Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Xanthomonas spp. causadoras da mancha bacteriana do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.): detecção em sementes e diferenciação

Alessandra Aparecida Rabalho

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Alessandra Aparecida Rabalho
Bióloga

Xanthomonas spp. causadoras da mancha bacteriana do tomateiro *(Lycopersicon esculentum* Mill.): detecção em sementes e diferenciação

Orientador**:**
Prof. Dr. **JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN**

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Rabalho, Alessandra Aparecida
Xanthomonas spp. Causadoras da mancha bacteriana do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) : detecção em sementes e diferenciação / Alessandra Aparecida Rabalho. - - Piracicaba, 2007.
91p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Bactéria fitopatogênica 2. Fitossanidade 3. Genes 4. Mancha bacteriana 5. Meios de cultura 6. Reação em cadeia por polimerase 7. Sementes 8. Tomate I. Título

CDD 635.642

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus amados Pais, João Rabalho (in memorian) e Odete da Silva Rabalho, pelo amor incondicional que sempre me dedicaram.

Agradecimentos

A minha gratidão a todos que me apoiaram e incentivaram e cuja convivência foi de extrema importância para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. José Otavio Machado Menten, pela orientação e amizade que me proporcionaram crescimento e amadurecimento científico e, sobretudo, pela confiança depositada, dando-me a oportunidade de trabalhar ao seu lado, mesmo sem me conhecer, abrindo-me as portas da Patologia de Sementes e da Bacteriologia de plantas.

À Dra. Suzete Lanza Destéfano, por me receber e orientar nos experimentos de Biologia Molecular, sempre com muita atenção e paciência.

Ao Dr. Luis Otávio Beriam, por me orientar nos estudos de Sorologia.

À Irene Maria Gatti de Almeida (Instituto Biológico), grande pesquisadora e amiga, pelo exemplo de dedicação e seriedade, por se preocupar e cuidar de mim em todos os momentos desde que nos conhecemos e pelas valiosas dicas nos experimentos de meio semi-seletivo e sorologia.

Aos Drs. Júlio Rodrigues Neto (Instituto Biólogico), Alice Maria Quezado-Duval (EMBRAPA – CNPH), Rui S. Leite (IAPAR) e Ricardo Giória (Sakata Seeds Sudamérica Ltda) pela doação dos isolados de *Xanthomonas* spp. utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Paulo Cesar Tavares de Melo (ESALQ), Sakata Seeds Sudamérica Ltda e EMBRAPA – CNPH pela doação das sementes de tomate.

Aos Professores do PPG Microbiologia Agrícola pelos ensinamentos transmitidos, especialmente aos Profs. Drs. Flavio C. Tavares, pela orientação no primeiro ano de curso, e Luiz Gonzaga, pela amizade e bons conselhos.

Aos Professores do Setor de Fitopatologia, especialmente ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pela orientação no Estágio Supervisionado em Docência, pelo exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa, disponibilização dos equipamentos do Laboratório de Genética Molecular e pelos constantes estímulos.

Aos membros da banca examinadora do Exame Geral de Qualificação, Profs. Drs. Márcio R. Lambais e Sérgio Florentino Pascholati, pelas sugestões realizadas, e especialmente ao Dr. Welington Araújo pela amizade, grande estímulo e auxílio no seqüenciamento das linhagens de *Xanthomonas* spp.

Ao Dr. Luis Humberto Gomes (Beto) (Laboratório de Genética de Leveduras) pela amizade e disposição com que sempre me ouviu, aconselhou e auxiliou nos momentos em que precisei.

À amiga (amicíssima) Vanessa Cristina Frare (Pumba) pela dedicação com que instruiu e acompanhou meus primeiros passos no Laboratório de Patologia de Sementes, pela disposição com que acompanhou e auxiliou no desenvolvimento do meio semi-seletivo, pela companhia constante e por dividir comigo as alegrias e as tristezas.

À Daniele Toledo Del Rio, grande amiga, por receber a mim e aos meus gatinhos (Vida, Nina, Tico e Zeca) em sua casa e em sua vida; pelo amor, companhia e dedicação, por compartilhar as pequenas alegrias diárias e por estar sempre presente nos momentos de grande tristeza.

Ao Maurício Batista Fialho, pela amizade, companheirismo, ensinamentos e valiosas sugestões, que tanto contribuíram para meu aperfeiçoamento.

À Laura C. Assumpção e Tathiana Lisbôa-Padulla, pelo carinho, amizade e pequenas gentilezas e ensinamentos do dia-a-dia.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes: Alderi E. Araújo, Annelise Tremocoldi, Cândido, Camila Calçada, Cleci Dezordi, Daniel Garcia, Diogo A. Togni, Geórgia R. Vilela, Guilherme Moro, Helen A. Calaça, Lia M. Garcia, Luana S. Botelho, Maria Heloisa D. Moraes, Pastora J. Quérales, Paulo Henrique Ramos, Renata (Renatinha) e Thaïs D. Martins, pela convivência agradável, pelas alegrias compartilhadas e pelo grande crescimento pessoal e profissional que cada um me proporcionou.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular: Adalgysa Thayne Ramos, Ana Carolina Fazza, Ana Paula M. Teixeira, Érika S. Naruzawa, Fátima S. Barreto, Fernanda T. P. Guedes, Júlia R. Ottoni, Juliana E. C. Teixeira, Lílian Belotti, Márcia Patrícia Moreno, Osmar V. Carvalho Neto, Raphaele K. Dalla Vale e Sandra Marisa Mathioni, pela convivência agradável e pela prontidão e paciência com que sempre me acompanharam na utilização dos equipamentos, e especialmente ao Daniel Dias Rosa e Reinaldo Montrazi Barata pela disposição em auxiliar na resolução das pequenas dúvidas cotidianas.

Aos funcionários Carmem, Linda, Jéferson, Silvia e Edvaldo (Fitopatologia), Fernando, Vitor e Ana Maria (Dep. Genética), Pedro Arthuso (Casa de Vegetação) pela convivência agradável e carinho e amizade dispensados, e especialmente a Fernanda Groppo e José Rodolfo Groppo pelos valiosos ensinamentos e experiências transmitidos e pela amizade.

Aos pesquisadores, funcionários e estagiários do Instituto Biológico (Campinas): Dr. Júlio Rodrigues Neto, Dr. Harllen Sandro Alves Silva, Dr. Cláudio Marcelo G. de Oliveira, Sônia M. Vieira (Soninha), Mariana Ferreira Toninho, Denise Salomão, Rafaela P. Massucato, e, especialmente, a Daniele B. Alves Corrêa, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos de Biologia Molecular, e Karen Wolf Maciel, pelo grande auxílio nos testes serológicos.

Aos companheiros de curso, Alessandro Riffel, Luis Fernando Romanholo Ferreira, Rodrigo Carvalho, Nívea Tonucci, Denise Balani, Marizete Godoy e Rodrigo Stuart, e da ESALQ, Marisa Renaud-Faulin, Odair Kuhn, Fabrício Packer, José Segundo Giampam (Minuto) e Jair R. Unfried, pela convivência e amizade.

Às secretárias do PPG Microbiologia Agrícola: Giovana (Gi), Sarah e Célia pela atenção, carinho e prontidão com que sempre atenderam minhas solicitações.

Ao PPG Microbiologia Agrícola pela oportunidade e auxílio financeiro para a compra de reagentes e vidraria.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu amado Pai, João Rabalho (*in memorian*), pela simplicidade com que viveu e criou suas filhas, mostrando-nos que é preciso crescer a cada dia, mas que não é preciso muito para ser feliz.

A minha amada Mãe, Odete da Silva Rabalho – mulher forte, justa e sábia – e às minhas irmãs, Andrea e Angela, por acreditarem em mim (até mais que eu mesma), por não me deixarem desistir nunca e pelo amor incondicional que sempre me dedicaram.

Aos queridos Sr. Loreto José Tomasetto e Sra. Aparecida Castilho Tomasetto, por terem me acolhido como filha em suas vidas.

Ao meu amado esposo, Fabrício Tomasetto, esteio de minha vida, pelo amor, companheirismo e carinho dedicados; pela confiança e paciência em permanecer fisicamente distante, mesmo se fazendo presente em cada dia; por estar sempre disposto a me auxiliar e por sempre me incentivar.

A Deus, que na sua infinita misericórdia, me ofereceu juntamente com as dificuldades a força para superá-las.

A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, faz perder também a felicidade.

(Carlos Drummond de Andrade)

SUMÁRIO

RESUMO.....11

ABSTRACT 12

1 INTRODUÇÃO 13

1.1 A cultura do tomate 13

1.1.1 Origem.....13

1.1.2 Taxonomia.....14

1.1.3 Importância.....15

1.2 A mancha bacteriana do tomateiro.....16

1.3 Histórico da etiologia da mancha bacteriana.....18

1.4 A importância da sanidade de sementes e da detecção de *Xanthomonas* spp., agentes causais da mancha bacteriana.....20

Referências 24

2 DESENVOLVIMENTO DE MEIO SEMI-SELETIVO PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas* spp. EM SEMENTES DE TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 33

Resumo 33

Abstract 34

2.1 Introdução 35

2.2 Desenvolvimento.....37

2.2.1 Material e Métodos.....37

2.2.1.1 Linhagens bacterianas 37

2.2.1.2 Isolamento de fungos associados a sementes de tomate.....39

2.2.1.3 Efeito de fungicidas sobre *Xanthomonas* spp. patogênicas ao tomateiro 39

2.2.1.4 Fungitoxicidade *in vitro* para os fungos isolados de sementes de tomate.....39

2.2.1.5 Sensibilidade (qualitativa e quantitativa) dos isolados bacterianos a antibióticos 40

2.2.1.6 Determinação do meio basal para composição do meio semi-seletivo 41

2.2.1.6.1 Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio 41

2.2.1.6.2 Avaliação de diferentes meios basais 41

2.2.1.7 Avaliação do meio semi-seletivo desenvolvido 43

2.2.1.7.1 Avaliação da repressividade 43

2.2.1.7.2 Avaliação da supressividade 44

2.2.1.7.3 Detecção de Xspp pelo método de extração e semeio em meio semi-seletivo 44

2.2.2 Resultados e Discussão 45

2.2.2.1 Patogenicidade das linhagens Xspp e confirmação da identidade dos isolados Xcv 45

2.2.2.2 Isolamento de bactérias e fungos associados a sementes de tomate 46

2.2.2.3 Fungitoxicidade *in vitro* para as linhagens de Xspp e fungos associados a sementes de tomate 47

2.2.2.4 Sensibilidade das linhagens de Xspp e isolados de Bast a antibióticos 48

2.2.2.5 Determinação do meio basal para composição do meio semi-seletivo 55

2.2.2.5.1 Utilização de fontes de nitrogênio 55

2.2.2.5.2 Avaliação de diferentes meios 55

2.2.2.6 Avaliação do meio semi-seletivo desenvolvido 56

2.2.2.6.1 Avaliação da repressividade e supressividade 57

2.2.2.6.2 Detecção de Xspp pelo método de extração e semeio em meio semi-seletivo 59

2.3 Conclusões 60

Referências 61

3 DIFERENCIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas* spp. CAUSADORAS DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO POR PCR-RFLP DA REGIÃO ESPAÇADORA 16S-23S DNAr E DO GENE *rpo*B 67

