras, de algumas diferenciadoras (ex. PI 199947) sofriram abscisão sem que infecção sistêmica no caule fosse visualizada. Um fragmento do local de inserção de uma folha doente recém desprendida foi retirado e, numa lâmina, imerso em uma gota de água, coberto com uma lamínula e, ao microscópio de luz, foi possível observar a exsudação bacteriana. Após a queda das folhas afetadas, as plantas permaneceram sem qualquer sintoma de podridão negra por no mínimo dois meses, quando foram descartadas.

4. DISCUSSÃO

4.1 Utilização de substratos (Biolog™)

O fato de 100% dos isolados estudados terem sido identificados pelo menos ao nível de gênero como *Xanthomonas* condiz com os resultados de Massomo *et al.* (2003), na Tanzânia (África), embora a identificação como espécie *X. campestris* tenha sido maior no presente trabalho (89%) do que naquele realizado no país africano. Observou-se uma uniformidade maior nos resultados brasileiros para patovar, com 77% dos isolados nacionais identificados como *X. campestris* pv. *campestris*, do que o encontrado pelos autores acima citados (47% dos isolados identificados como sendo patovar *campestris*). Devido à diferença de área do Brasil e da Tanzânia, com extensão territorial de 8.514.204,8 km² e 939.470 km² respectivamente, e também ao fato dos isolados brasileiros serem procedentes de diferentes regiões, era esperado que a variabilidade de *X. campestris* pv. *campestris* fosse maior em território brasileiro do que em território tanzaniano, pois áreas extensas de terra geralmente apresentam-se divididas em sub-regiões com características ambientais e de cultivo diferentes e as variações nas populações de fitopatógenos podem surgir como consequência de suas adaptações às condições de cada sub-região. Mas isso não foi observado e uma possível explicação para esse fato é que menor número de isolados foi utilizado no presente trabalho em comparação com o grupo africano, o que pode ter influenciado a uniformidade do resultado.

A espécie *Xanthomonas campestris* possui seis patovares que infectam brássicas: *aberrans*, *armoraciae*, *barbarae*, *campestris*, *incanae* e *raphani*. Considerando-se apenas os isolados brasileiros, 23% não foram identificados como *X. campestris* pv. *campestris*, sendo que 19% o foram como *X. campestris* pv. *raphani*, valor considerável quando se parte do princípio que todos esses isolados tenham sido corretamente identificados como *X. campestris* pv. *campestris* desde seu isolamento, quer este tenha acontecido no início deste trabalho ou em períodos anteriores a ele. Segundo Bin *et al.* (2005), a identificação baseada na utilização de substratos é insuficiente para a diferenciação de isolados como patovar ou abaixo deste. De fato, a classificação em patovares diz respeito à infecção em gama de hospedeiros. O patovar *raphani* é causador de manchas foliares e, assim como o patovar *campestris*, causa infecção sistêmica na planta hospedeira. Vicente *et al.* (2001) classificaram o patótipo NCPPB 1946 de *X. campestris* pv. *raphani*, e também o patótipo de *X. campestris* pv. *aberrans*, como raça patogênica 5 de *X. campestris* pv. *campestris*. Diante disso, constata-se a necessidade de uma revisão dos patovares de *X. campestris* que infectam brássicas, pois a classificação atual não tem se mostrado muito bem estabelecida e pode comprometer o grau de confiabilidade da diagnose.

Chama a atenção o fato de nenhum dos isolados ter sido identificado como *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*, nem mesmo o isolado 33 que produziu sintomas típicos de mancha foliar causados por essa bactéria em brássicas. A explicação para tal situação pode ser encontrada na lista de microrganismos Gram-negativos constantes do banco de dados do sistema Biolog, (Biolog, 2006). Nesta lista oficial da Biolog Inc., não figuram os patovares *aberrans*,

armoraciae, *barbarae* e *incanae*, todos de *X. campestris* e que infectam brássicas. Logo, seria impossível que o sistema conseguisse identificar algum deles.

No entanto, a probabilidade de que, independente do sistema utilizado, não se alcance uma alta taxa de identificação correta é maior para espécies genômica e fenotipicamente heterogêneas (Holmes *et al.*, 1994). Quando Klinger *et al.* (1992) submeteram 41 isolados da ATCC à análise de utilização de substratos, 98% foram corretamente identificados ao nível de gênero e 76%, com alguma segurança, ao nível de espécie. O restante foi identificado erroneamente ou não recebeu identificação alguma. Considerando-se a complexidade dos patossistemas *X. campestris* pvs.-brássicas, é provável que haja uma sobreposição genômica entre os diferentes patovares e isso pode ter contribuído para elevar as chances de uma identificação equivocada. Diante disso e em concordância com Klinger *et al.* (1992) e Verniere *et al.* (1993), deve-se ter cautela no uso do Biolog para identificação de fitobactérias. Recomenda-se que os resultados produzidos por meio desta técnica, antes de serem publicados, sejam analisados em comparação com os de outras, dentre elas a inoculação em plantas hospedeiras, principalmente quando a identificação estiver sendo feita para patovar.

Alguns isolados deste estudo, embora tenham sido obtidos de brássicas com sintomas de podridão negra, foram identificados como *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, entre eles o isolado brasileiro Xcc 01 de Roraima. Anteriormente, em um estudo conduzido por Verniere *et al.* (1993), um isolado de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* submetido ao sistema Biolog já havia sido identificado como *X. axonopodis* pv. *citri*. Quando há um grande número de espécies no banco de dados de um sistema, mesmo uma boa quantidade de testes disponíveis pode não ser o suficiente para discriminar a todos adequadamente e a subdivisão da base de dados em um número de bases menores poderia aumentar a possibilidade de acerto (Holmes *et al.*, 1994). Assim como esses autores, conclui-se que, em serviço de referência, é melhor que os isolados permaneçam como não-identificados ao invés de serem incorretamente identificados, pois isso pode ter reflexos em atividades comerciais e medidas quarentenárias.

Mesmo considerando-se que erros na identificação são passíveis de ocorrer, seria necessário obter mais isolados da Região Norte do Brasil e submetê-los aos mesmos testes para se afirmar que a distância geográfica é responsável por torná-los suficientemente diferente dos outros isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *campestris*, a ponto de classificá-los como uma espécie diferente. A não ser nesse caso (Xcc 01), não foi encontrada relação aparente entre a identificação dos isolados brasileiros em diferentes espécies e patovares e sua origem geográfica (Estados) ou espécie hospedeira, resultado similar ao obtido por Verniere *et al.* (1993) quando estudaram isolados associados ao cancro bacteriano A em citros, cujos perfis metabólicos não apresentaram ligação com a origem, hospedeiro ou ano de isolamento.

Quanto aos índices de similaridade (IS), valores ≥ 0.500 são considerados suficientes para uma identificação considerada confiável ao nível de gênero ou espécie (Holmes *et al.*, 1994; Massomo *et al.*, 2003). Os IS para os isolados brasileiros ficaram sempre acima desse valor (0.54 a 0.85), mas atingiram o limite no caso do isolado Xcc 32, proveniente de Trindade e Tobago. Os isolados Xcc 28 (ATCC 33913) e Xcc 29 (LMG 528), culturas representantes do isolado tipo de *X.*

campestris pv. *campestris* e usados como forma de verificar a repetibilidade espacial do teste, foram ambos identificados como *X. campestris* pv. *campestris* com probabilidade de identificação correta de 99% e índices de similaridade 0.74 e 0.78 respectivamente. Nenhum dos dois isolados recebeu uma segunda opção de identificação. Embora os resultados tenham sido similares, pelo fato de representarem o isolado tipo desse patovar era esperado que a probabilidade de serem identificados como *X. campestris* pv. *campestris* fosse de 100%, como aconteceu para outros 15 isolados testados (Xcc 06, Xcc 07, Xcc 08 entre outros) (TABELA 4).

Como é característico do gênero *Xanthomonas* e já havia sido observado para outros isolados brasileiros (Wruck, 2001), nenhum dos isolados deste estudo foi capaz de utilizar asparagina como única fonte de carbono. A identificação das fontes de carbono utilizadas por determinado microrganismo é importante no desenvolvimento de meios seletivos, como no caso de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (Norman & Alvarez, 1989). Wruck (2001) avaliou trinta e três isolados de *X. campestris* pv. *campestris* quanto à capacidade de crescimento em arabinose, frutose, galactose, glicose, manose, sacarose e trealose, além de outros testes bioquímicos tradicionais. Segundo a autora, a maioria dos isolados, embora não a sua totalidade, foi capaz de crescer em todos os sete substratos. Diferentemente, nenhum dos isolados brasileiros ou estrangeiros utilizados no presente trabalho conseguiu catabolizar a arabinose (TABELA 13A e 13B), apontando para uma diversidade metabólica de *X. campestris* pv. *campestris*. Segundo Peters *et al.* (2004), *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* também é considerada uma fitobactéria heterogênea com relação ao uso de determinadas fontes de carbono.

Interessante foi o fato de quase todos os isolados de *X. campestris* pv. *campestris* (TABELA 1) submetidos ao sistema Biolog utilizarem o Glicerol (designação H11 - TABELA 13A e 13B), reagente usado como crioprotetor no meio utilizado para preservação dos isolados em ultracongelador a -80°C. Porém, não se corre o risco de perda da viabilidade do isolado por esgotamento de nutrientes no meio devido à multiplicação excessiva do patógeno, uma vez que não há possibilidade de crescimento dessa fitobactéria sob temperatura tão baixa.

Houve três isolados brasileiros que não utilizaram Sacarose, além de dois, também brasileiros, que produziram resultado indefinido. Esse açúcar é um dos reagentes presentes na composição do meio 523, de Kado & Heskett (1970), o qual foi desenvolvido com o objetivo de ser um meio seletivo para o isolamento de fitobactérias de diversos gêneros, entre eles *Xanthomonas*. Embora o meio 523 seja, geralmente, eficiente para a manutenção de *X. campestris* pv. *campestris*, esse resultado pode explicar algumas dificuldades observadas quanto ao crescimento de certos isolados dessa fitobactéria com a finalidade de produção de inóculo para os Experimentos com plantas da série diferenciadora realizados neste trabalho. Portanto, seria interessante que a sacarose fosse substituída, por exemplo, por glicose, açúcar utilizado por todos os isolados brasileiros e estrangeiros deste estudo (TABELA 13A).

Por meio do sistema Biolog, pode-se tentar identificar fontes de carbono para serem usadas como marcadores metabólicos, como no caso do estudo conduzido por Verniere *et al.* (1993) em que 40 dos 43 isolados de *X. axonopodis* pv. *citrumelo*, agente da mancha bacteriana dos citros, utilizaram Tween 40, quando comparados com isolados de *X. axonopodis* pv. *citri*, os

quais não utilizaram esse substrato. Bin *et al.* (2005), ao tentarem elucidar a relação entre *X. axonopodis* pv. *poinsettiicola* e três isolados causadores de mancha foliar em poinsetia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch, cujo nome comum é 'bico-de-papagaio'), encontraram resultados similares da utilização de fontes de carbono, com diferenças na utilização de ácido fórmico e β -metil-D-glicosídeo (Bin *et al.*, 2005). Embora todos os 11 isolados estrangeiros (Xcc 28 a Xcc 38 da TABELA 1) tenham utilizado tanto a Dextrina quanto a Sacarose, esses dois açúcares não podem ser usados como marcadores para diferenciá-los dos isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *campestris*, uma vez que muitos isolados nacionais, embora não todos, também foram capazes de catabolizar os dois açúcares.