Resumo 67

Abstract 68

3.1 Introdução 69

3.2 Desenvolvimento 72

3.2.1 Material e Métodos 72

3.2.1.1 Linhagens bacterianas 72

3.2.1.2 Extração de DNA cromossômico 73

3.2.1.3 Amplificação da região espaçadora DNAr 16S-23S e do gene *rpo*B 74

3.2.1.4 Digestão dos produtos de PCR com endonucleases de restrição (PCR-RFLP) 75

3.2.1.5 Purificação dos produtos de amplificação para seqüenciamento 75

3.2.1.6 Seqüenciamento do fragmento do gene *rpo*B 75

3.2.3 Resultados e Discussão 76

3.2.3.1 Análise da região espaçadora 16S-23S DNAr por PCR-RFLP 76

3.2.3.2 Análise do gene *rpo*B por PCR-RFLP 82

3.2.3.3 Seqüenciamento do gene *rpo*B 86

3.3 Considerações finais 87

Referências 87

Bibliografia Consultada 91

RESUMO

Xanthomonas spp. causadoras da mancha bacteriana do tomateiro *(Lycopersicon esculentum* Mill.): detecção em sementes e diferenciação

O tomateiro é a segunda hortaliça em importância econômica no mundo, sendo uma das culturas mais exigentes em cuidados fitossanitários, devido ao grande número de doenças que a acometem e pela elevada capacidade destrutiva e difícil controle dos patógenos. A mancha-bacteriana, causada por espécies do gênero *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. vesicatoria* e *X. perforans*), é uma das mais importantes doenças do tomateiro estaqueado ou rasteiro, que afeta a planta em qualquer estádio de desenvolvimento, podendo ocorrer em toda parte aérea, provocando redução em quantidade e qualidade da produção. Para diminuir a disseminação do patógeno e determinar medidas de controle nas áreas de cultivo, é importante que haja a detecção eficiente do patógeno em plantas e sementes. Assim, existe a necessidade de análises que possibilitem detectar bactérias em sementes, especialmente quando o nível de infecção ou incidência é muito baixo. O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos de detecção e diferenciação de *Xanthomonas* spp. em sementes de tomate. Desenvolveu-se um meio semi-seletivo, constituído por dextrose (5,0 g/L), NaCl (5,0 g/L), KH_2PO_4 (1,4 g/L), K_2HPO_4 (3,6 g/L), extrato de carne (1,0 g/L), peptona (5,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), cefaclor (40,0 mg/L), nistatina (50,0 mg/L), benomil (10,0 mg/L) e ágar (14,0 g/L), que mostrou baixa repressividade a *Xanthomonas* spp. e supressividade moderada aos microrganismos não-alvos associados a sementes de tomate e elevada sensibilidade, além de baixo custo. Por PCR-RFLP de um fragmento do gene *rpo*B, foi possível diferenciar as diferentes espécies causadoras da mancha-bacteriana em tomateiro.

Palavras-chave: Mancha-bacteriana do tomateiro, Detecção, Sementes, Meio semi-seletivo, PCR-RFLP, *rpo*B

ABSTRACT

Xanthomonas spp. causing the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bacterial spot: detection in seeds and differentiation

The tomato is the second economical important horticultural crop in the world, being one of the most exigent cultures in phytosanitary cares, due to the large number of diseases that attack the culture and for the high destructive capacity and difficult control of the pathogens. The bacterial-spot, caused by species of the genus *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. vesicatoria* and *X. perforans*), is one of the most important tomato diseases, affecting plant in any development stage, being able to occur in all aerial part, provoking reduction in quantity and quality of the production. To reduce the pathogen dissemination and to determine control measures in the cultivation areas, it is important that the pathogen detection in plants and seeds has been efficient. So, it is necessary to carry out analysis to detect bacteria in seeds, especially when the infection level or incidence is very low. The objective of this work was to develop detection and differentiation methods of *Xanthomonas* spp. in tomato seeds. A semi-selective medium was developed, constituted by dextrose (5,0 g/L), NaCl (5,0 g/L), KH_2PO_4 (1,4 g/L), K_2HPO_4 (3,6 g/L), meat extract (1,0 g/L), peptone (5,0 g/L), yeast extract (2,0 g/L), cefaclor (40,0 mg/L), nistatine (50,0 mg/L), benomyl (10,0 mg/L) and agar (14,0 g/L), wich showed low repressivity to the *Xanthomonas* spp. and moderate supressivity to the non-target microorganisms associated to tomato seeds and high sensibility, besides low cost. By PCR-RFLP of a *rpo*B gene fragment, it was possible to differentiate the species of the tomato bacterial-spot.

Key-words: Tomato bacterial-spot, Detection, Seeds, Semi-selective medium, PCR-RFLP, *rpo*B

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cultura do tomate

1.1.1 Origem

O tomateiro tem sua origem na parte ocidental da América Central e do Sul, nas regiões andinas do Peru, Bolívia e Equador (FONTES; SILVA, 2002) e era cultivado até uma altitude de aproximadamente 2.000 m de altitude, nos Andes (JENKINS, 1948) e nas Ilhas Galápagos (RICK, 1967; CAMARGO, 1992). Foi levado pelos povos Incas até a região do sul do México, país que se tornou o centro de domesticação do tomate cultivado (RICK; BUTLER, 1956; MONACO, 1964; PAZINATO; GALHARDO, 1997), em especial a região de Puebla e Vera Cruz (JENKINS, 1948). O fruto do tomate em forma de *Physalis*, chamado de *temistitlon* pelos astecas e pelos indígenas mexicanos de *tomati*, *jitomate* ou *xitomate* era, provavelmente, bilocular e pertencia à *Lycopersicon cerasiforme* (MINAMI; HAAG, 1989; EMBRAPA, 1993). Entretanto, alguns pesquisadores, baseando-se na forma e tamanho dos frutos de *L. cerasiforme*, bem como no estágio de evolução dessa espécie botânica, intermediária entre o tomate selvagem e o cultivado, não concordam com tal teoria. Segundo Jenkins (1948), além da contribuição de *L. cerasiforme*, o tomateiro cultivado atualmente pode ter sido resultado de hibridização com *L. pimpenellifolium* (MINAMI; HAAG, 1989).

Na época do descobrimento da América, quando da chegada dos espanhóis, o *jitomate* estava amplamente difundido na América Central, América do Sul e México (MINAMI; HAAG, 1989; EMBRAPA, 1993). Segundo alguns pesquisadores, no início do século XVI, pouco depois de 1535, os exploradores espanhóis levaram a cultura do Peru para o Sul da Europa e, aos poucos, foi disseminado para o Norte desse continente (JENKINS, 1948; EMBRAPA, 1993; PAZINATO; GALHARDO, 1997). Outros afirmam que foi levado do México para a Itália antes de 1544 (RICK; BUTLER, 1956). Segundo Minami e Haag (1989) e Wien (1997), a primeira variedade introduzida era de frutos amarelos, que justificou o nome de *Pomi d'oro* ou *pomodoro* (*golden apple*), porém, o nome de *Tomati* vem do Nahua, grupo de nativos do México e a palavra tomate é de origem espanhola.

Durante muito tempo houve a crença de que o tomate era venenoso, sendo considerado mais uma planta medicinal ou ornamental do que uma planta alimentar, característica que só começou a usufruir em larga escala dois séculos depois (MINAMI; HAAG, 1989; GARDÊ; GARDÊ, [1993?]).; FONTES; SILVA, 2002). Os foram os primeiros europeus a cultivá-lo e utilizá-lo na alimentação

A cultura foi sendo introduzida em quase todos os países, em maior ou menor escala. Na América do Norte, há registros da presença do tomateiro nos Estados Unidos em 1710; no entanto, a comercialização do tomate nesse país, foi iniciada apenas em 1835 (SIMS, 1980). No Canadá a tomaticultura foi introduzida pelos imigrantes franceses no início da industrialização do país, em 1908, e na França foi levada por Napoleão III. (MINAMI; HAAG, 1989; PAZINATO; GALHARDO, 1997; FONTES; SILVA, 2002).

A cultura do tomate foi introduzida na Tunísia e na Austrália ao redor de 1600 (VERLODT, 1980). Por volta de 1890, na Austrália, os produtores se voltam a culturas olerícolas, dentre elas o tomate (KINSELLA, 1980). No Japão, o tomate veio do sudeste da Ásia ou da China, trazido pelos portugueses, ou holandeses, sendo sua primeira menção em literatura japonesa datada de 1709 (KAMIMURA, 1980). No Brasil, o tomate foi trazido nos anos que seguiram ao descobrimento (PAZINATO; GALHARDO, 1997).

1.1.2 Taxonomia

O tomateiro é uma dicotiledônea, ordem Tubiflorae, pertencente à família Solanaceae gênero *Lycopersicon* sub-gênero *Eulycopersicum*, espécie *Lycopersicon esculentum*. Seu classificador botânico foi Miller que, em 1754, propôs a classificação botânica e o nome de *Lycopersicon* ao gênero (MINAMI; HAAG, 1989; CAMARGO, 1992; PAZINATO;GALHARDO, 1997; SILVA; GIORDANO, 2000; FILGUEIRA, 2003).

O gênero *Lycopersicon* abrange nove espécies, que são agrupadas em dois complexos, de acordo com a possibilidade de cruzamento fácil (complexo *esculentum*) ou não (complexo *peruvianum*) com *L. esculentum*. O complexo *esculentum* abrange sete espécies: *L. esculentum* Mill., *L. cheesmanii* Riley, *L. pimpinellifolium* Mill., *L. chmielewskii* Rick, *L. parviflorum* Rick, *L. hirsutum* Dunal e *L. pennellii* (Correll) D'Arcy.