Cinco isolados brasileiros (Xcc 02, 12, 14, 25 e 26) e dois estrangeiros (33 e Xcc 34) diferiram dos demais por serem capazes de utilizar D-Alanina e foram identificados como *X. campestris* pv. *raphani*. Mesmo que esses patovares sejam relacionados geneticamente (Vauterin *et al.*, 1995) e compartilhem alguns dos seus hospedeiros (Bradbury, 1986), é questionável o fato de que uma mudança de um patovar para outro possa ocorrer baseada apenas na diferença de utilização de uma única fonte de carbono, pois, como discutido anteriormente, a identificação de um patovar é função dos resultados da inoculação na gama de hospedeiros.

4.2 Análise de ácidos graxos

Tanto os isolados brasileiros Xcc 01 a Xcc 27 utilizados neste estudo quanto os isolados da Tanzânia analisados por Massomo *et al.* (2003) tiveram 100% de identificação correta quanto ao gênero *Xanthomonas*. A análise de ácidos graxos identificou ainda 87% dos isolados brasileiros como *Xanthomonas campestris*, valor aquém do esperado por se tratar de identificação somente como espécie e não em nível infraespecífico. Outros 11% foram identificados como *X. axonopodis*, correspondendo àqueles identificados como patovar *zinniae*. Uma vez que esse patovar não se encaixa oficialmente na espécie *X. axonopodis* e como discutido anteriormente, foi feita uma alteração na nomenclatura em concordância com a lista oficial de nomes de fitobactérias publicada pela Sociedade Internacional de Patologia de Plantas (ISPP, 2006). Feita essa alteração na nomenclatura, 99% passaram a ser identificados como espécie *X. campestris*. A explicação para essa falha no banco de dados do sistema (MIS, Sherlock TSBA50 versão 5.0) parece estar relacionada ao fato de muitos patovares de *X. campestris* terem sido reclassificados por Vauterin *et al.* (1995) como patovares do *X. axonopodis*, muito embora esses autores não tenham utilizado isolados de *X. campestris* pv. *zinniae* naquele estudo.

Segundo Sahin *et al.* (2003), *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* causa manchas foliares em *Zinnia elegans*, mas como não é um patógeno muito estudado, sua gama de hospedeiros ainda não foi bem definida. Os mesmos autores, ao compararem os perfis dessa fitobactéria fornecidos pela análise de ácidos graxos com os de *X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. hortorum* pv. *vitians*, constataram que eles se apresentavam similares. Esses resultados os levaram a concluir que a análise de ácidos graxos não é uma boa ferramenta para a identificação de isolados de *X. campestris* pv. *zinniae* ao nível de espécie ou patovar, pois não

conseguiu diferenciá-los das espécies ou patovares acima mencionados. Isso parece se aplicar em parte ao presente trabalho, já que alguns isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram identificados como sendo patovar *zinniae*. Daniels *et al.*, citados por Bradbury (1986), observaram que esses dois patovares, ao serem inoculados em caule de plântulas de *Zinnia*, causaram sintomas de podridão negra, ou seja, pode realmente haver semelhanças entre eles em alguns aspectos e isso deve ser analisado em estudos futuros.

A maioria dos isolados foi identificada, em primeira opção, como *X. campestris* pv. *raphani* (46%), *X. campestris* pv. *campestris* (30%) e *X. campestris* pv. *armoraciae* (11%) (TABELA 6), somando 87% do total, o que reforça a tese de proximidade genética entre os patovares de *X. campestris* que infectam brássicas. Esses resultados são similares aos encontrados por Massomo *et al.* (2003) ao utilizar a análise de ácidos graxos para confirmação da identidade de isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, dos quais 43% foram identificados como *X. campestris* pv. *campestris*, 34% como *X. campestris* pv. *armoraciae* e 21% como *X. campestris* pv. *raphani*, perfazendo 98% do total. Como discutido no item anterior sobre a utilização de substratos (sistema Biolog), os resultados da análise de ácidos graxos também apontam para a necessidade de estudos mais abrangentes com os patovares de *X. campestris* que infectam brássicas visando reavaliar essa classificação. No caso do isolado Xcc 01 (proveniente de planta de couve-flor com sintomas de podridão negra), observando-se os resultados do Biolog e os da análise dos ácidos graxos, verifica-se que ele havia sido identificado como *X. axonopodis* pv. *malvacearum* no primeiro caso e como *X. campestris* pv. *campestris* pela segunda técnica. Ainda comparando-se essas duas técnicas, 27% dos isolados brasileiros de 5 Estados (Xcc 03, 04, 07, 11, 17, 18 e 21) foram identificados como *X. campestris* pv. *campestris* em ambos os casos, enquanto que o patovar *raphani* foi selecionado em 15% dos casos (Xcc 02, 12, 25 e 26). Porém, 58% dos isolados brasileiros (Xcc 01, 06, 08, 09, 10, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 24 e 27) tiveram resultados conflitantes ao se comparar os dois testes.

Segundo Barak & Gilbertson (2003), o perfil de ácidos graxos indicou que isolados de *X. campestris* pv. *vitians* pertenciam realmente à espécie *X. campestris*, mas não os identificou consistentemente como sendo o patovar *vitians*, nem revelou a existência de grupos distintos entre eles. O dendrograma gerado com os resultados da análise de ácidos graxos permitiu separar os isolados em 6 Grupos. O patovar *campestris* foi uma identificação presente em alguns isolados dos grupos II, III e V; o patovar *raphani* em isolados dos grupos II, III e VI; e o patovar *armoraciae* somente no grupo V, composto em sua totalidade por isolados brasileiros. O patovar *zinniae* apareceu nos grupos I e IV. Nos grupos formados por seis ou mais isolados, somente o Grupo IV não teve nenhum isolado identificado como *X. campestris* pv. *campestris*. É interessante notar que em nenhum dos casos houve agrupamento de isolados identificados como *X. campestris* pv. *raphani* e *X. campestris* pv. *armoraciae*, o que pode ser um indício que de esses patovares sejam menos relacionados entre si do que com *X. campestris* pv. *campestris*. Os Grupos I e VI tiveram baixa representatividade (formados somente por um e dois isolados respectivamente). Nos Grupos II, III e IV, cada um com seis isolados ou mais, não houve separação por país de origem. Timms-Wilson *et al.* (2001), estudando isolados de *Ralstonia solanacearum* por meio dessa técnica

também não conseguiram discriminá-los quanto à sua provável origem geográfica. No entanto, o Grupo V (oito isolados, 22% do total) teve somente representantes brasileiros.

Os isolados Xcc 28 e Xcc 29 receberam a mesma identificação até a terceira opção (ID #1 a ID #3), embora com índices de similaridade diferentes. Mas foram identificados em primeiro lugar como *X. campestris* pv. *raphani* e em segundo como *X. campestris* pv. *campestris*, o que não condiz com o fato de serem o isolado tipo deste último patovar. No entanto, os índices de similaridade da ID #1 (0.692 e 0.762) foram muito próximos aos da ID #2 (0.628 e 0.715) neste caso. Barak & Gilbertson (2003) usaram como referência da acurácia desse método um índice de similaridade (IS) médio de 95% encontrado em três análises da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*. Peters *et al.* (2004), estudando a fitobactéria *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (causadora da mancha foliar em crucíferas), observaram que 7 de 9 isolados australianos, bem como 4 de 5 isolados dessa mesma bactérias provenientes de outros países foram corretamente identificados, com índices de similaridade variando de 0.777 a 0.971 para isolados da Austrália. Mesmo assim, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *syringae* e *P. syringae* pv. *glycinea* foram identificações que repetidamente ocorreram na segunda colocação, com índices de similaridade próximos à primeira identificação (*P. syringae* pv. *maculicola*). No presente trabalho, nenhum dos isolados estudados apresentou IS acima de 0.900 (valor máximo de IS verificado na identificação do isolado Xcc 14).

Segundo Welch (1991), a análise de ácidos graxos utilizando a cromatografia gasosa é, em conjunto com técnicas mais convencionais, uma ferramenta poderosa na identificação de microrganismos. Contudo, dois pontos principais reforçam a necessidade de se escolher mais de uma técnica quando se pretende identificar uma fitobactéria; o primeiro é o fato do sistema Biolog e da análise de ácidos graxos, ambos utilizados na identificação de bactérias, terem produzido resultados diferentes, como ocorreu para muitos dos isolados utilizados neste estudo. O segundo diz respeito à identificação de patovares, espécies e até gêneros com características distintas do observado na prática como no caso de *X. campestris* pv. *zinniae*, identificação sugerida, por exemplo, para os isolados Xcc 08, Xcc 16 e Xcc 27, provenientes de plantas de brássicas com sintomas de podridão negra, embora não existam estudos consistentes mostrando que *X. campestris* pv. *zinniae* infecte brássicas. No caso de *X. axonopodis* pv. *citri*, Sun *et al.* (2004) consideraram que o método mais simples e mais confiável para se distinguir dois isolados encontrados em citros, *Xac-A** e *Xac-A^w*, foi testar sua patogenicidade em plantas de “grapefruit” (Sun *et al.*, 2004). A designação *Xac-A** e *Xac-A^w* para esses dois isolados coloca as características genéticas como superiores, uma vez que ‘*Xac*’ se refere a *X. axonopodis* pv. *citri*, mas reconhece também as diferenças patogências dentro desse grupo de organismos geneticamente similares ao utilizar ‘*’ e ‘^w’, o que é apropriado uma vez que ambos têm gama de hospedeiros que se assemelha mais à de *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* do que à de *X. axonopodis* pv. *citri* (Sun *et al.*, 2004). Já para o isolado Xcc 38, que produziu sintomas de podridão negra em brássicas, foi identificado como *Stenotrophomonas maltophilia*. Nesse caso, uma ressalva deve ser feita já que, segundo Looney (2005), citando Gillian *et al.* (2003), em 1961 essa bactéria foi designada *Pseudomonas maltophilia* com base em características do flagelo e, em 1983, foi

proposto o novo nome *Xanthomonas maltophilia* por causa da homologia do rRNA. Finalmente em 1993, ela foi transferida para o recém-formado gênero *Stenotrophomonas* devido a inconsistências com o gênero *Xanthomonas*. Portanto, constata-se que a identificação de fitobactérias (principalmente ao nível de patovar), além dos métodos bioquímicos e moleculares, deve apresentar também testes de patogenicidade, pois a observação dos sintomas e a gama de hospedeiros são informações fundamentais nesse processo.