A maioria das espécies deste complexo é silvestre e não explorada, pois seus frutos são extremamente pequenos, por vezes pubescentes, porém são utilizadas em programas de melhoramento do tomateiro visando a introdução de genes, que conferem resistência a pragas e doenças, melhoria da qualidade dos frutos e aumento da qualidade nutritiva (GARDÊ; GARDÊ, [1993?]; LOURENÇÃO et al., 1997; SILVA; GIORDANO, 2000; ZORZOLI; PRATTA; PICARDI, 2000; ARAGÃO et al., 2002).

Os frutos da espécie *L. esculentum* apresentam baga carnuda suculenta e de cor vermelha quando madura, com dois (bilocular) ou mais lóculos (plurilocular), podendo atingir até doze lóculos A parede do ovário, chamada de pericarpo, possui três camadas: exocarpo, mesocarpo e endocarpo. Todos são tecidos epidermiais, à exceção do mesocarpo, que envolve o tecido placentário onde estão as sementes, as quais são óvulos fecundados (MINAMI; HAAG, 1989; CAMARGO, 1992; GARDÊ; GARDÊ, [1993?]; FONTES; SILVA, 2002).

1.1.3 Importância

O tomate de mesa é a mais popular das olerícolas. É plantada em quase todo o mundo, o que a leva ao topo de maior produção/consumo, com destaque para a China e Estados Unidos, que produzem cerca de 30% do total mundial. Enquanto 95% da produção chinesa e 62% da brasileira são destinadas ao consumo *in natura*, apenas 21% da produção americana vai para esse mercado, sendo o restante da produção processada pelas indústrias de alimentos (FONTES; SILVA, 2002; FNP, 2006).

No Brasil, o tomate ocupa o segundo lugar em volume de produção/consumo, vindo logo atrás da batata, pouco à frente da alface e com volume duas vezes maior que a cebola (GAYET et al., 1995). Os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais foram responsáveis por aproximadamente 65% da produção nacional em 2005, sendo que os estados do São Paulo e Minas Gerais estão no contexto nacional, em 2º e 3º lugar, respectivamente; portanto, na região sudeste, está concentrada cerca de 50% da produção nacional. Entretanto, ainda que em menor escala, planta-se tomate nos demais estados brasileiros, estimando-se que a área cultivada no País, em 2005, tenha sido de 57.640 ha (FNP, 2006). A produção de tomate no triênio de 1999/2001 superou

3 milhões de toneladas/ano e 60% deste total destinou-se ao segmento de mesa (IBGE, 2004).

Na safra de 2005, o Brasil produziu 3.267.918 t. Desse total, 8.466 t foram produzidas na região norte, 480.572 t na região nordeste (com destaque para Bahia e Pernambuco, com 169.202 e 168.523 t, respectivamente), 1668.990 t na região sudeste (destacando-se São Paulo, com 690.290 t, e Minas Gerais, com 642.248 t), 313.809 t na região sul e 796.081 t na região centro-oeste (com destaque para Goiás, com produção de 772.600 t) (FNP, 2006). Sob o ponto de vista social, a tomaticultura nacional abriga em sua cadeia mais de 10.000 produtores, com 60.000 famílias de trabalhadores compostas por um efetivo de mais de 200.000 pessoas (TAVARES, 2003).

1.2 A mancha bacteriana do tomateiro

A mancha bacteriana, causada por espécies do gênero *Xanthomonas*, freqüentemente ataca plantas de tomate e pimentão. A doença é favorecida por temperaturas entre 20 e 30°C e ocorre com maior severidade em locais onde a chuva se encontra associada a ventos fortes (LOPES; SANTOS, 1994). Aparentemente, a bactéria não sobrevive no solo por longos períodos; entretanto, pode sobreviver em restos culturais tanto quanto estes persistirem. A bactéria é introduzida numa cultura via semente onde, após a germinação das plantas, atinge folhas e cotilédones, espalhando-se rapidamente com a água da chuva ou de irrigação. Aberturas naturais, danos mecânicos ou causados por insetos e abrasão nas folhas ou tecidos, permitem a penetração da bactéria na planta (RODRIGUES NETO, 2000).

Os sintomas da mancha bacteriana ocorrem em toda a parte aérea da planta, podendo se manifestar em qualquer estádio da cultura (GITAITIS; McCARTER; JONES, 1992). Nas folhas, os primeiros sintomas aparecem na forma de pequenas áreas encharcadas, de formato irregular e com bordos definidos. Estas manchas tornam-se deprimidas, passando de uma coloração amarelada ou verde-clara para marrom-escura até a necrose do tecido (GOODE; SASSER, 1980).

Diferentemente do que ocorre em plantas de pimentão, no tomateiro, a mancha bacteriana não leva à queda das folhas. Com o coalescimento das lesões foliares, ocorre a secagem e a destruição da folhagem a partir da parte inferior da planta, favorecendo o aparecimento nos frutos com sintomas de queima de sol (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).

Nos frutos, as lesões iniciam-se na forma de pequenas áreas encharcadas a amareladas, que se tornam marrom-acinzentadas e de textura áspera (JONES, 1997). Estas lesões tendem a ser deprimidas no centro e elevadas nas margens, variando entre 2 a 10 mm de diâmetro, podendo ser circundadas por um estreito halo amarelado a esbranquiçado (GOODE; SASSER, 1980). A ocorrência da doença durante a floração causa queda de flores, resultando na redução da produção (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997).

No Brasil, a mancha bacteriana em tomateiro foi relatada pela primeira vez no estado de São Paulo, em 1959 (RODRIGUES NETO; SUGIMORI; MALAVOLTA JR, 1984). Segundo Barbosa (1997), essa doença é uma das mais importantes e destrutivas do tomateiro para processamento industrial no país, com ocorrência freqüente nas três macro-regiões de produção brasileira.

As perdas devido à doença são resultantes diretamente da redução da produção em decorrência dos sintomas e também do custo dos produtos químicos empregados como estratégia de controle, notadamente fungicidas cúpricos e antibióticos agrícolas (GOODE; SASSER, 1980). Em condições experimentais de campo, Quezado-Soares et al. (1998) observaram redução de até 52% na produção.

Outros aspectos que intensificam a importância da doença para a cultura do tomateiro como eficiência variável do controle químico, ausência de fontes de resistência adequada, rápida disseminação do patógeno em condições favoráveis de altas temperaturas (24-30°C) e precipitação e disseminação a longas distâncias por sementes contaminadas que além de servir como fonte de inóculo, representam um meio para sobrevivência da bactéria por longos períodos também merecem ser mencionados (GOODE; SASSER, 1980; BASHAN; OKON; HENIS, 1982; JONES, 1997)

1.3 Histórico da etiologia da mancha bacteriana

A mancha bacteriana do tomateiro foi observada, pela primeira vez, na África do Sul, em 1914, e descrita em 1920, como cancro do tomate (DOIDGE, 1920; 1921). Na mesma época, Gardner e Kendrik (1921) descreveram uma doença semelhante nos Estados Unidos, a qual foi denominada mancha bacteriana, designação pela qual a doença é conhecida atualmente. Nos estudos de Doidge, o agente causal foi identificado como *Bacterium vesicatorium*, enquanto que, nos Estados Unidos, Gardner e Kendrik nomearam o organismo causador da doença como *B. exitiosa*. *B. vesicatorium* foi descrita como fracamente amilolítica, enquanto *B. exitiosa* foi caracterizada como fortemente amilolítica.

Durante esse mesmo período, Sherbakoff (1918) descreveu a mancha bacteriana do pimentão. Em 1922, Higgins (1922) determinou que o organismo era estritamente relacionado a *B. vesicatorium* e *B. exitiosa*, porém diferia em algumas reações fisiológicas importantes, não tendo sido capaz de classificar o patógeno do pimentão. Gardner e Kendrik (1923) usaram vários testes determinantes para comparar *B. vesicatorium*, *B. exitiosa* e um isolado de pimentão da Flórida e concluíram que os três patógenos eram quase idênticos; no entanto, eles não levaram em consideração a atividade amilolítica. Devido à regra de prioridade da nomenclatura de bactérias, eles propuseram que os patógenos fossem conhecidos como *B. vesicatorium* Doidge. Como resultado, por aproximadamente quatro décadas, apenas uma espécie foi considerada como causadora da mancha bacteriana em pimentão e tomate. Essa espécie bacteriana recebeu diversas denominações: *Pseudomonas vesicatoria*, em 1925; *Phytomonas vesicatoria*, em 1930; e *Xanthomonas vesicatoria*, em 1939 (HIBBERD et al. 1989 *apud* JONES et al., 1998). Em 1980 Dye et al. (1980) propuseram uma nova reclassificação das *Xanthomonas* e ela foi nomeada *X. campestris* pv. *vesicatoria*. No entanto, estudo realizados por Burkholder e Li (1941) demonstraram que havia variação dentro dessa espécie bacteriana. Em seus estudos, esses autores notaram que linhagens isoladas de tomate hidrolisavam amido, enquanto que linhagens isoladas de pimentão não. Mas somente em 1964, questionou-se se linhagens de tomate e pimentão deveriam ser reconhecidas como taxonomicamente distintas. Na tentativa de esclarecer essa questão, Dye (1966), baseado em testes bacteriológicos e de

sensibilidade a bacteriófagos, comparou linhagens de pimentão e tomate de coleções do mundo inteiro e relatou que as linhagens de ambos os hospedeiros eram estritamente relacionadas. Assim, ele concluiu que elas deveriam ser incluídas na mesma espécie. No entanto, esse autor também não realizou estudos sobre a atividade amilolítica de tais linhagens.

Nos anos 90, Vauterin et al. (1990) e Stall et al. (1994), trabalhando independentemente, descobriram que *X. campestris* pv. *vesicatoria* consistia de dois grupos geneticamente distintos. Em 1995, Vauterin et al. (1995) reclassificaram o gênero *Xanthomonas* e subdividiram aquelas linhagens nomeadas como *X. campestris* pv. *vesicatoria* em duas espécies, *X. vesicatoria* e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, sendo que a primeira (fortemente amilolítica) abrangia na época o grupo B e a segunda (não amilolítica) abrangia o grupo A.

Duas outras bactérias fitopatogênicas foram isoladas de tomate. A primeira foi isolada em 1957, na Iugoslávia, por Sutic, que identificou uma doença bacteriana de tomate responsável pelo sintoma de “olhos de pássaro” nos frutos e classificou o patógeno como *Pseudomonas gardneri*, introduzindo uma variedade especial, *P. gardneri* var. *capsici*, para linhagens que atacavam pimentão. Dye (1966) comparou *P. gardneri* com um grupo de outras espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Xanthomonas* e, baseado em testes bioquímicos e morfológicos, determinou que se tratava de uma *Xanthomonas* típica. Esse autor propôs a sinonímia com *X. vesicatoria*, uma vez que ambas as bactérias produziam uma doença semelhante em tomate e não podiam ser distinguidas por procedimentos laboratoriais ou experimentos em casa de vegetação. A colocação de *P. gardneri* no gênero *Xanthomonas* foi posteriormente sustentada por estudos de hibridização DNA:rRNA (DeLEY, 1978). Entretanto, Hildebrand; Palleroni; Schroth. (1990), em estudos de hibridização de DNA, verificaram que *X. gardneri* estava mais relacionada às espécies *X. hortorum* pv. *carotae*, *X. hortorum* pv. *pelargonii* e *X. hortorum* pv. *taraxaci* e que *X. campestris* pv. *vesicatoria* representava um grupo a parte.

A segunda bactéria foi isolada na Flórida, Estados Unidos, no início dos anos 90 (JONES et al. 1995). Jones et al. (2000) caracterizaram estas duas novas bactéria e determinaram que elas constituíam dois grupos adicionais D e C, respectivamente. O

grupo C, incluía as linhagens originalmente identificadas por Jones et al. (1995) por serem mais estritamente relacionadas ao grupo A de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, baseados em estudos de hibridização DNA-DNA; o grupo D incluía as linhagens identificadas originalmente por Sutic (1957), as quais eram geneticamente distintas de *X. vesicatoria* (grupo B) e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupos A e C) (BOUZAR et al., 1994; BOUZAR et al.,1999; JONES et al., 2000).

Portanto, era claro que o patógeno era bastante variável em suas características fenotípicas e genotípicas e Jones et al. (2004), baseados na homologia do DNA, propuseram a reclassificação das *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana em tomate e pimentão em quatro espécies: foi proposto que os grupos A e C de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* fossem elevados à espécie, de modo que as linhagens do grupo A fossem renomeadas como *X. euvesicatoria* e as linhagens do grupo C com o nome *X. perforans*, sendo mantidos os nomes de *X. vesicatoria* (grupo B) e *X. gardneri* (grupo D).

A posição taxonômica desses organismos ainda é discutida. Pela nomenclatura aceita atualmente, somente *Xanthomonas vesicatoria* é dado como válido (YOUNG et al., 2005). Entretanto, optou-se por utilizar a classificação proposta por Jones et al. (2004) no presente trabalho, uma vez que os mesmos encontram-se em faze de validação (EUZÉBY, 2006).

1.4 A importância da sanidade de sementes e da detecção de *Xanthomonas* spp., agentes causais da mancha bacteriana

A semente é um dos principais insumos da agricultura moderna, sendo que cerca de 90% dos alimentos são produzidos através delas. Todas as espécies cultivadas propagadas por sementes apresentam doenças como um fator responsável pela redução no rendimento ou aumento do custo de produção. Estas podem ser evitadas ou minimizadas pela utilização de sementes sadias e/ou tratadas (MENTEN, 1991).

A sanidade de sementes foi totalmente negligenciada durante muito tempo, porém, atualmente, devido aos relevantes trabalhos realizados, a importância da Patologia de Sementes é reconhecida e aceita pelas autoridades governamentais,

produtores de sementes, agricultores e técnicos ligados ao assunto. Apesar dessa tomada de consciência, ainda não se exige que o lote de sementes para comercialização seja acompanhado de um certificado de sanidade, procedimento que seria ideal, pois geralmente o índice de germinação não revela problemas que os patógenos podem causar à semente ou à cultura. Um lote pode estar com porcentagem de germinação dentro dos padrões exigidos e também estar transportando microrganismos que não afetam a qualidade fisiológica da semente nas condições de laboratório, mas que se manifestarão em condições de campo, afetando a germinação ou causando doença na cultura em desenvolvimento (MORAES, 1991).

Potencialmente, todos os organismos fitopatogênicos podem ser transportados pelas sementes, embora a transmissão de inúmeros deles, por esse meio, não seja conhecida (MACHADO, 1988). Sementes infectadas ou contaminadas são a principal fonte de inóculo para a maioria das doenças causadas por bactérias fitopatogênicas (NEEGAARD, 1977; TAYLOR, 1970). O uso de sementes comprovadamente sadias é uma forma simples, segura e econômica de se evitar a ocorrência de diversas enfermidades no campo. Assim, a produção, a avaliação e a subseqüente utilização de sementes livres do patógeno são medidas importantes para o controle de diversas doenças bacterianas (SCHAAD & DONALDSON, 1980).

Segundo Baker (1972), o transporte de patógenos por sementes pode ser feito de três modos: misturado com a semente (parte da fração impura do lote), aderido passivamente na superfície da semente ou presente em seu interior. Destes, a presença do inóculo no interior da semente é considerada a maneira de transporte mais comumente utilizada pelos fitopatógenos. Vale ressaltar que o patógeno pode estar, simultaneamente, presente na semente nas três condições descritas.

De maneira geral, tem sido demonstrado que patógenos podem sobreviver no interior das sementes por períodos de tempo mais prolongados do que em outras partes da planta (BAKER, 1972). Provavelmente tal fato decorra da existência, nas sementes, de camadas protetoras e do acúmulo de reservas nutritivas dos quais muitos patógenos se beneficiam (MACHADO, 1987).

Em termos econômicos, a importância da associação de patógenos com sementes pode ser avaliada em função dos tipos de danos causados pelas doenças

correspondentes, tanto na fase de produção e comercialização de sementes, como no campo comercial, a partir do uso de sementes contaminadas ou infectadas. Um dos meios mais eficientes de se introduzir ou acumular patógenos em áreas tradicionais de cultivo ou áreas novas é o cultivo de sementes contaminadas ou infectadas em mistura com sementes sadias. Esta eficiência está relacionada ao fato de que as sementes que contém patógenos não são facilmente reconhecidas em um lote e, por conseguinte, são distribuídas aleatoriamente no campo, constituindo foco primário de infecção na fase mais inicial da cultura. Nestas circunstâncias, as chances para o estabelecimento das doenças são máximas (MACHADO, 1987).

Os testes de sanidade de sementes têm como fundamento fazer com que os patógenos, uma vez associados a essas estruturas, sejam direta ou indiretamente evidenciados, permitindo ao analista a sua identificação rápida e segura. Para que um teste seja recomendado é necessário que os resultados sejam reprodutíveis dentro de limites estatísticos e que forneçam informações seguras em relação ao desempenho das sementes no campo ou em termos de inspeção quarentenária (MACHADO, 1988).

O estabelecimento de um método reproduzível e confiável para a detecção de patógenos em análises de rotina é de extrema importância em um programa de certificação de sementes. Desta forma pode-se evitar a utilização de sementes de qualidade sanitária duvidosa, o que, em última análise, resulta sempre em perdas quantitativas e qualitativas da produção.

Devido às dificuldades que envolvem a manipulação e a identificação final de bactérias, a execução de testes de sanidade para detecção deste grupo de patógenos, em termos de rotina de laboratórios, tem sido restrita (MACHADO, 1988). Análises visuais das sementes são insuficientes para determinar a presença ou não das bactérias fitopatogênicas. Porém, a detecção de fitobactérias em sementes pode ser realizada por uma ampla diversidade de técnicas, as quais apresentam grandes variações quanto à sensibilidade, especificidade e complexidade em relação à semente/bactéria avaliada. O importante é que o método utilizado possibilite detectar bactérias em sementes, especialmente quando o nível de infecção ou incidência é muito baixo. Não existe, portanto, um método padronizado e que atenda às diferentes necessidades. A escolha do método a ser utilizado depende de vários fatores e o

procedimento básico tem que ser adaptado para cada sistema biológico em estudo (SCHAAD, 1982).

Outros fatores, como o objetivo da análise (pesquisa ou rotina), localização do patógeno, disponibilidade de tempo e equipamentos, treinamento de pessoal, níveis da população bacteriana e de inóculo dentro de um lote de sementes requerido para o desenvolvimento da doença também influenciam na escolha do método (SCHAAD; DONALDSON, 1980). Quando se deseja detectar e/ou quantificar fitobactérias em sementes deve-se lembrar que a superfície das sementes abriga uma flora microbiana muito diversa, que pode comprometer e mascarar resultados, e que a percentagem de sementes veiculando fitobactérias em um lote é usualmente muito baixa, quase sempre menor que 1% (ROMEIRO, 2001; SAETTLER et al., 1989).

Dentre a multiplicidade de métodos e técnicas descritos para detectar e quantificar fitobactérias associadas a sementes podem ser encontrados métodos simples, como extração seguida de diluição em placas usando meios semi-seletivos e/ou inoculação no hospedeiro até sorologia e outros métodos sorológicos mais complexos (ELISA e imuno dot-blot), bacteriófagos, iscas biológicas e técnicas moleculares como PCR e sondas de DNA (ROMEIRO, 2001).

Para o caso do tomateiro, a infecção de sementes por *Xanthomonas* spp. é causa freqüente da introdução da bactéria em novas áreas de cultivo. Segundo McGuire e Jones (1995), a bactéria pode ser encontrada em extratos de sementes de tomate, sobrevivendo mesmo após procedimentos utilizados no processamento da semente como fermentação da polpa e extração ácida. Bashan; Okon e Henis (1982) relataram que a bactéria pode sobreviver em sementes de tomate e pimentão por períodos de até 10 anos. Carmo et al. (1996) sugerem que o nível de tolerância de *X. vesicatoria* em sementes deva ser zero, devido a elevada capacidade de multiplicação do patógeno e de sua rápida disseminação, principalmente em condições ambientais favoráveis. O método mais freqüentemente utilizado para a detecção desse patógeno em sementes é o meio semi-seletivo. Há vários meios descritos para *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, porém eles foram desenvolvidos antes das recentes mudanças ocorridas na classificação do patógeno (conforme comentado

anteriormente), o que faz com que surjam dúvidas a respeito da sua aplicabilidade para o complexo mancha bacteriana x tomateiro.