4.3 Eletroforese de campo pulsado

Uma das características da eletroforese de campo pulsado é mostrar a alta diversidade entre isolados semelhantes, quando esta se faz presente. Logo, a formação de cinco (*Xba*I) ou sete (*Spe*I) grupos com apenas um isolado era esperada. Alguns isolados (*Xcc* 08, 15, 16, 20 e 27) não produziram bandas no gel e as razões pelas quais isso ocorreu são desconhecidas, mas tal resultado já tinha sido observado anteriormente para isolados de outras fitobactérias (Minsavage Jr., G.V.*, *comunicação pessoal*).

Zhang & Geider (1997), ao estudarem a fitobactéria *Erwinia amylovora* (fogo bacteriano das Pomáceas), observaram diferenças pequenas porém significativas quando os isolados foram submetidos à ação da enzima *Xba*I e três grupos foram formados baseados nos padrões de bandas sendo um da parte central da Europa e Nova Zelândia, outro da região oriental do Mediterrâneo e um terceiro grupo com isolados da França. Embora não tenha sido possível uma separação de todos, mas apenas de alguns dos isolados brasileiros de *X. campestris* pv. *campestris* (TABELA 1) em grupos por região geográfica de origem, nenhum dos padrões de bandas observados para os isolados nacionais correspondeu aos padrões gerados com os isolados estrangeiros, tanto para a enzima *Xba*I quanto para a *Spe*I.

Coplin *et al.* (2002) observaram que isolados de *Pantoea stewartii* de origens geográficas e épocas de isolamento diferentes apresentaram padrões de restrição divergentes, com exceção de dois isolados, os quais foram agrupados juntos quando digeridos com a enzima *Xba*I. No presente estudo, porém, houve formação de padrões semelhantes no gel tanto para isolados originários do mesmo Estado quanto de Estados diferentes. Exemplos disso são os seis isolados brasileiros que foram agrupados aos pares, cada par de mesma procedência (Estado), em três perfis diferentes: B7 (ambos originários de MG), o B8 (também originários de MG) e o B9 (ambos originários de SC) com a enzima *Xba*I. Com a enzima *Spe*I, os dois isolados do perfil B7 foram separados, enquanto B8 e B9 permaneceram como em *Xba*I.

Já o perfil B1 de *Xba*I agrupou três isolados procedentes de Estados distintos (Minas Gerais, São Paulo e Roraima) e um quarto (Rio Grande do Sul) para compor o B1 de *Spe*I, sendo que este último havia sido classificado como único representante do perfil B11 de *Xba*I. Neste caso, devido à distância de Minas Gerais e São Paulo para o Rio Grande do Sul e, principalmente, para, poderia-se pensar na possibilidade de tais isolados serem clonais e sua disseminação ter sido feita por meio de sementes, uma vez que *X. campestris* pv. *campestris* é capaz de sobreviver

* Minsavage Jr., G.V. Departamento de Patologia de Plantas, Universidade da Flórida.

nesse tipo de material propagativo. Entretanto, isso não pôde ser confirmado pela falta de informações, por exemplo, sobre a origem das sementes utilizadas nos cultivos que resultaram em plantas doentes (das quais foi feito o isolamento) e de testes que, em primeiro lugar, evidenciassem a presença do patógeno nessas sementes. Por outro lado, em contraposição à hipótese de disseminação via sementes neste caso, está o fato dos resultados do Biolog e da análise de ácidos graxos terem identificado os isolados de MG, SP e RS de maneira semelhante (*X. campestris* pv. *raphani* nos dois testes), enquanto que o isolado de RR foi identificado como *X. axonopodis* pv. *malvacearum* pelo sistema Biolog e como *X. campestris* pv. *campestris* pela análise de ácidos graxos, ou seja, diferente dos outros três isolados.

A maioria dos isolados que formaram os diferentes grupos quando submetidos à ação da enzima *Xba*I também permaneceram nos mesmos grupos quando se utilizou a enzima *Spe*I, em concordância com os resultados de Sun *et al.* (2004), nos quais isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* A (*Xac*-A), *Xac*-A^w e *Xac*-A* formaram grupos distintos entre si, mas com padrões de agrupamento semelhantes quando digeridos tanto com a enzima *Xba*I quanto com a *Spe*I. Davis *et al.* (1997) submeteram 218 isolados de *Xanthomonas albilineans* (escaldadura das folhas de cana-de-açúcar) à eletroforese de campo pulsado utilizando a enzima de restrição *Spe*I e obtiveram como resultado a formação de 54 diferentes padrões de bandas, os quais formaram 8 grupos distintos. Um desses grupos foi identificado como provável responsável por epidemias da doença em determinadas áreas de cultivo (Davis *et al.*, 1997).

Em comparação feita entre os resultados da análise de ácidos graxos e os da eletroforese de campo pulsado do presente trabalho, não foi observada uma correspondência direta dos agrupamentos de ambos, mas em alguns casos, essa associação foi possível. O Grupo V da análise de ácidos graxos englobou todos os isolados do Perfil B4 da eletroforese, composto de 4 (*Xba*I) ou 5 isolados (*Spe*I), além de outros pertencentes a mais grupos, mas todos eles brasileiros. De maneira semelhante, entre os isolados encaixados no Grupo IV (ácidos graxos) estão aqueles cinco para os quais, por razões desconhecidas, não foi possível obter um perfil na eletroforese e 2 (de um total de 3) isolados do Perfil E1. Já o Grupo III (ácidos graxos) foi o mais heterogêneo, com a presença dos dois isolados representantes do Perfil B2 e os dois do Perfil B9, ambos com a mesma formação para *Xba*I e *Spe*I, além de um isolado de quatro outros perfis. No Grupo II (ácidos graxos), foram agrupados todos os isolados do Perfil B1 em número de 3 (*Xba*I) ou 4 isolados (*Spe*I). Contudo, para verificar se essa associação pode ser feita de maneira mais consistente no caso de *X. campestris* pv. *campestris*, com a formação de grupos bem determinados visando estudos epidemiológicos, um número maior e mais representativo de isolados dessa fitobactéria deve ser submetidos à eletroforese de campo pulsado.

4.4 Inoculação em série diferenciadora

A ambigüidade nos resultados entre os experimentos pode ter algumas explicações. No experimento 1, uma grande quantidade de plantas (222 vasos, com uma planta por vaso) foi colocada na bancada da casa-de-vegetação e, à medida em que foram crescendo, ficaram muito

próximas umas das outras, aumentando as chances de mistura de isolados. Essa hipótese é sustentada pelo fato de várias plantas usadas como controle (inoculadas apenas com solução salina) apresentarem sintomas da doença, o que também poderia ser devido a escolha inadequada da solução de desinfecção ou do tempo insuficiente de imersão do “mouse tooth forceps” nela. A opção pela inoculação usando este instrumento teve como referência a metodologia de Vicente *et al.* (2001), testando-se também as mesmas variedades diferenciadoras. Porém, devido aos problemas de aplicabilidade encontrados com essa metodologia no presente trabalho, recomenda-se a escolha de outro método de inoculação para o patossistema *X. campestris* pv. *campestris*-brássicas como, por exemplo, a inoculação por atomização, mais semelhante ao que ocorre naturalmente no ambiente. As plantas que mais apresentaram problemas foram PI 199947, ‘Florida Broadleaf’ e ‘Just Right’, com mais de 60% dos resultados comprometidos. As sementes da linhagem PI 199947 foram obtidas de duas fontes diferentes, e as reações dos isolados se mostraram diferentes em cada uma, nos três experimentos, o que gera dúvidas sobre: i) a estabilidade desse genótipo e sua utilização em uma série diferenciadora; ii) a identificação correta do material fornecido para os testes.

Kamoun *et al.* (1992) recomendam que as inoculações em hospedeiros sejam feitas simultaneamente, com o objetivo de se minimizar efeitos ambientais. Porém, devido ao observado no experimento 1, optou-se por fragmentar o experimento 2 em duas etapas, utilizando-se 50% das plantas em cada fase, com o objetivo de se reduzir as chances de contaminação cruzada, uma vez que o espaço em casa-de-vegetação era limitado. A solução concentrada de hipoclorito de sódio para lavagem do “mouse tooth forceps” foi substituída por uma de etanol a 70% (bactericida). As plantas do controle 1 (C1) foram submetidas ao procedimento antes de qualquer isolado e mantidas nos bordos da bancada, enquanto que as do controle 2 (C2) foram inoculadas após o isolado Xcc 25 e conservadas entre as outras plantas. Com essas alterações, as plantas do C1 não apresentaram qualquer sintoma de podridão negra nas 3 avaliações. No C2, as plantas ‘Wirosa’, ‘Just Right’, ‘Seven Top’ e ‘Miracle’ apresentaram diversos sintomas da doença, a ‘Florida Broadleaf’ apenas em alguns pontos e as plantas PI 199947 sem sintomas de podridão negra.

Diante disso, o experimento 3 foi dividido em 3 partes, ou seja, as plantas da série diferenciadora foram testadas duas a duas no tempo visando reduzir ainda mais o contato entre plantas. Nesse experimento foi realizada uma repetição no espaço (que consistiu de duas plantas por isolado em vasos distintos) e foram utilizados os 59 isolados listados na TABELA 1. As regas foram feitas no solo dos vasos, com o objetivo de se evitar respingos que poderiam aumentar as chances de mistura de isolados. Mesmo assim, os controles de ‘Wirosa’, PI 199947 e ‘Miracle’ apresentaram sintomas da doença durante os períodos de avaliação. Sabe-se que *X. campestris* pv. *campestris* tem grande capacidade de dispersão. Kuan *et al.* (1986) coletaram aerossóis dessa bactéria a 10 metros de um campo com podridão negra. Se a umidade relativa do ambiente estiver baixa, a disseminação (Cook *et al.*, 1952) e a penetração da bactéria pode ser dificultada. Todos os três experimentos foram conduzidos sob altas temperaturas e umidade relativa elevada na casa-de-vegetação, o que pode ter contribuído para a contaminação cruzada. Com isso, para

experimentos em ambiente protegido, recomenda-se utilizar um número de plantas que permita um afastamento entre elas suficiente para reduzir as chances de mistura de isolados. Além disso, deve haver também cuidado nas regas para se evitar que respingos atinjam plantas vizinhas, especialmente ao se considerar que a intensa multiplicação do patógeno em plantas hospedeiras (inóculo) e a cerosidade das folhas de brássicas contribuem para a disseminação da fitobactéria.

Embora não se possa afirmar que a desinfestação do “mouse tooth forceps” tenha sido falha, já que a mistura de isolados pode ter ocorrido após a inoculação, é provável que um tempo de imersão de dois minutos dessa ferramenta em etanol a 70% seja suficiente para uma desinfestação eficiente, quando se optar por esse método de inoculação. Quando possível, pela facilidade e pelo menor risco de mistura de isolados durante essa etapa, é preferível que se utilize instrumentos descartáveis nas inoculações, um para cada isolado, como no caso da inoculação de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* feita por Wruck (2001) em diversas variedades de brássicas, na qual foram utilizando palitos de dentes descartáveis para perfurar as nervuras do limbo foliar das plantas.

Quanto aos sintomas observados, constatou-se, em alguns casos, a presença de seca em áreas extensas do limbo foliar, semelhante a uma queima e mesmo na ausência de clorose, o que é atípico para podridão negra. Esses resultados assemelham-se aos encontrados por Alvarez *et al.* (1994) ao verificarem que isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, inoculados via pulverização, causaram sintomas de queima em repolho, caracterizados por necrose e colapso súbito de grandes áreas do mesófilo foliar, geralmente seguido de escurecimento de nervuras. Para eles, essa reação de queima é semelhante à que ocorre quando um patógeno é infiltrado no mesófilo de uma planta não hospedeira (reação de hipersensibilidade), com a diferença de que os sintomas demoraram de uma a duas semanas para surgir. Segundo esses mesmos autores, a resposta da planta pareceu ser mais devido à invasão do mesófilo do que do xilema. Esse subgrupo de isolados causadores de queima foi considerado uma variante patogênica que deveria ser classificada em um novo patovar, mas como os padrões para a nomeação de um patovar em *Xanthomonas campestris* que infectam brássicas são controversos, decidiu-se que não seria adequado fazê-lo naquele momento (Alvarez *et al.*, 1994).

A partir da observação dos sintomas, Alvarez *et al.* (1994) relatam que um índice de severidade da doença pode ser calculado para isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, visando classificá-los como avirulentos, pouco virulentos, moderadamente virulentos e altamente virulentos. Devido à suspeita de contaminação cruzada, esse índice não foi calculado no presente estudo, pois poderia não ser representativo da realidade. Os autores acima mencionados não encontraram diferenças entre isolados de *X. campestris* pv. *raphani* e *X. campestris* pv. *armoraciae* quanto aos sintomas observados quando da inoculação em brássicas, nem diferenças sorológicas ou genéticas, indicando que esses patovares são sinônimos. Porém, embora ambos causem manchas foliares, *X. campestris* pv. *armoraciae* não é sistêmica, mesmo quando nervuras são atingidas pelas lesões das folhas, enquanto que *X. campestris* pv. *raphani* é capaz de provocar escurecimento de pecíolos e caule, chegando a matar plantas jovens em poucos dias (Bradbury, 1986). Além disso, a gama de hospedeiros é relativamente diferente. Embora as

identificações resultantes do perfil metabólico e da análise de ácidos tenham apontado para a existência de *X. campestris* pv. *raphani* entre os isolados estudados neste trabalho, nenhum deles havia sido previamente identificado como tal e sim como sendo patovar *campestris*, nem se utilizou oficialmente qualquer isolado de coleção oficial pertencente ao patovar *raphani* e somente um isolado do patovar *armoraciae*. Logo, não foi possível fazer inferências quanto à afirmação desses patovares serem idênticos, como mencionado acima.

A partir da inoculação, observou-se que as folhas mais jovens apresentavam, mais freqüentemente, uma reação de resistência. Independentemente da idade, verificou-se para algumas diferenciadoras (por exemplo PI 199947), durante o período de avaliação, abscisão de folhas sintomáticas, inclusive com escurecimento de nervuras, mas sem que uma infecção sistêmica no caule fosse visualizada. Um fragmento do local de inserção de uma folha doente recém desprendida foi retirado e, numa lâmina, imerso em uma gota de água, coberto com uma lamínula e, ao microscópio de luz, foi possível observar a exsudação bacteriana. Embora mais inspeções desse tipo necessitem ser feitas, essa observação leva a crer que a bactéria se estabeleceu em todo o pecíolo da folha e chegou até o caule, a partir de onde, não conseguiu avançar para o interior desses tecidos, uma vez que, quando isso ocorreu, após a queda das folhas afetadas, as plantas permaneceram por até dois meses com aspecto aparentemente normal, ou seja, sem qualquer sintoma de podridão negra. Já Ignatov *et al.* (1999), após injetarem uma suspensão de *X. campestris* pv. *campestris* no pecíolo de folhas de brássicas, o mais próximo possível do caule, observaram que sintomas de podridão negra levaram de sete dias até 4 meses para surgir quando as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação sob temperaturas variando de 12 a 35°C. Kamoun *et al.* (1992), ao inocular, utilizando agulhas, plântulas de sete a dez dias de idade com *X. campestris* pv. *campestris* constatou que, cerca de 16 horas após esse procedimento, a resposta de hipersensibilidade vascular foi observada na forma de lesão necrótica com aproximadamente 5 mm no hipocótilo, ao redor do ponto de inoculação. Esse tipo de reação foi denominada “Vascular Hypersensitive Response” (VHR ou Reação de Hipersensibilidade Vascular). Segundo esses autores, no caso de interações compatíveis, não houve resposta no local de inoculação, mas os sintomas da doença começaram a aparecer nas folhas dois dias após a inoculação. Já Ignatov *et al.* (1999) observaram que plântulas com resistência em folha foram suscetíveis quando inoculadas no caule, ao passo que o oposto também ocorreu, quando plantas adultas mostraram-se suscetíveis nas folhas e resistentes no caule. Eles propuseram a denominação *Rs* (“Resistance in stem”) para o gene (considerado dominante) presente na couve-chinesa ‘SR1’. A resistência à podridão negra em caule é raça não-específica, estável a altas temperaturas e expressa nos primeiros estágios de crescimento da planta (Ignatov *et al.*, 1999).

O melhoramento de plantas visando resistência à podridão negra deve ser feito com o prévio conhecimento dos diferentes tipos de resistência existentes. Uma reação de resistência rápida à presença de *X. campestris* pv. *campestris* poderia prevenir que a bactéria se espalhasse pela planta (Ignatov *et al.*, 1999). Entender variabilidade de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* em relação à Reação de Hipersensibilidade Vascular é interessante uma vez que essa fitobactéria é sistêmica e pode atingir as sementes formadas, quando é o caso de produção desse

material propagativo. Deve-se considerar que a VHR tenha importância também na epidemiologia dessa doença, que é policíclica ou multicíclica, ou seja, na qual “o patógeno pode completar mais de um ciclo da doença por ano e, em cada ciclo, a quantidade de inóculo é multiplicada muitas vezes” (Agrios, 2005). Com a VHR, a folha pode evidenciar muitos sintomas do ataque do patógeno mas, ao que parece, este não consegue se estabelecer no sistema vascular. Nesses casos, pode haver abscisão da folha doente como parte dos mecanismos de defesa da planta infectada. Em contato com a diversa flora microbiana do solo e sob condições ambientais favoráveis, o material vegetal pode ser mais rapidamente degradado, reduzindo assim o período de sobrevivência do patógeno, o que se traduz em redução de inóculo. Outros experimentos devem ser realizados visando elucidar os efeitos da VHR nos patossistema *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*-brássicas.

O estudo de variabilidade restrito a apenas alguns isolados pode não representar de maneira acurada um organismo como ele ocorre na natureza (Crosse, 1966; Schroth, 1968, citados por Barak & Gilbertson, 2003). Um número relativamente pequeno de isolados poderia ser utilizado para estudos epidemiológicos e taxonômicos, bem como para a identificação de cultivares com resistência a determinada doença, desde que ficasse comprovada, por meio de diversas técnicas, a sua representatividade, como ocorreu com *X. axonopodis* pv. *vitians* (= *X. campestris* pv. *vitians*) (Barak & Gilbertson, 2003). Além da análise de ácidos graxos, os autores utilizaram outras técnicas (rep-PCR, seqüenciamento da região ITS1 do rRNA, RFLP e análise parcial de plasmídeos) em isolados de *X. axonopodis* pv. *vitians* provenientes de campos de cultivo na Califórnia. Os resultados sugeriram que tais isolados fazem parte de um grupo não-clonal, mas relativamente homogêneo, o que foi atribuído ao fato da gama de hospedeiros desse patógeno ser restrita. Apesar do pequeno número de isolados utilizados no presente trabalho, o observado *in planta* (desde ausência de sintomas até a morte do vegetal) indica a existência de variabilidade na virulência dos isolados inoculados.

Isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foram separados em raças por Kamoun *et al.* (1992). A série diferenciadora utilizada foi ligeiramente modificada por Vicente *et al.* (2001), com a introdução de novas espécies. Em ambos os casos, as plantas componentes da série diferenciadora eram de espécies diferentes como pode ser observado na TABELA 2. Isso é devido à hipótese de que genes de resistência diferentes devem estar presentes ou ter origem nos genomas A, B e C das diferentes espécies (Vicente *et al.*, 2001). Porém, a utilização de espécies distintas contraria o conceito estabelecido de raças fisiológicas, pelo qual as diferenças entre os isolados devem ser observadas em variedades da mesma espécie vegetal. Como essa série diferenciadora tem sido utilizada em alguns trabalhos em nível mundial, ora com a formação sugerida por Kamoun *et al.* (1992) ou ora com a sugerida por Vicente *et al.* (2001), ela poderia servir como referencial inicial de classificação dos isolados, mas o ideal seria que se conseguisse o desenvolvimento de uma série diferenciadora envolvendo apenas uma das espécies de brássicas, por exemplo, *Brassica oleracea*, que possui muitas variedades cultivadas.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Isolados brasileiros e estrangeiros de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* foram estudados em sua variabilidade fenotípica e genotípica por meio da análise metabólica (sistema Biolog™), análise de ácidos graxos, eletroforese de campo pulsado e inoculação em série diferenciadora.

Os resultados mostram que a identificação de uma mesma fitobactéria pode variar dependendo da técnica aplicada. Isso foi verificado para o sistema Biolog e para a análise de ácidos graxos, por meio dos quais 58% dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* estudados receberam identificação comparativa conflitante. Nestas duas técnicas, os resultados tiveram, em geral, maior precisão quanto menor a especificidade do nível de classificação, ou seja, a porcentagem de identificações corretas para gênero foi maior do que para espécie e desta, maior do que para patovar. Esses sistemas fornecem uma quantidade considerável de informações a respeito de características fenotípicas dos isolados e, por isso, podem ser usados como ferramentas auxiliares para confirmação da identidade de fitobactérias, sempre acompanhados dos testes de patogenicidade em gama de hospedeiros, principalmente quando se tratar de identificação ao nível de patovar. Porém, nem o sistema Biolog nem a análise de ácidos graxos devem ser empregados isoladamente nesse processo, pois corre-se o risco de uma identificação equivocada e esta pode ter reflexos em atividades comerciais e quarentenárias. Visando reduzir as chances de erros na confirmação da identidade de uma fitobactéria, recomenda-se que haja uma subdivisão, por exemplo, por espécie hospedeira, nas bases de dados desses sistemas de identificação.

Quando submetidos ao sistema Biolog, nenhum dos isolados foi identificado como sendo *X. campestris* pv. *armoraciae*, nem mesmo o isolado 33, recebido como tal. A explicação direta está no fato de que esse patovar não consta no banco de dados do sistema Biolog. Vários isolados não foram identificados como esperado, ou seja, *X. campestris* pv. *campestris*, e sim como *X. campestris* pv. *raphani* (por meio do sistema Biolog e da análise de ácidos graxos) e como *X. campestris* pv. *armoraciae* (análise de ácidos graxos). Todos estes patovares infectam brássicas e isso pode ter acontecido devido a alguma possível sobreposição genômica entre eles. Os resultados obtidos dão suporte à idéia da necessidade de uma reavaliação dos patovares de *X. campestris* que infectam plantas da família *Brassicaceae*, com o intuito de se desenvolver uma classificação mais consistente.