Geralmente a detecção do patógeno envolve preliminarmente sua extração, uma vez que esta aumenta as chances de se encontrar o patógeno em uma pequena fração de sementes, misturada a grandes quantidades que constituem um lote. O método de extração de uma amostra representativa varia para cada caso de associação semente-fitobactéria. De maneira geral, a extração da bactéria de uma amostra consiste em imergir um grande número de sementes (2.000 a 10.000, por exemplo) em uma solução extratora apropriada (água, salina, tampão fosfato PBS), devidamente esterilizada, por um determinado tempo, sob agitação, preferencialmente sob baixa temperatura (4-5 °C). O extrato resultante é concentrado por centrifugação (ROMEIRO, 2001), ressuspendido em solução salina esterilizada e espalhado sobre a superfície do meio semi-seletivo contido em placas de Petri. McGuire e Jones (1995) relatam que por meio deste procedimento é possível recuperar o patógeno de sementes infectadas artificialmente (3 ufc/g semente), com um alto nível de eficiência.

É importante salientar que nenhum método de detecção é por si só conclusivo; muitas vezes as colônias típicas do patógeno devem ser testadas quanto à patogenicidade em planta hospedeira ou ter sua identidade confirmada por serologia ou PCR; por outro lado, os resultados advindos das técnicas de detecção serológicas ou moleculares devem ser averiguados quanto à viabilidade do patógeno detectado. Portanto, para se obter um diagnóstico preciso, muitas vezes, é necessária a associação de mais de um método.

Referências

ARAGÃO, F.A.S.; RIBEIRO, C.S.C.; CASALI, V.W.D.; GIORDANO, L.B. Cultivo de embriões de tomate *in vitro* visando a introgressão de genes de *Lycopersicon peruvianum* em *L. esculentum.* **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20. n. 4. p. 605-610, 2002.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RS. Disponível em: <http://www.apassul.com.br/conteudo.asp?content=15&a=details&ID=42>. Acesso em: 05 maio 2005.

BAKER, K.F. Seed pathology. In: KOZLOWSKI, T. (Ed.) **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. p.317-416.

BARBOSA, V. The processing tomato growing system under tropical and subtropical conditions – the Braziliam experience. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PROCESSING TOMATO, 1., 1996, Recife. **Proceedings…** Recife: IPA/ASHS, 1997. p. 94-97.

BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 9, p. 1143-44, 1982.

BOUZAR, H.; JONES, J.B.; STALL, R.E.; SOMODI, G.C.; KELLY, R.O.; DAOUZLI, N. Phenotypic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains from the Caribbean and Central America. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 1069, 1994.

BOUZAR, H.; JONES, J.B.; STALL, R.E.; LOUWS, F.; SCHNEIDER, F.J.; RADEMAKER, M. de BRUJIN, J.W.L.; JACKSON, L.E. Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, p. 1328-335, 1999.

BURKHOLDER, W.H.; LI, C.C. Variations in *Phytomonas vesicatoria*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 31, p. 753-55, 1941.

CAMARGO, L.S. **As hortaliças e seu cultivo**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1992. 253 p. (Série Técnica, n. 6).

CARMO, M.G.F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L.A. CARVALHO, A.O. Determinação do nível de tolerância de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília,v. 21, p. 336-341, 1996.

DeBOER, S.H. Use monoclonal antibodies to identify and detect plant pathogenic bacteria. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 9, p.182-187, 1987.

DeLEY, J. Modern molecular methods in bacterial taxonomy: evaluation, application, prospects. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. **Procedings…** Angers: CIRAD, 1979. p. 347-357.

DOIDGE, E.M. A tomato canker. **Journal of Department of Agriculture of Union South Africa**, Oxford, v. 1, p. 718-721, 1920.

DOIDGE, E.M. A tomato cancker. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 7, p. 407-430, 1921.

DYE, D.W. Cultural and biochemical reaction of additional *Xanthomonas* species. **New Zealand Journal of Science**, Wellington, v. 9, p. 913-19, 1966.

DYE, D.W.; BRADBURY, J.F.; DICKEY, R.S.; GOTO, M.; HAYWARD, A.C., et al. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Review of Plant Pathology**, Kew, v. 59, p. 153-168, 1980.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **A cultura do tomateiro (para a mesa).** Brasília: Embrapa - SP, 1993. 92 p.
EUZÉBY, J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Validation List n. 109. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 56, p. 925-27, 2006.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2.ed. Viçosa: UFV, 2003, 412p.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. In:_____. **Agrianual 2006:** anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. p. 476-482.

FONTES, P.C.R.; SILVA, D.J.H. **Produção de tomate de mesa**. Viçosa: Aprendafácil, 2002. 197 p.

GARDÊ, A.; GARDÊ, N. **Culturas hortícolas**. 6. ed. Lisboa: Clássica, [1993?]. 469p. (Coleção Nova Coleção Técnica Agrária).

GARDNER, M.W.; KENDRICK, J.B. Bacterial spot of tomato. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 21, p. 123-56, 1921.

GARDNER, M.W.; KENDRICK, J.B. Bacterial spot tomato and pepper. **Phytophatology**, Saint Paul, v. 13, p. 307-315, 1923.

GAYET, J.P.; BLEINROTH, E.W.; MATALLO, M.; GARCIA, E. E. C.; GARCIA, A. E.; ARDITO, E. F. G.; BORDIN, M. R. **Tomate para Exportação: Procedimentos de Colheita e Pós-colheita**. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, Secretaria do Desenvolvimento Rural, Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais - Brasília: EMBRAPA-SP, 1995. 34 p. (Série Publicações Técnicas FRUPEX; 13)

GITAITIS, R.; McCARTER, S.; JONES, J.B. Disease control in tomato transplants proceduced in Georgia and Flórida. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 7, p. 651-656, 1992.

GOODE, M.J.; SASSER, M. Prevention the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, p. 831-834, 1980.

HALFON-MEIRI, A.; VOLCANI, Z. A combined method for detecting *Colletotrichum gossypii* and *Xanthomonas malvacearum* in cotton seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 5, p.129-139, 1977.

HAYWARD, A.C.; WATERSON, J.M. *Xanthomonas vesicatoria*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**. n. 20, 1964.

HIGGINS, B.B. The bacterial spot of pepper. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 12, p. 501-516, 1922.

HILDEBRAND, D.C.; PALLERONI, N.J.; SCHROTH, M.N. Deoxyribonucleic acid relatedness of 24 xanthomonads strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 68, p. 263-269, 1990.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola** – dezembro 2003. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>. Acesso em: 03 fev. 2004.

JENKINS, J.A. The origin of the cultivated tomato. **Economic Botany**, New York, n. 2, p. 379-392, 1948.

JONES, J.B.; STALL, R.E.; SOMODI, G.C.; BOUZAR, H.; HODGE, N.C. A third tomate race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Plant Desease**, Saint Paul, v. 79, p. 395-398, 1995.

JONES, J.B. Bacterial spot. In: JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E.; ZITTER, T.A. (Ed.) **Compendium of tomato diseases**. Saint Paul: APS Press, 1997. 27 p.

JONES, J.B.; STALL, R.E.; BOUZAR, H. Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 41-58, 1998.

JONES, J.B.; BOUZAR, H.; STALL, R.E; ALMIRA, E.C.; ROBERTS, P.D.; BOWEN, B.W.; SUDBERRY, J.; STRICKLER, P.M.; CHUN, J. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 50, p. 1211-1219, 2000.

JONES, J.B.; LACY, G.H.; BOUZAR, H.; STALL, R.E.; SCHAAD, N.W. Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, p. 755-762, 2004.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.

KAMIMURA, S. History of tomatoes for processing in Japan. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 100, p. 75-86, 1980.

KINSELLA, M.N. Tomato industry in Australia. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 100, p. 63-69, 1980.

KLEMENT, Z. Detection of seedborne bacteria by hypersensitive reaction. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 11, p. 589-593, 1983.

KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. (Ed.). **Methods in phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. 568 p.

KOMIYA, Y.; SHIRAKAWA, T.; ABIKO, K. Rapid diagnosis of watermelon bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* with immunological agglutination methods. **Japanese Journal of Phytopathology**, Tokyo, v. 69, p. 15-18, 2003.

KRUPPA, P.C.; KUROZAWA, C.; MARINGONI, A.C. Avaliação de meios de cultura semi-seletivos para o isolamento de Xanthomonas campestris pv. vesicatoria de sementes de tomate. Summa Phytopathologica, Jaguariuna, v. 20, n.1, p. 55, 1994. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 17., 1994, Araras.

LaFLAMME, D.J.; MADDOX, D. Clinical application of the polymerase chain reaction for the detection of seedborne Aac. **The Grower**, Lenexa, p. 6A-8A, dec. 1998.

LEITE JUNIOR, R.P.; JONES, J.B.; SOMODI, G.C.; MINSAVAGE, G.V.; STALL, R.E. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n. 9, p. 917-922, 1995.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças das hortaliças** – diagnose e controle. Brasília: Embrapa – CNPH, 1997. 70 p.

LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H.; SIQUIERA, W.J.; USBERTI FILHO, J.A.; MELO, A.M.T. Seleção de tomateiros resistentes a toposvírus. **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 1, p. 21-31, 1997.

MACHADO, J.C. Introdução à patologia de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.V.S. (Ed.) **Patologia de sementes.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap. 1, p. 3-17.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes:** fundamentos e aplicações. Brasília: Ministério da Educação; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 107 p.

MALIN, E.; ROTH, D.; BELDEN, E.L. Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 645-647, 1983.

MARINGONI. A.C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Científica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 277-288, 1994.

McGUIRE, R.G.; JONES, J.B. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato. In: SAETLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. (Ed) **Detection of bacteria in seed**. Saint Paul: APS Press, 1995. 122 p.

McGUIRE, R.G.; JONES, J.B.; SASSER, M. Tween media for semi selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, n. 9, p. 887-891, 1986.

MENTEN, J.O.M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES. 2., 1991, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: ESALQ, FEALQ, 1991. p.115-136.

MINAMI, K.; HAAG, H.P. **O Tomateiro.** 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1989. 397p.

MOHAN, S.K.; SCHAAD, N.W. An improved agar planting assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in contamined bean seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, p.1390-1395, 1987.

MONACO, L. Melhoramento do tomateiro. **Boletim do Campo**, Rio de Janeiro, n. 193, p. 79-85, 1964.