Pela análise de ácidos graxos, foi possível separar os isolados estudados em seis grupos, sendo que isolados identificados como *X. campestris* pv. *raphani* e como *X. campestris* pv. *armoraciae* não se fizeram presentes nos mesmos grupos, mas estiveram, separadamente, congregados com *X. campestris* pv. *campestris*, o que pode ser um indício de que os patovares *raphani* e *armoraciae* são mais relacionados com o patovar *campestris* do que entre si.

Conforme esperado, a variabilidade genética dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* foi observada por meio dos padrões de bandas produzidos pela eletroforese de campo pulsado, uma vez que esta técnica tem como característica mostrar a diversidade entre organismos

relacionados. Cada padrão de bandas formado representou um grupo com um ou mais isolados e, dessa forma, verificou-se que, independentemente da enzima de restrição utilizada (*Xba*I ou *Spe*I), nenhum dos isolados brasileiros teve perfil idêntico ao de qualquer isolado estrangeiro. Embora observado em alguns casos, não foi possível separar, de maneira consistente, os isolados nacionais por Estado de origem. Os resultados podem ter sido influenciados pelo pequeno número de isolados utilizados e uma possível movimentação deles entre Estados por meio de material propagativo infectado, hipótese que não pôde ser confirmada devido à indisponibilidade/inexistência de dados de testes com esse material e de informações sobre a procedência do mesmo.

Comparando-se os resultados da análise de ácidos graxos com os da eletroforese de campo pulsado, observou-se que não houve correspondência direta dos agrupamentos de ambos, mas em alguns casos, essa associação foi possível, como no caso do Grupo V da análise de ácidos graxos, que congregou somente isolados brasileiros e, dentre eles, todos aqueles do Perfil B4 da eletroforese. De maneira semelhante, entre os isolados encaixados no Grupo IV (de ácidos graxos) estão presentes todos aqueles que, por razões desconhecidas, não apresentaram perfil de bandas na eletroforese. Em estudos futuros, se um número maior de isolados de *X. campestris* pv. *campestris* for submetido à eletroforese de campo pulsado, é possível que se observe a formação de grupos melhor estabelecidos visando estudos epidemiológicos.

A inoculação nas séries diferenciadoras gerou dados conflitantes devido ao grande número de plantas em casa-de-vegetação, o que facilitou a mistura de isolados, além de possíveis falhas na identificação do material vegetal e na desinfestação ineficiente do “mouse tooth forceps”. Nos experimentos de inoculação de *X. campestris* pv. *campestris* em hospedeiros, recomenda-se que as plantas sejam distribuídas na casa-de-vegetação em espaço suficiente para não haver contato de qualquer tipo, seja entre folhas ou por meio de respingos entre vasos durante as regas. Quando possível, a ferramenta de inoculação utilizada deve ser descartável ou, no mínimo, única para cada isolado naquele procedimento. Dentre as dificuldades encontradas no experimento com plantas está também o cultivo de certos isolados de *X. campestris* pv. *campestris* para a produção de inóculo. Como os resultados do sistema Biolog mostraram que alguns deles não são capazes de utilizar sacarose, um dos reagentes do meio 523 (utilizado para este fim), recomenda-se que, nos casos em que tal problema for constatado, o açúcar do meio seja substituído. Neste caso, uma opção interessante seria a glicose, que foi utilizada por todos os isolados deste estudo.

Nas plantas suscetíveis, foram observados sintomas característicos de podridão negra bem como alguns atípicos dessa doença, por exemplo, a queima de folhas inoculadas, o que parece dar suporte à hipótese formulada por outros cientistas de que se trata de um novo patovar de *X. campestris*. Foi também observado o que se assemelha a uma Reação de Hipersensibilidade Vascular, onde as folhas sintomáticas sofreram abscisão e a bactéria, aparentemente, não conseguiu se estabelecer no sistema vascular do caule. Isso pode ter importância nos processos de melhoramento visando a resistência à podridão negra, principalmente quando o objetivo for a produção de sementes, e também na epidemiologia dessa doença policíclica, com conseqüente redução de inóculo.

Apesar do pequeno número de isolados utilizados no presente trabalho, o observado *in planta* (desde ausência de sintomas até a morte do vegetal) mostrou a existência de variabilidade na virulência dos isolados inoculados. Para estudos futuros, além de um número maior de isolados, seria ideal que se conseguisse o desenvolvimento de uma série diferenciadora envolvendo apenas uma das espécies de brássicas, por exemplo, *Brassica oleracea*, que possui muitas variedades cultivadas.

BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G.N. **Plant Pathology**. Elsevier Academic Press, California, USA. 5th edition, 922p., 2005.
- Alvarez, A.M., Lou, K. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. **Plant Disease**, 69 (12): 1082-1086, 1985.
- Alvarez, A.M.; Benedicti, A.A.; Mizumoto, C.Y.; Hunter, J.E.; Gabriel, D.W. Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. **Phytopathology**, 84 (12): 1449-1457, 1994.
- Amy, P.S., Haldeman, D.L., Ringelberg, D., Hall, D.H., Russel, C. Comparison of identification systems for classification of bacteria isolated from water and endolithic habitats within the deep subsurface. **Applied and Environmental Microbiology** 58(10): 3367-3373, 1992.
- Azevedo, S.S.; Mariano, R.L.R.; Michereff, S.J. Levantamento da intensidade da podridão negra e da alternariose do repolho no Agreste de Pernambuco e determinação do tamanho das amostras para sua quantificação. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, 26 (3): 299-306, 2000.
- Bain, D.C. Reaction of Brassica seedlings to blackrot. **Phytopathology**, 42: 497-500, 1952.
- Bain, D.C. Resistance of cabbage to blackrot. **Phytopathology**, 45: 35-37, 1955.
- Barak, J.D., Gilbertson, R.L. Genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leafspot of lettuce. **Phytopathology**, 93 (5): 596-603, 2003.
- Basim, E. (H.), Basim, H. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. **Turkish Journal of Biology**, 25: 405-418, 2001.
- Berg, T., Tesoriero, L., Hailstones, D.L. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. **Plant Pathology**, 54: 416-427, 2005.
- Bin, L., Guan-lin, X., Swings, J. Differentiation of xanthomonads causing the bacterial leaf spot of poinsettia in China from the pathotype strain of *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsettiicola*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE** 6B(6): 451-453, 2005.
- BIOLOG. GN2 Microplate™ - Gram Negative Identification Test Panel. [online] Disponível na Internet via [WWW.URL](http://www.biolog.com/pdf/GN2b_Brochure.pdf): [http:// www.biolog.com/pdf/GN2b_Brochure.pdf](http://www.biolog.com/pdf/GN2b_Brochure.pdf). Arquivo capturado em 18 de março de 2005.
- BIOLOG. RetroSpect™ Trending & Tracking Software. [online] Disponível na Internet via [WWW.URL](http://www.biolog.com/pdf/RetroSpectBrochure0305spc.pdf): [http:// www.biolog.com/pdf/RetroSpectBrochure0305spc.pdf](http://www.biolog.com/pdf/RetroSpectBrochure0305spc.pdf). Arquivo capturado em 26 de abril de 2005.
- BIOLOG. Identification Databases – 1,973 Species/Taxa. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: http://www.biolog.com/pdf/Database_Listing_ver_6.01.pdf. Arquivo capturado em 06 de fevereiro de 2006.
- Bradbury, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. CAB International, England. 332p., 1986.
- Bragard, C.; Singer, E.; Alizadeh, A.; Vauterin, L.; Maraite, H.; Swings, J. *Xanthomonas translucens* from small grains: diversity and phytopathological relevance. **Phytopathology**, 87 (11): 1111-1117, 1997.

- Bretschneider, K.E., Gonella, M.P., Robeson, D.J. A comparative light and electron microscopical study of compatible and incompatible interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and cabbage (*Brassica oleracea*). **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 34: 285-297, 1989.
- Brown, J.E., Lu, T.Y., Stevens, C., Khan, V.A., Lu, J.Y., Wilson, C.L., Collins, D.J., Wilson, M.A., Igwegbe, E.C.K., Chalutz, E., Droby, S. The effect of low dose ultraviolet light-C seed treatment on induced resistance in cabbage to black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). **Crop Protection**, 20: 873-883, 2001.
- Caldwell, D.R. **Microbial physiology and metabolism**. Star Publishing Company. 2nd Edition, 404p., 2000.
- Carrijo, I.V.; Rêgo, A.M. Doenças das brássicas. In: Zambolim, L.; Vale, F.X.R.; Costa, H. **Controle de doenças de plantas – hortaliças**. v1, 444p., 2000.
- 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**, 81 (4), 449-453, 1991.
- Ciafardini, G., Zullo, B.A. Antimicrobial activity of oil-mill waste water polyphenols on the phytopathogen *Xanthomonas campestris* spp. **Annals of Microbiology**, 53 (3): 283-290, 2003.
- Cook, A.A.; Walker, J.C.; Larson, R.H. Studies on disease cycle of black rot of cruciferes. **Phytopathology**, 42: 162-167, 1952.
- Coplin, D.L., Majerczak, D.R., Zhang, Y., Kim, W.-S., Jock, S., Geider, K. Identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by PCR and strain differentiation by PFGE. **Plant Disease**, 86 (3): 304-311, 2002.
- Costa, V.S.O., Mariano, R.L.R.; Michereff, S.J. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Estado de Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, 24 (2): 182-189, 2001.
- Cruz, C.M.V.; Ardales, E.Y.; Skinner, D.Z.; Talag, J.; Nelson, R.J.; Louws, F.J.; Leung, H.; Mew, T.W.; Leach, J.E. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. **Phytopathology**, 86 (12): 1352-1359, 1996.
- Cury, J. C. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. **Dissertação de Mestrado**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 84p., 2002.
- Dane, F., Shaw, J.J. Survival and persistence of bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on host and non-host plants in the field environment. **Journal of Applied Bacteriology** 80: 73-80, 1996.
- Davis, M.J., Rott, P., WArmuth, C.J., Chatenet, M., Baudin, P. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. **Phytopathology**, 87 (3): 316-324, 1997.
- Dickstein, E.R., Jones, J.B., Stead, D.E. Automate Techniques. In: Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. APS, St. Paul, USA. 3th edition, 373p., 2001.
- Egel, D.S., Graham, J.H., Stall, R.E. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. **Applied and Environmental Microbiology**, 57 (9): 2724-2730, 1991.