MORAES, M.H.D. Testes de sanidade de sementes em rotina no Brasil: situação atual, contribuições e perspectivas. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES. 2., 1991, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: ESALQ, FEALQ, 1991. p. 37-52.

NEERGAARD, P. **Seed pathology.** New York: MacMillian Press, 1977. 1187 p.

OLIVEIRA, J.R. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro.** 98 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

PARASHAR, R.D.; LEBEN, C. Detection of *Pseudomonas glycinea* in soybean seed lots. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, p. 1075-1077, 1972.

PAZINATO, B.C.; GALHARDO, R.C. **Processamento artesanal do tomate**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 1997. 30 p.

QUEZADO-SOARES, A.M.; SILVA, V.L.; GIORDANO, L.B.; LOPES, C.A. Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devida à mancha bacteriana. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 16, n. 1, 1998. /Resumo 266/

RICK, C.M. Fruit and pedicel characteristics derived from Galapagos tomato. **Economic Botany**, New York, n. 21, p. 171-184, 1967.

RICK, C.M.; BUTLER, L. Cytogenetics of the tomatoes. **Advances in genetics,** New York**,** n. 8, p. 267-382, 1956.

RODRIGUES NETO, J. Doenças bacterianas do tomateiro. In: SINIGAGLIA, C.; RODRIGUES NETO, J.; COLLARICIO, A.; VICENTE, M.; GROPPO, G.; GRAVENA, S.; LEITE, D. **Manejo integrado de pragas e doenças do tomateiro.** São Paulo: Manual Técnico –série especial, v. 6, 2000. p. 42-52.

RODRIGUES NETO, J.; SUGIMORI, M.H.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A. Raças de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 51, n. 1/4, p. 13-16, 1984.

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

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas.** Viçosa: UFV, 2001. 279p.

SAETTLER, A.W. Seedling injection as an aid identifying bean blight bactéria. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 55, p. 703-706, 1971.

SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D. A. **Detection of bacteria in seed and other planting material.** Minneapolis: American Phytopathologycal Society, 1989. 122 p.

SCHAAD, N.W. Serological identification of plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.17, p.123-147, 1979.

SCHAAD, N.W. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, p. 885-890, 1982.

SCHAAD, N.W.; DONALDSON, R.C. Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich ,v. 8, p. 383-391, 1980.

SCHAAD, N.W.; FORSTER, R. A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 3, p. 260-263, 1985.

SHERBAKOFF, C.D. Report of the associate plant pathologist. **Florida Agriculture Experiment Station Report 1916-1917**, Florida, p. 66R-86R, 1918.

SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B. **Tomate para processamento industrial.** Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia – Embrapa Hortaliças, 2000. 168 p.

SIMS, W.J. History of production of tomatoes for processing in the USA. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 100, p. 27-29, 1980.

SOARES, F.M.P. **Métodos para detecção em sementes de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) e controle biológico de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.** 1993. 51 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

SONG, W.Y.; SECHLER, A.; HATZILOUKAS, E.; KIM, H.M.; SCHAAD, N.W. Use of PCR for rapid identification of *Acidovorax avenae* and *A. avenae* subsp. *citrulli.* In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PATHOVARS AND RELATED PATHOGENS, 6., 2002. Maratea. Anais. Maratea: Acquafredda di Maratea, 2002. 100 p.

STALL, R.E.; BEAULIEU, C.; EGEL, D.; HODGE, N.C.; LEITE, R.P.; et al. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, p. 47-53, 1994.

STALL, R.E. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, the causal agent of watermelon fruit blotch on seeds bu the polymerase chain reaction (PCR). In: HOPKINS, D., STALL, R.E., LATIN, R., RUSHING, J., COOK, W. P. & KEINATH, A. P. Bacterial fruit blotch of watermelon. Tampa: **Citrus & Vegetable Magazine**, 1997. p. W2-W3.

SUTIC, D. Bakterioze crvenog patlidzana (Tomato bacteriosis). Posebna Izd. Inst. Zasht. Bilja Beograd (Spec. Edit. Inst. Plant Prot. Beograd), v. 6, p. 1-65. English summary: **Review of Applied Mycology**, Farnham Royal, v. 36, p. 734-35, 1957.

TAVARES, C. A. M. Ataque dos vírus. **Cultivar: Frutas e Hortaliças**, Pelotas, ano IV, n. 20, p. 26-28, 2003.

TAYLOR, H.D. The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolícola* (Burkh.) Dowson. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v. 66, p. 29-36, 1970.

VALARINI, P.J.; MENTEN, J.O.M. *Xanthomonas campestris* pv. p*haseoli* em sementes de feijão: detecção por inoculação em plantas indicadoras. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, p. 171-180, 1992.

VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K.; GILLIS, M.; NEW, T.W.; et al. Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 40, p. 312-316, 1990.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWUINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 472-89, 1995.

VERLODT, H. Historique de la culture de tomate our l'industrie em Afrique du Nordaver des references particuliers a la Turism. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 100, p. 53-61, 1980.

WALCOTT, R.R. Detection of seedborn pathogens. **Horticulture Technology**, Alexandria, v. 13, n. 1, p. 40-47, jan./mar. 2003.

WALCOTT, R.R.; GITAITIS, R.D. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 470-474, 2000.

WEBSTER, D.M.; ATKIN, J.D.; CROSS, J.E. Bacterial blights of snap beans and their control. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, p. 930-935, 1983.

WIEN, H. C. **The physiology of vegetable crops.** 2th ed., New York: Labi Publishing, 1997. 662 p.

YOUNG, J.M.; BULL, C.T.; DE BOER, S.H.; FIRRAO, G.; SADDLER, G.E.; STEAD, D.E.; TAKIKAWA, Y. Names of plant pathogenic bacteria, 1864-2004. International Society for Plant Pathology, 2005. 74 p. Disponível em: <http://www.isppweb.org/Names%20of%20Plant%20Pathogenic%20Bacteria%202005.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2007.

ZORZOLI, R.; PRATTA, G.R.; PICARDI, L.A. Variabilidad genética para la vida postcosecha y el peso de los frutos en tomate para familias F3 de un híbrido interespecífico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v. 35, n. 12, p. 2423-2427, dez. 2000.

2 DESENVOLVIMENTO DE MEIO SEMI-SELETIVO PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas* spp. EM SEMENTES DE TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Resumo

A mancha bacteriana, causada por espécies do gênero *Xanthomonas*, é uma das mais importantes doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), provocando danos em quantidade e qualidade. Até meados da década de 1980, essa bactéria estava classificada como *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Com o desenvolvimento de novos métodos, incluindo o emprego de técnicas moleculares, ocorreram diversas mudanças na classificação desse patógeno. Se as últimas propostas de reclassificação forem aceitas, o que atualmente é nomeado *X. vesicatoria* (antiga *X. campestris* pv. *vesicatoria*) pode ser subdividido em quatro espécies distintas (*X. euvesicatoria*, *X. gardneri, X. perforans* e *X. vesicatoria*). Os meios semi-seletivos são importantes ferramentas para detecção e identificação de bactérias em sementes. Alguns meios já foram descritos para detecção de *Xanthomonas* em sementes de tomate; entretanto, não há relatos de meio semi-seletivo para detecção concomitante de todas as espécies desse patógeno. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um meio visando inibir a maioria dos fungos e bactérias comumente associadas às sementes de tomate e favorecer o desenvolvimento e detecção do patógeno. O meio desenvolvido é constituído por dextrose (5,0 g/L), NaCl (5,0 g/L), KH_2PO_4 (1,4 g/L), K_2HPO_4 (3,6 g/L), extrato de carne (1,0 g/L), peptona (5,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), cefaclor (40,0 mg/L), nistatina (50,0 mg/L), benomil (10,0 mg/L) e ágar (14,0 g/L). Este meio mostrou baixa repressividade (2%) para as *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana em tomate e supressividade moderada (51%) aos microrganismos não-alvos, apresentando alta sensibilidade (recuperação do patógeno em amostras contendo 1 semente infectada artificialmente : 9999 sementes sadias) e baixo custo.

Palavras-chave: Meio semi-seletivo, Sementes, Tomate, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. vesicatoria* e *X. perforans*

Development of semi-selective medium to detect *Xanthomonas* spp in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds

Abstract

The bacterial spot, caused by species of *Xanthomonas* genus is one of the most important tomato (*Lycopersicon esculentum*) diseases, provoking damages in quantity and quality. Until middles of the 1980 decade, this bacteria was classified like *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. With the development of new methods, including the use of molecular techniques, several changes in the classification of this pathogen had happened. If the last reclassification proposals will be accepted, what actually is named *X. vesicatoria* (previous *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) can be subdivided in four distinct species (*X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* and *X. vesicatoria*). The semi-selective media are important tools for bacterial detection in seeds. Some media were already described for *Xanthomonas* detection in tomato seeds; however, there are no reports of semi-selective medium for concomitant detection of all species of this pathogen in seeds. The objective of this work was to develop a medium aiming to inhibit most of the fungi and bacteria commonly associated to the tomato seeds and to favor the pathogen development and detection. The developed medium is constituted by dextrose (5,0 g/L), NaCl (5,0 g/L), KH_2PO_4 (1,4 g/L), K_2HPO_4 (3,6 g/L), meat extract (1,0 g/L), peptone (5,0 g/L), yeast extract (2,0 g/L), cefaclor (40,0 mg/L), nistatine (50,0 mg/L), benomyl (10,0 mg/L) and agar (14,0 g/L). This medium showed low repressivity (2%) to the *Xanthomonas* causing the tomato bacterial spot and moderate supressivity (51%) to the non-target microorganisms, presenting high sensibility (pathogen recovery in samples containing 1 artificially infected seed: 9999 healthy seeds) and low cost.

Key-words: Semi-selective medium, Seeds, Tomato, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. vesicatoria*, *X. perforans*

2.1 Introdução

A mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas* spp., é uma das mais importantes doenças do tomateiro estaqueado ou rasteiro. A doença afeta o tomateiro em qualquer estádio de desenvolvimento, podendo ocorrer em toda parte aérea da planta, provocando redução em quantidade e qualidade da produção. A alta suscetibilidade das cultivares, associada à baixa eficiência do controle químico e a utilização de sementes portadoras da bactéria, tornam essa doença de difícil controle. Para diminuir a disseminação da doença e determinar medidas de controle nas áreas de cultivo, é importante que haja a detecção eficiente do patógeno em plantas e sementes.

A detecção do patógeno depende da integração de procedimentos para liberação eficaz da bactéria alvo da semente ou outro tecido da planta e da disponibilidade de um meio que isola o patógeno alvo de microrganismos contaminantes (MING et al., 1991).

Os meios de cultura semi-seletivos são valiosas ferramentas em fitobacteriologia, para o diagnóstico de doenças, estudos epidemiológicos, etiológicos e de patologia de sementes. Os meios semi-seletivos são definidos como meios de cultura empregados para suprir ou prevenir o crescimento de um grupo de organismos, enquanto permite o crescimento de outro grupo, quando presentes na mesma microflora.

Os dois principais critérios para avaliação de um meio semi-seletivo são a sua eficiência na detecção e sua seletividade (KLEMENT et al., 1990). A seletividade dos meios de cultura semi-seletivos pode ser obtida utilizando-se fontes específicas de carbono e nitrogênio, as quais podem estimular o crescimento de uma determinada espécie e inibir outra; ou quando as enzimas bacterianas reagem com os constituintes do meio de cultura e propiciam uma distinção cultural entre duas espécies que antes pareciam similares. A adição de substâncias tóxicas ao meio de cultura visa reduzir o número de contaminantes e favorecer o desenvolvimento da espécie desejada (McGUIRE; JONES; SASSER, 1986). Em contrapartida, sendo o meio seletivo empregado eficiente, o método pode ser usado não só para isolamento como até mesmo para uma estimativa da percentagem de sementes no lote que possui a fitobactéria a elas associadas (SAETTLER; SCHAAD; ROTH, 1989).

Considerando-se a grande quantidade de microrganismos, outros que não o patógeno, constituindo a flora microbiana associada às sementes, o uso de meios semi-seletivos só funciona bem se o meio for bastante efetivo em termos de seletividade, com alta supressividade para microrganismos saprófitas e baixa repressividade para a bactéria fitopatôgenica que se deseja detectar e/ou quantificar (ROMEIRO, 2001).

A facilidade de uso e o menor custo são vantagens do meio semi-seletivo quando comparado a técnicas imunológicas ou moleculares. Além disso, os meios podem ser freqüentemente usados para diversos tipos de amostras (solo, água, tecido foliar), enquanto técnicas imunológicas e moleculares podem variar quanto à sensibilidade, de acordo com o tipo de amostra (TOUSSAINT; MORRIS; CARISSE, 2001). Outras vantagens são a possibilidade de quantificação de bactérias e a elevada sensibilidade. Alguns meios podem ser até mais sensíveis que técnicas imunológicas e moleculares quando se considera um baixo número de bactérias na amostra (WANG et al., 1999).

Há um grande número de meios semi-seletivos para o isolamento e identificação de bactérias fitopatogênicas, dentre os quais podem ser citados os meios para o isolamento de *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (KADO; HESKETT, 1970), *Burkholderia glumae* (KAWARADANI; OKADA; KUSAKARI, 2000), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (FATMI; SCHAAD, 1988; SHIRAKAWA; SASAKI, 1988), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (BEHLAU; NUNES; LEITE JR., 2006), *Erwinia* sp. (CUPPELS; KELMAN, 1974), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (MOHAN; SCHAAD, 1985; 1987), *P. syringae* pv. *phaseolicola* (MOHAN; SCHAAD, 1987); *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (SOARES; VALARINI; MENTEN, 2001; SHARON et al., 1982); *X. albilineans* (DAVIS, et al., 1994); *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (MEHTA; BOMFETI; BOLOGNINI, 2005), *X. campestris* (SCHAAD; WHITE, 1974); *X. campestris* pv. *campestris* (RANDHAWA; SCHAAD, 1984); *X. hortorum* pv. *carotae* (WILLIFORD; SCHAAD, 1984); *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (PRUVOST et al., 2005); *X. axonopodis* pv. *manihotis* (FESSEHAIE; WYDRA; RUDOLPH, 1999); *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (CLAFLIN; VIDAVER; SASSER, 1987; MARINGONI; KIMATI; KUROZAWA, 1994); *X. translucens* pv. *translucens* (SCHAAD; FOSTER, 1985); *X. axonopodis* pv.

vitians (TOUSSAINT; MORRIS; CARISSE, 2001); *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (MING; et al., 1991); *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (ROUMAGNAC; GAGNEVIN; PRUVOST, 2000). Schaad; Jones e Lacy (2001) também citam meios para *X. axonopodis* pv. *alfalfae*, *X. axonopodis* pv. *begoniae*, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, *X. campestris* pv. *nigromaculans*, *X. frágariae*, *X. arboricola* pv. *juglandis*, *X. arboricola* pv. *corylina*, *X. arboricola* pv. *pruni*, *X. hortorum* pv. *perlagonii*, *X. hyacinthi*, *X. pisi*.

Vários meios foram descritos também para as *Xanthomonas* de tomate (SHARON et al., 1982; McGUIRE; JONES; SASSER, 1986; KIM; SCHAAD, 1989; SIJAM; CHANG; GITAITIS, 1991, 1992). Porém, desde a publicação dos mesmos, houve novos estudos sobre o agente causal da mancha bacteriana do tomateiro e mudanças na sua classificação, o que torna difícil a utilização desses meios. O que, pela classificação atual, é aceito como *X. vesicatoria* (YOUNG et al., 2005), pode pertencer a quatro espécies (*X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* e *X. vesicatoria*) pela proposta de Jones et al. (2004).

Estabelecida a relevância dos meios semi-seletivos em fitobacteriologia, o objetivo deste estudo foi desenvolver um meio semi-seletivo para a detecção concomitante das *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* e *X. vesicatoria*) causadoras da mancha bacteriana do tomate.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas, neste estudo, treze linhagens de *Xanthomonas* spp. (Xspp), sendo quatro de *Xanthomonas vesicatoria* (Xspp1 = XV89 – Laboratório de Fisiologia do Parasitismo – ESALQ/USP – Piracicaba-SP, Xspp2 = IBSBF 1338, Xspp3 = IBSBF 464 e Xspp4 = IBSBF 465 – Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF) – Campinas-SP), duas de *Xanthomonas euvesicatoria* (Xspp5 = XE75-3 (10408) – IAPAR – Londrina-PR e Xspp6 = IBSBF 2348), três de *Xanthomonas gardneri*

(Xspp7 = IBSBF 1782 e Xspp8 = IBSBF 1783, Xspp9 = XG101 (10513) – IAPAR), três de *Xanthomonas* spp. (Xspp10 = Xcv06, Xspp11 = Xcv68 e Xspp12 = Xcv108 – Sakata Seeds Sudamérica Ltda.) e uma de *Xanthomonas perforans* (Xspp13 = IBSBF 2349).

Essas linhagens foram cultivadas em meio nutriente-ágar (NA), composto de 0,1% de extrato de carne, 0,5% de peptona, 0,2% de extrato de levedura; 0,5% de dextrose, 0,5% de NaCl e 1,5% de ágar, e preservadas sob óleo mineral esterilizado e em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,2. A patogenicidade das mesmas foi verificada pela inoculação da suspensão bacteriana em plântulas de tomate da cultivar Santa Clara e a identidade dos isolados Xcv06, Xcv68 e Xcv108 foi feita por PCR-RFLP.

Os isolados de bactérias associadas a sementes de tomate (Bast) foram obtidos pelo método de extração de bactérias de sementes (OLIVEIRA, 1995, modificado), a partir de sementes de tomate obtidas da extração de quatro amostras de 10 kg de frutos comercializados em Piracicaba-SP. Amostras de 12 g de sementes foram imersas em 100 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%), incubadas por 3 h a 4 °C e colocadas sob agitação durante 2 h em temperatura ambiente; realizou-se filtração em gaze esterilizada para retenção de sementes e impurezas maiores e os extratos obtidos foram centrifugados a 10000 *g* (8000 rpm obtido com rotor GSA Sorvall) durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, para cada amostra, foi ressuspendido em 5 mL de solução salina esterilizada. Realizou-se diluição até 10^{-8}, em solução salina, e espalhou-se, com auxílio de uma alça de Driglasky, 100 μL das diluições 10^{-6}, 10^{-7} e 10^{-8}, separadamente, na superfície do meio NA contido em placas de Petri, em triplicata. As placas foram mantidas em estufa, a 28 °C, durante 48-72 h. Colônias com características distintas foram transferidas, individualmente, para placas contendo meio NA e incubadas em estufa a 28 °C durante 48-72 h, sendo então preservadas em tampão fosfato. Para todas as colônias foi realizado teste de Gram (SUSLOW; SCHROTH; ISAKA, 1982)

2.2.1.2 Isolamento de fungos associados a sementes de tomate

O isolamento dos fungos associados a sementes de tomate foi realizado pelo método de papel de filtro (LUCA-FILHO, 1987), sendo utilizadas 400 sementes/amostra e 25 sementes/placa. Os fungos foram identificados com auxílio de microscópio estereoscópico e composto, de acordo com Mathur e Kongsdal (2003), Barnet e Hunter (1998) e Ellis (1971 e1976), isolados em meio ágar-água e preservados sob óleo mineral em meio batata-dextrose-ágar (BDA).

2.2.1.3 Efeito de fungicidas sobre *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha bacteriana

Com base na relação de fungos com maior incidência nas sementes de tomate, foram selecionados os fungicidas benomil (Benlate 500), captana (Captan 750 PS), carboxina+tiram (Vitavax+Thiram 200 SC), clorotalonil (Daconil PM), iprodione (Rovral SC) e triadimenol (Baytan SC), nas concentrações de 10, 50 e 100 ppm, e nistatina, nas concentrações de 50, 100 e 200 ppm, os quais foram avaliados quanto ao efeito no desenvolvimento das linhagens de Xspp. Os fungicidas foram adicionados ao meio NA autoclavado e fundente, com aproximadamente 45 °C. Para cada fungicida/concentração/isolado foram preparadas quatro repetições, sendo o meio NA sem adição do fungicida utilizado como testemunha. Suspensões bacterianas em solução salina foram preparadas a partir das linhagens crescidas em NA por 48-72 h, sendo a concentração ajustada a $1x10^8$ ufc/mL, aproximadamente. As placas contendo o meio de cultura foram semeadas por estrias com uma alçada da suspensão bacteriana (aproximadamente 10 μL), mantidas em estufa a 28 °C durante 48-72 h e avaliadas quanto ao surgimento ou não de colônias bacterianas.