- Filgueira, F.A.R. Brassicáceas – couves e outras culturas (p.269-288) In: **Novo manual de olericultura**. Editora UFV, Viçosa. 402p., 2002.
- Galli, J.A.; Panizzi, R.C.; Sader, R.; Braz, L.T. Avaliação da qualidade sanitária de sementes de repolho e couve-flor com relação a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e resistência dos genótipos à podridão negra. *Summa Phytopathologica*, 24 (3): 334-338, 2001.
- Guo, H.; Dickson, M.H.; Hunter, J.E. *Brassica napus* sources of resistance to black rot in crucifers and inheritance of resistance. **HortScience**, 26 (12): 1545-1547, 1991.
- Henz, G.P.; Takatsu, A.; Reifschneider, F.J.B. Avaliação da virulência e variabilidade em isolados de *Xanthomonas campestris* patovar *campestris*. **Fitopatologia Brasileira**, 12 (4): 350-353, 1987.
- Holmes, B., Costas, M., Ganner, M., On, S.L.W., Stevens, M. Evaluation of Biolog system for identification of some gram-negative bacteria of clinical importance. **Journal of Clinical Microbiology** 32(8): 1970-1975, 1994.
- Ignatov, A.; Kuginuki, Y.; Hilda, K. Race-specific reaction of resistance to black rot in *Brassica oleracea*. **European Journal of Plant Pathology**, 104: 821-827, 1998.
- Ignatov, A., Kuginuki, Y., Hida, K. Vascular stem resistance to black rot in *Brassica oleracea*. **Canadian Journal of Botany** 77: 442-446, 1999.
- ISPP – International Society for Plant Pathology. Names of Plant Pathogenic Bacteria, 1864-1995 - *Xanthomonas bromi* – *Xylophilus*. [online] Disponível na Internet via [WWW.URL: http://www.isppweb.org/names_bacterial_xant.asp](http://www.isppweb.org/names_bacterial_xant.asp). Arquivo capturado em 19 de janeiro de 2006.
- Jaufeerally-Fakim, Y.; Autrey, J.C.; Daniels, M.J.; Dookun, A. Genetic polymorphism in *Xanthomonas albilineans* strain originating from 11 geographical locations, revealed by two DNA probes. **Letters in Applied Microbiology**, 30: 287-293, 2000.
- Kado, C.I.; Heskett, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, 60: 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**, 5: 22-23, 1992.
- King, G. Brassica: an opportunity to harvest the benefits from *Arabidopsis* research. In: Garnish – the official GARNet newsletter, 2nd edition, 2004.
- Klinger, J.M., Stowe, R.P., Obenhuber, D.C., Grove, T.O., Mishra, S.K., Pierson, D.L. Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. **Applied and Environmental Microbiology** 58(6): 2089-2092, 1992.
- Klisiewicz, J.M., Pound, G.S. Studies on control of black rot of crucifers by treating seeds with antibiotics. **Phytopathology** 51: 495-500, 1961.
- Kuan, T.-L., Minsavage, G.V., Schaad, N.W. Aerial dispersal of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from naturally infected *Brassica campestris*. **Plant Disease**, 70 (5): 409-413, 1986.
- Lagercrantz, U., Lydiate, D.J. Comparative genome mapping in Brassica. **Genetics**, 144: 1903-1910, 1996.
- Looney, W.J. Role of *Stenotrophomonas maltophilia* in hospital-acquired infection. **British Journal of Biomedical Science**, 62 (3): 145-154, 2005.

- Lopes, C.A.; Quezado-Soares, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças – diagnose e controle**. Brasília: Embrapa-CNPq. 70p., 1997.
- Maringoni, C.A. Doenças das crucíferas. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ed. Agron. Ceres, 3.ed. v.2., 1997.
- Massomo, S.M.S., Nielsen, H., Mabagala, R.B., Mansfeld-Giese, K., Hockenhull, J., Mortensen, C.N. Identification and characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* strains from Tanzania by pathogenicity testes, Biolog, rep-PCR and fatty acids methyl ester analysis. **European Journal of Plant Pathology** 109: 775-789, 2003.
- Maude, R.B. **Seedborne diseases and their control: principles and practice**. CAB International, Wallingford, UK, 1996.
- Miller, J.M., Rhoden, D.L. Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification. **Journal of Clinical Microbiology** 29(6): 1143-1147, 1991.
- Norman, D.; Alvarez, A. A rapid method for presumptive identification of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* and other xanthomonads. **Plant Disease** 73 (8): 654-658, 1989.
- Ochiai, H.; Horino, O.; Miyajima, K.; Kaku, H. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains from Sri Lanka. **Phytopathology**, 90 (4): 415-421, 2000.
- Peters, B.J., Ash, G.J., Cother, E.J., Hailstones, D.L., Noble, D.H., Urwin, N.A.R. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity. **Plant Pathology** 53: 73-79, 2004.
- Quezado-Duval, A.M., Leite Jr., R.P., Truffi, D., Carmargo, L.E.A. Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in Centra-West Brazil. **Plant Disease**, 88 (2): 157-161, 2004.
- Randhawa, P.S., Schaad, N.W. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. **Phytopathology**, 74 (3): 268-272, 1984.
- Raymundo, A.K.; Briones Jr., A.M.; Ardales, E.Y.; Perez, M.T.; Fernandez, L.C.; Leach, J.E.; Mew, T.W.; Ynalvez, M.A.; McLaren, C.G.; Nelson, R.J. Analysis of DNA polymorphism and virulence in Philippine strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Plant Disease**, 83 (5): 434-440, 1999.
- Restrepo, S.; Verdier, V. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. **Applied and Environmental Microbiology**, 63 (11): 4427-4434, 1997.
- Restrepo, S.; Duque, M.; Tohme, J.; Verdier, V. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Microbiology**, 145: 107-114, 1999.
- Restrepo, S.; Vélez, C.M.; Verdier, V. Measuring the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* within different fields in Colombia. **Phytopathology**, 90 (1): 683-690, 2000.
- Rodrigues Neto, J.; Malavolta Jr., V.A. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe Agropecuário**, 17 (183): 56-59, 1995.
- Romeiro, R.S. **Fundamentos da bacteriologia de plantas**. Viçosa, Imprensa Universitária, UFV. 50p., 1988.
- Romeiro, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, Imprensa Universitária, UFV. 283p., 1995.
- Romeiro, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV. 279p., 2001.

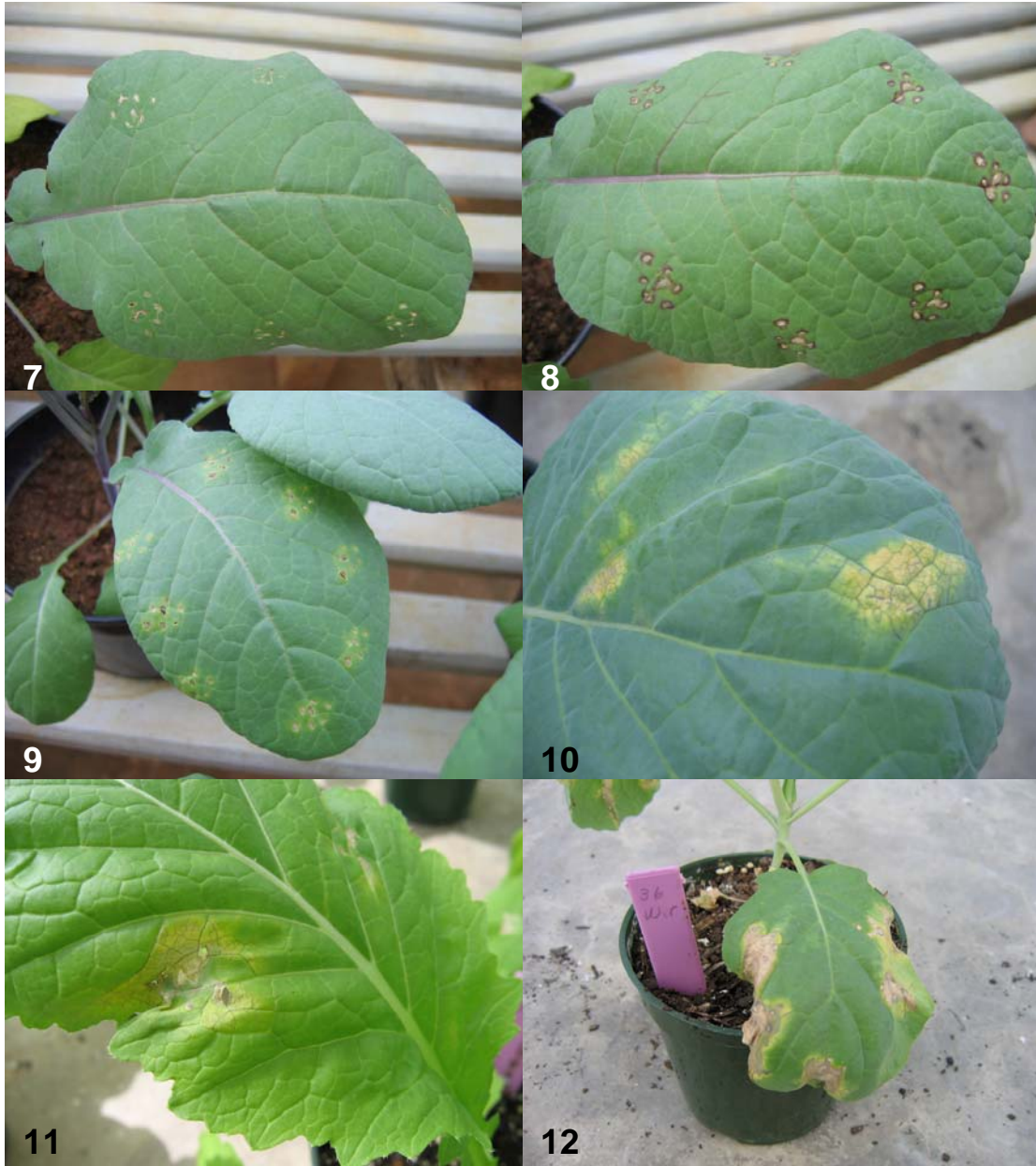
- Sahin, F.; Abbasi, P.A.; Ivey, M.L.L.; Zhang, J.; Miller, S.A. Diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* from lettuce. **Phytopathology**, 93 (1): 64-70, 2003a.
- Sahin, R., Kotan, R., Abbasi, P.A., Miller, S.A. Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* strains. **European Journal of Plant Pathology**, 109: 165-172, 2003b.
- Sasser, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. **Technical Note #101**, 2001.
- Schaad, N.W. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. **Plant Disease** 66 (10): 885-890, 1982.
- Schaad, N.W. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seeds. **Seed, Science and Technology**, 11: 573-578, 1983.
- Schaad, N.W. Correlation of laboratory assays for seedborne bacteria with disease development. **Seed, Science and Technology**, 11: 877-883, 1983.
- Schaad, N.W., Gabrielson, R.L., Mulanax, M.W. Hot acidified cupric acetate soaks for eradication of *Xanthomonas campestris* from crucifer seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, 39 (4): 803-807, 1980a.
- Schaad, N.M., Sitterly, W.R., Humaydan, H. Relationship of incidence of seed-borne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers in the field. **Plant Disease** 64: 91-92, 1980b.
- 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**, 90 (3): 208-213, 2000.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. APS, St. Paul, USA. 3th edition, 373p., 2001.
- Schultz, T., Gabrielson, L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Western Washington crucifer seed fields: occurrence and survival. **Phytopathology** 76 (12): 1306-1309, 1986.
- Schultz, T., Gabrielson, L., Olson, S. Control of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifer seed with slurry treatments of calcium hypochlorite. **Plant Disease**, 70 (11): 1027-1030, 1986.
- Sharma, S.L. Control of black rot of cauliflower by hot water seed treatment and field sprays with streptomycin. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology** 11 (1): 17-20, 1980.
- Shiomi, T. Black rot of cabbage seeds and its disinfection under a hot-air treatment. **JARQ**, 26 (1): 13-18, 1992.
- Stager, C.E., Davis, J.R. Automated systems for identification of microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, 5 (3): 302-327, 1992.
- Sulzinski, M. A. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pvs. *pelargonii* and *hederae* by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Phytopathology**, 149: 45-49, 2001.
- Sun, X., Stall, R.E., Jones, J.B., Cubero, J., Gottwald, T.R., Dixon, W.N., Schubert, T.S., Chaloux, P.H., Stromberg, V.K., Lacy, G.H., Sutton, B.D. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican Lime and alemow in South Florida. **Plant Disease** 88(11): 1179-1188, 2004.

- Taylor, J.D.; Conway, J.; Roberts, S.J.; Astley, D.; Vicente, J.G. Sources and origin of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* genomes. **Phytopathology**, 92: 105-111, 2002.
- Tebaldi, N.D.; Panizzi, R.C.; Lopes, C.A.; Sader, R. Variabilidade genética entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em brássicas. **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Recife, PE. **Resumo** n.079, 2002.
- Timms-Wilson, T.M., Bryant, K., Bailey, M.J. Strain characterization and 16S-23S probe development for differentiating geographically dispersed isolates of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. **Environmental Microbiology**, 3 (12): 785-797, 2001.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 45(3): 472-489, 1995.
- Verdier, V.; Restrepo, S.; Mosquera, G.; Duque, M.C.; Gerstl, A.; Laberry, R. Genetic and pathogenic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Venezuela. **Plant Pathology**, 47: 601-608, 1998.
- Verniere, C., Pruvost, O., Civerolo, E.L., Gambin, O., Jacquemoud-Collet, J.P., Luisetti, J. Evaluation of the Biolog substrate utilization system to identify and assess metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Applied and Environmental Microbiology** 59(1): 243-249, 1993.
- Vicente, J.G., Conway, J., Roberts, S.J., Taylor, J.D. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. **Phytopathology** 91(5): 492-499, 2001.
- Welch, D.F. Application of cellular fatty acid analysis. **Clinical Microbiology Reviews**, 4 (4): 422-438, 1991.
- Williams, P.H.; Staub, T.; Sutton, J.C. Inheritance of resistance in cabbage to black rot. **Phytopathology**, 62: 247-252, 1972.
- Williams, P.H. Black rot: a continuing. **Plant Disease**, 64 (8): 736-742, 1980.
- Wilson, E.E., Zeitoun, F.M., Fredrickson, D.L. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. **Phytopathology**, 57: 618-621, 1967.
- Wruck, D. S. M. Análise bioquímica, patogênica, sorológica e molecular de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Viçosa. 62p., 2001.
- Zhang, Y., Geider, K. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, 63 (11): 4421-4426, 1997.

Apêndice A



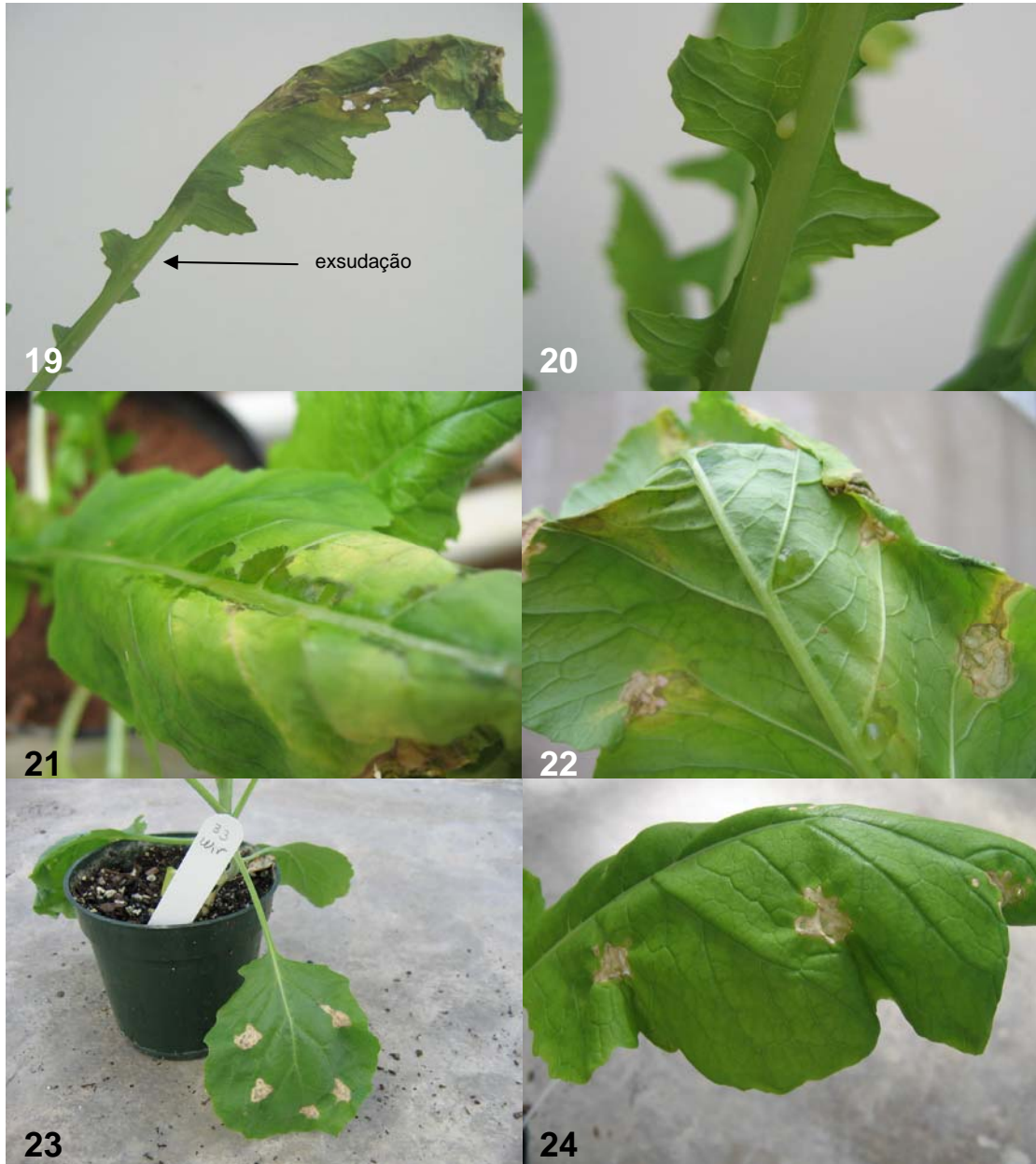
Fotos: 1) sintoma típico em “V”; 2) aspecto geral das diferenciadoras atrás para frente e da esquerda para direita: ‘Florida Broadleaf’, ‘Just Right’, ‘Miracle’, PI 199947, ‘Wirosa’ e ‘Seven Top’; 3) disposição das plantas em casa de vegetação; 4) inoculação usando o “mouse tooth forceps”; 5) folha de PI 199947 imediatamente após a inoculação; 6) folha de ‘Florida Broadleaf’ duas semanas após a inoculação (reação resistente).
Fotos: Maria Raquel Silva.



Fotos: 7) controle de planta PI 199947, três semanas após a inoculação; 8) reação de resistência em folha de planta PI 199947, três semanas após a inoculação; 9) clorose em estágio inicial; 10) sintomas típicos de podridão negra, clorose e escurecimento de nervuras, em folha não inoculada; 11) folha de 'Florida Broadleaf' com sintomas da doença; 12) sintomas da doença em 'Wirosa'. Fotos: Maria Raquel Silva.



Fotos: 13) aspecto inicial de queima; 14) queima em planta 'Wirosa'; 15) clorose, lesões e perda de turgidez em folha inoculada; 16) perda de turgidez e anasarca em folha não inoculada; 17) sintomas da doença em folha não inoculada de 'Seven Top'; 18) planta 'Just Right' com folhas não inoculadas apresentando sintomas da doença. Fotos: Maria Raquel Silva.



Fotos: 19) folha de 'Just Right' com exsudação de pus bacteriano no pecíolo; 20) em detalhe da foto 19, mostrando dois pontos de exsudação do pus bacteriano; 21) anasarca em folha de 'Just Right'; 22) sintomas da doença e exsudação de pus bacteriano em planta 'Just Right'; 23) lesões grandes em folha de 'Wirosa', produzidas pelo isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*; 24) detalhe das lesões produzidas por *X. campestris* pv. *armoraciae*. Fotos: Maria Raquel Silva.



Fotos: 25) lesão resultante da ação de *X. campestris* pv. *armoraciae*; 26) aspecto da queima de plantas PI 199947 por alta incidência de radiação solar; 27) planta 'Miracle' quase morta em decorrência da infecção por *X. campestris* pv. *campestris*, mas ainda apresentando as folhas cotiledonares e a primeira folha verdadeira (não inoculadas); 28) caule de planta 'Miracle' atingido por infecção sistêmica; 29) planta PI 199947, apresentando aspecto saudável, após a abscisão das folhas inoculadas; 30) ponto de inserção de uma folha inoculada, após a sua abscisão, de onde foi retirado um fragmento para observação da exsudação bacteriana em microscópio de luz. Esta planta manteve o aspecto saudável até o descarte. Fotos: Maria Raquel Silva.

Apêndice B

Composição dos meios de cultura utilizados nos processos de isolamento e preservação dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* deste estudo.

Meio YDC (“Yeast Dextrose Agar”) (Wilson et al., 1967)

	<u>por L</u>
Extrato de levedura	10.0 g
Dextrose (glicose)	20.0 g
Carbonato de cálcio	20.0 g
Ágar	15.0 g

Meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970)

	<u>por L</u>
Sacarose	10.0 g
Caseína (ácida hidrolisada)	8.0 g
Extrato de levedura	4.0 g
Ágar	15.0 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3 g*

* Dissolver separadamente em 50 mL de água e adicionar antes da autoclavagem.

Apêndice C

TABELA 13A. Resultados da utilização das fontes de carbono do sistema Biolog pelos isolados brasileiros de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Fonte de carbono (exceto A1)		Isolados brasileiros de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>																									
Designação	Nome	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
A1	Água	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	α -Ciclodextrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	Dextrina	+ ^b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	i ^c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A4	Glicogênio	+	+	i	i	-	+	-	+	-	i	+	+	+	-	+	-	+	+	i	i	-	-	+	+	+	+
A5	Tween 40	-	i	+	-	+	-	-	i	+	i	i	+	-	+	+	-	+	+	i	i	+	i	+	+	i	+
A6	Tween 80	-	i	+	-	+	-	-	+	+	-	i	+	-	-	i	-	+	+	i	+	+	i	+	i	-	+
A7	N-Acetil-D-galactosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A8	N-Acetil-D-Glucosamina	-	+	i	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A9	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A10	L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A11	D-Arabitól	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A12	Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B1	meso-Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	D-Frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B3	L-Fucose	-	i	+	i	+	+	+	i	i	i	i	+	-	-	i	i	+	+	i	+	i	i	i	i	+	i
B4	D-Galactose	-	+	+	i	+	+	+	+	+	+	i	+	+	+	+	i	+	+	+	+	+	+	+	i	+	+
B5	Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B6	α -D-Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B7	meso-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B8	α -D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B9	Lactulose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	i	+	+	i	+	+	+	+	i	+	+	+	+	+	+	+	+
B10	Maltose	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	i	+	+	+	+	+	+	+
B11	D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B12	D-Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C1	D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C2	β -Metil-D-Glucosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	D-Psicose	+	+	+	i	+	+	+	i	+	+	+	i	+	+	i	-	+	i	i	i	+	+	+	+	+	+

^a símbolo "-" indicam que não houve utilização do substrato (incolor).

^b símbolo "+" indicam que houve utilização do substrato (coloração púrpura).

^c letra "i" indica resultado indefinido, ou seja, com coloração presente, embora fraca.

cont...

TABELA 13A. cont...

Fonte de carbono		Isolados brasileiros de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>																									
Designação	Nome	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
C4	D-Rafinose	-	i	i	i	i	i	-	i	i	i	-	i	-	-	-	-	i	i	-	i	-	i	-	i	-	-
C5	L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7	Sacarose	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	i	+	+	+	+	i	+	+
C8	D-Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C9	Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	Metilpiruvato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C12	Monometilsuccinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D1	Ácido acético	-	+	+	i	+	+	+	i	+	i	+	+	+	+	+	-	+	i	i	i	+	+	+	i	+	+
D2	Ácido <i>cis</i> -Aconítico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D3	Ácido cítrico	-	i	-	+	+	-	+	+	i	+	i	+	-	-	+	i	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+
D4	Ácido fórmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D5	Ácido D-Galactônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D6	Ácido D-Galacturônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D7	Ácido D-Glucônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D8	Ácido D-Glucosamínico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D9	Ácido D-Glucurônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D10	Ácido α -Hidroxibutírico	-	i	-	i	-	-	-	-	-	-	i	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	i	-
D11	Ácido β -Hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D12	Ácido γ -Hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E1	Ácido ρ - Hidroxifenilacético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	Ácido Itacônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	i	-	-	-	-	-	-	-	i	i	-	-	-	-	-	-
E3	Ácido α -Cetobutírico	-	+	+	i	+	-	-	+	+	-	+	+	+	i	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
E4	Ácido α -Cetoglutarico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E5	Ácido α -Cetovalérico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E6	Ácido DL-Lático	+	i	i	i	-	-	-	i	-	-	-	i	-	-	-	-	-	i	i	i	i	-	-	-	i	-
E7	Ácido Malônico	-	+	-	i	+	+	-	i	+	i	+	+	+	-	+	-	+	+	i	i	+	+	+	i	+	+
E8	Ácido Propiônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	i	i	-	-	-	-	-	i	-	-	-	+	-	-	-	+
E9	Ácido Quínico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10	Ácido D-Sacárico	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E11	Ácido Sebáico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E12	Ácido Succínico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F1	Ácido Bromosuccínico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F2	Ácido Succinâmico	+	-	-	i	-	i	i	+	-	-	i	i	-	-	-	-	-	i	i	i	i	-	-	-	-	-
F3	Glucuronamida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F4	Alaninamida	i	+	-	-	-	-	-	-	-	i	+	+	+	-	i	i	i	-	-	-	-	-	-	-	+	+
F5	D-Alanina	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

cont...

TABELA 13A. cont...

Fonte de carbono		Isolados brasileiros de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>																									
Designação	Nome	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
F6	L-Alanina	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	i	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
F7	D-Alanilglicina	+	+	-	-	-	-	-	-	-	i	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
F8	L-Asparagina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9	Ácido L-Aspártico	-	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	i	-	-	-	-	i	i	-	-	-	-	-	i	-	-
F10	Ácido L-Glutâmico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F11	Ácido Glicil-L-Aspártico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F12	Ácido Glicil-L-Glutâmico	-	i	-	i	+	-	-	i	i	i	-	i	-	-	i	-	i	i	i	i	i	+	-	i	-	-
G1	L-Histidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2	Hidroxi-L-prolina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3	L-Leucina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4	L-Ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G5	L-Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G6	L-Prolina	-	-	-	i	+	+	-	i	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	i	-	-	+
G7	Ácido L-Piroglutâmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G8	D-Serina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G9	L-Serina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G10	L-Treonina	-	+	-	i	-	-	-	-	-	-	i	i	-	-	-	-	i	i	-	-	-	-	-	i	-	-
G11	D,L-Carnitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G12	Ácido γ -Aminobutírico-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1	Ácido Urocânico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2	Inosina	-	i	i	-	i	-	-	i	i	-	-	+	-	-	-	-	+	i	i	i	-	i	-	i	-	-
H3	Uridina	-	i	i	i	i	-	-	+	i	-	-	i	-	-	i	-	+	i	i	i	i	i	i	i	-	i
H4	Timidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5	Fenil etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	Putrescina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7	2-Aminoetanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H8	2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H9	Glicerol	+	+	+	i	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	i	+	+	+	+	+	+	+
H10	DL- α -Glicerolfosfato	-	i	-	i	-	-	-	i	-	-	-	i	-	-	-	-	i	-	-	i	-	-	-	i	-	-
H11	Glicose 1-fosfato	-	i	-	i	-	-	-	i	-	-	-	i	-	-	-	-	i	-	i	i	-	i	-	i	-	-
H12	Glcose 6-fosfato	-	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	i	-	-	-	-	i	-	-	i	-	-	-	i	-	-

TABELA 13B. Resultados da utilização das fontes de carbono do sistema Biolog pelos isolados estrangeiros de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Fontes de carbono (exceto A1)		Isolados brasileiros de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>										
Designação	Nome	28	29	30	31	32	33*	34	35	36	37	38
A1	Água	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	α -Ciclodextrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	Dextrina	+ ^b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A4	Glicogênio	i ^c	i	i	+	+	+	+	i	i	+	+
A5	Tween 40	i	i	+	i	+	i	i	-	i	-	i
A6	Tween 80	i	i	+	+	i	i	i	-	i	i	i
A7	N-Acetil-D-galactosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A8	N-Acetil-D-Glucosamina	+	+	+	i	+	+	+	+	+	i	+
A9	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A10	L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A11	D-Arabitól	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A12	Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B1	meso-Eritritol	-	-	-	i	-	i	-	-	-	-	-
B2	D-Frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B3	L-Fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	i	+
B4	D-Galactose	+	+	+	i	+	+	i	+	+	i	+
B5	Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B6	α -D-Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B7	meso-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B8	α -D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B9	Lactulose	-	-	+	+	+	+	+	-	i	+	+
B10	Maltose	-	i	-	i	+	+	+	-	-	+	+
B11	D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B12	D-Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C1	D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C2	β -Metil-D-Glucosídeo	-	-	-	+	i	i	i	-	-	-	-
C3	D-Psicose	+	i	i	+	+	+	+	+	+	i	+
C4	D-Rafinose	i	+	i	i	+	+	+	i	+	i	+
C5	L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7	Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C8	D-Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C9	Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*

^a símbolo "-" indicam que não houve utilização do substrato (incolor).

^b símbolo "+" indicam que houve utilização do substrato (coloração púrpura).

^c letra "i" indica resultado indefinido, ou seja, com coloração presente, embora fraca.

cont...

TABELA 13B. cont...

Fontes de carbono		Isolados brasileiros de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>										
Designação	Nome	28	29	30	31	32	33*	34	35	36	37	38
C11	Metilpiruvato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C12	Monometilsuccinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D1	Ácido acético	i	i	-	-	+	-	+	+	+	-	+
D2	Ácido <i>cis</i> -Aconítico	-	-	-	i	-	i	i	-	-	-	-
D3	Ácido cítrico	+	+	+	+	i	+	-	+	+	-	+
D4	Ácido fórmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D5	Ácido D-Galactônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D6	Ácido D-Galacturônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D7	Ácido D-Glucônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D8	Ácido D-Glucosamínico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D9	Ácido D-Glucurônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D10	Ácido α -Hidroxi-butírico	-	i	-	-	-	i	-	-	i	-	-
D11	Ácido β -Hidroxi-butírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D12	Ácido γ -Hidroxi-butírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E1	Ácido ρ -Hidroxi-fenilacético	-	-	-	i	-	-	-	-	-	-	-
E2	Ácido Itacônico	-	-	-	i	-	+	i	-	-	-	-
E3	Ácido α -Cetobutírico	-	i	-	-	+	+	-	-	+	-	-
E4	Ácido α -Cetoglutárico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E5	Ácido α -Cetovalérico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E6	Ácido DL-Lático	i	i	i	i	i	+	v	i	+	-	i
E7	Ácido Malônico	i	i	i	-	+	i	-	+	+	-	+
E8	Ácido Propiônico	-	-	-	-	-	-	-	-	i	-	-
E9	Ácido Quínico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10	Ácido D-Sacárico	+	+	-	i	+	+	-	+	+	-	+
E11	Ácido Sebácico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E12	Ácido Succínico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F1	Ácido Bromosuccínico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F2	Ácido Succinâmico	i	i	+	+	-	+	+	i	i	i	+
F3	Glucuronamida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F4	Alaninamida	-	i	-	i	-	+	+	-	-	+	+
F5	D-Alanina	-	-	-	-	-	+	+	-	-	i	i
F6	L-Alanina	-	-	-	-	-	+	+	-	-	i	+
F7	D-Alanilglicina	-	-	-	i	-	+	+	-	-	+	+
F8	L-Asparagina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9	Ácido L-Aspártico	-	-	-	-	i	i	i	-	-	-	-
F10	Ácido L-Glutâmico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F11	Ácido Glicil-L-Aspártico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F12	Ácido Glicil-L-Glutâmico	i	i	+	i	-	+	+	i	i	i	+
G1	L-Histidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

cont...

TABELA 13B. cont...

Designação	Fontes de carbono Nome	Isolados brasileiros de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>										
		28	29	30	31	32	33*	34	35	36	37	38
G2	Hidroxi-L-prolina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3	L-Leucina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4	L-Ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G5	L-Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G6	L-Prolina	-	-	-	i	+	+	-	i	+	-	-
G7	Ácido L-Piroglutâmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G8	D-Serina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G9	L-Serina	+	+	i	+	+	+	+	+	+	+	+
G10	L-Treonina	-	-	-	i	i	i	-	-	i	-	-
G11	D,L-Carnitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G12	Ácido γ -Aminobutírico-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1	Ácido Urocânico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2	Inosina	-	-	-	i	i	i	-	-	i	i	i
H3	Uridina	-	-	-	i	i	i	-	i	i	-	-
H4	Timidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5	Fenil etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	Putrescina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7	2-Aminoetanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H8	2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H9	Glicerol	-	+	+	+	+	+	+	i	+	+	+
H10	DL- α -Glicerolfosfato	-	-	-	-	i	-	-	-	-	i	i
H11	Glicose 1-fosfato	-	-	-	-	i	-	i	-	-	i	+
H12	Glicose 6-fosfato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+