2.2.1.4 Fungitoxicidade *in vitro* para os fungos isolados de sementes de tomate

Discos de 0,6 cm de diâmetro (1 disco/isolado/placa) do crescimento micelial dos fungos isolados das sementes de tomate, com 48-72 h de cultivo em meio BDA, foram transferidos para as placas contendo o meio NA acrescido dos fungicidas e

concentrações descritos no item 2.2.1.3. As placas foram mantidas em estufa a 28 °C, sendo a avaliação realizada pela medida do diâmetro da colônia, quando as colônias fúngicas das placas testemunhas atingiram 9 cm de diâmetro ou 2/3 deste valor, no caso de fungos de crescimento lento (PARISI et al., 2001). O valor da porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), foi determinado segundo Menten et al. (1976) e correlacionado com logaritmo da concentração do fungicida, obtendo-se o valor aproximado de ED_{50} (concentração do produto químico necessário para inibir em 50% o crescimento micelial do fungo) (EDGINGTON et al., 1971). Após o cálculo da ED_{50},os produtos químicos foram classificados em quatro categorias de eficiência segundo escala de Bollem e Fuchs (1970), Edgintgton at al., 1971) e Kataria e Grover (1978), onde:

a) ED_{50} < 1 ppm: altamente eficiente (AE)
b) ED_{50} 1-10 ppm: moderadamente eficiente (ME)
c) ED_{50} 10-50 ppm: pouco eficiente (PE)
d) ED_{50} > 50 ppm: ineficiente (I)

2.2.1.5 Sensibilidade (qualitativa e quantitativa) dos isolados bacterianos a antibióticos

A sensibilidade de Xspp a antibióticos foi determinada pelo teste de disco difusão em ágar utilizando-se discos comercialmente disponíveis (Oxoid®) contendo diferentes concentrações de antibióticos de uso clínico. Foram utilizadas 10 linhagens de Xspp (*Xanthomonas vesicatoria* Xspp1 (XV89), Xspp3 (IBSBF 464) e Xspp4 (IBSBF 465), *Xanthomonas euvesicatoria* Xspp5 (XE75-3 10408), *Xanthomonas gardneri* Xspp7 (IBSBF1782), Xspp8 (IBSBF1783) e Xspp9 (XG101 10513) e de *Xanthomonas* spp. Xspp10 (xcv06), Xspp11 (Xcv68) e Xspp12 (Xcv108)), sendo preparadas suspensões celulares em solução salina a partir de culturas desenvolvidas em NA por 48-72 h, e a concentração ajustada a aproximadamente $1x10^3$ ufc/mL. Uma alíquota de 100 μL de cada suspensão bacteriana foi distribuída, separadamente, sobre a superfície do meio NA com auxílio de uma alça de Drigalsky. Após 10-20 min, quatro discos contendo antibióticos distintos foram dispensados e levemente pressionados sobre o meio

semeado, sendo utilizado um disco de papel de filtro (6 mm de diâmetro) como testemunha. As placas foram mantidas a 28 °C durante 48-72 h e o diâmetro da zona de inibição foi medido (incluindo os 6 mm do disco) e os resultados obtidos foram interpretados de acordo com o diâmetro da zona interpretativa padrão fornecido pelo NCCLS (2003). Os antibióticos que não produziram inibição de Xspp foram avaliados quanto à capacidade de inibição dos isolados de Bast, conforme descrito anteriormente. Os antibióticos que, por sua vez, inibiram os isolados de Bast pelo teste de disco difusão, foram posteriormente avaliados pela incorporação do ingrediente ativo no meio NA. Alíquotas de 100 μL de cada uma das linhagens de Xspp, em concentração aproximada de $1x10^3$ ufc/mL, foram semeadas, em triplicata, em meio contendo diferentes concentrações de antibióticos. Cefaclor, cefadroxil, cefalexina, lincomicina, mupirocina (5, 10, 15, 20, 30 e 45 µg/mL) e nitrofurantoína (50, 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL) foram avaliados e as maiores concentrações, que não inibiram o desenvolvimento de Xspp, foram utilizadas para determinação do seu efeito inibitório sobre os isolados de Bast.

2.2.1.6 Determinação do meio basal para composição do meio semi-seletivo

2.2.1.6.1 Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio

Suspensões bacterianas em solução salina com concentração ajustada a $1x10^3$ ufc/mL, a partir de culturas (*X. vesicatoria* Xspp1 e Xspp2, *X. euvesicatoria* Xspp5 e Xspp6, *X. gardneri* Xspp8 e Xspp9 e *X. perforans* Xspp13) com 48-72 h, foram espalhadas (100 µL) no meio composto de 0,5% de dextrose, 0,1% de KH_2PO_4, 0,04% de $MgSO_4.7H_2O$ e 1,5% de ágar, avaliando-se $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, $NH_4H_2PO_4$ ou peptona, na concentração de 0,1%. Avaliou-se o surgimento ou não de colônias, efetuando-se a contagem das mesmas, quando presentes, para posterior comparação.

2.2.1.6.2 Avaliação de diferentes meios basais

Para determinação da composição do meio basal, foram avaliados alguns meios descritos para *Xanthomonas* e outros meios que foram definidos com base no

requerimento nutricional de bactérias, sendo acrescentados alguns reagentes que pudessem favorecer ou evidenciar as colônias da bactéria alvo. Os seguintes meios foram avaliados para os isolados citados no item 2.2.1.6.1:

Meio 1: (YSG – DESTÉFANO; RODRIGUES NETO, 2002): 0,5% de dextrose, 0,1% peptona, 0,1% de extrato de levedura, 0,85% de NaCl, 0,02% de $MgSO_4.7H_2O$, 0,35% de K_2HPO_4, 0,47% de K_2HPO_4 e 1,5% de ágar;

Meio 2 (CKTM – SIJAM; CHANG; GITAITIS, 1991): 0,2% de peptona de soja, 0,2% de triptona, 0,1% de dextrose, 0,6% de L-glutamina, 0,1% de L-histidina, 0,08% de $(NH_4)_2HPO_4$, 0,1% de KH_2PO_4, 0,04% de $MgSO_4.7H_20$, 0,025% de $CaCl_2$, 1,4% ágar e, após autoclavagem, 10 mL/L de Tween 80 esterilizado;

Meio 3 (mTMB – McGUIRE; JONES; SASSER, 1986): 0,1% de H_3BO_3, 1% de peptona, 1% de KBr, 0,025% de $CaCl_2$, 1,5% de ágar e, após autoclavagem, 10 mL/L de Tween 80 esterilizado;

Meio 4 (YDC – VIDAVER, 1989): 1% de extrato de levedura, 2% de $CaCO_3$, 2% de glicose e 1,5% de ágar;

Meio 5 (NA-Amido): 2,3% de ágar nutriente e 1,2% de amido solúvel;

Meio 6 (ND – SHARON et al., 1982): 2,3% de ágar nutriente e 0,015% de desoxicolato de sódio;

Meio 7 (SX – SHAAD; WHITE, 1974): 1% de amido solúvel, 0,1% de extrato de carne, 0,5% NH_4Cl, K_2HPO_4, 1 mL de solução alcoólica a 20% de violeta de metila 2B a 1%, 1 mL de solução aquosa de verde de metila a 1% e 1,5% de ágar;

Meio 8 (Tween80-ágar – McGUIRE; JONES; SASSER,, 1986): 1% de peptona, 1% de KBr, 0,025% de $CaCl_2$, 1,5% de ágar e, após autoclavagem, 10 mL/L de Tween 80 esterilizado (pH ajustado a 7,2);

Meio 9 (Tween-ágar Modificado – VALARINI, 1995): 1% de peptona, 0,1% de KBr, 0,01% de $CaCl_2$; 1,5% de ágar e, após autoclavagem, 10 mL/L de Tween-80 esterilizado;

Meio 10: 0,5% de dextrose, 0,3% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,08% $(NH_4)_2HPO_4$, 0,1% de KH_2PO_4, 0,04% de $MgSO_4.7H_2O$, 0,5% de KBr, 0,3% de $CaCO_3$ e1,5% de ágar;

Meio 11: Meio 10 acrescido de 1% de Tween-80;

Meio 12: Meio 10 acrescido de 0,001% de desoxicolato de sódio;

Meio 13: 0,5% de dextrose, 0,3% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de KBr, 0,3% de $CaCO_3$ e 1,5 de ágar;

Meio 14: 0,5% de dextrose, 0,2% de peptona, 0,2% de extrato de carne, 0,5% de extrato de levedura, 0,1% de KH_2PO_4, 0,5% de K_2HPO_4, 0,2% $(NH_4)_2SO_4$, 0,05% de solução de micronutrientes (5 mg/L $FeSO_4.7H_2O$, 1,6 mg/L $MnSO_2.H_2O$, 1,4 mg/L $ZnSO_4.7H_2O$ e 2,0 mg/L $CoCl_2$) e 1,5% de ágar;

Meio 15: Meio 14 acrescido de 0,5% de KBr e 1% de Tween 80;

Meio 16: Meio 14 acrescido de 0,5% de KBr e 0,001% de desoxicolato de sódio;

Meio 17 (CKTM + KBr): 0,1% de dextrose, 0,2% de peptona de soja, 0,2% de triptona, 0,6% de L-Glutamina, 0,1% de L-Histidina, 0,08% de $(NH_4)_2HPO_4$, 0,04% de $MgSO_4.7H_2O$, 0,3% de $CaCO_3$, 0,5% de KBr e 1,5% de ágar;

Meio 18 (MMG – TOUSSAINT et al., 2001, modificado): 0,5% de maltose, 0,5% triptona, 0,14% de KH_2PO_4, 0,35% de K_2HPO_4, 0,3% de extrato de carne e 1,5% de ágar;

Meio 19: Meio 18 substituindo-se a triptona por peptona (0,5%);

Meio 20 (Controle): 0,1% de extrato de carne, 0,5% de peptona, 0,2% de extrato de levedura; 0,5% de dextrose, 0,5% de NaCl e 1,5% de ágar.

Os diferentes meios foram semeados com 100 µL de suspensão bacteriana em solução salina, a partir de culturas crescidas por 48-72 h em meio NA, com a concentração ajustada a $1x10^3$ ($1x10^8$ ufc/mL $\Leftrightarrow$ DO = 0,2; λ = 580 nm), mantidas em estufa a 28 °C durante 48-72 h e avaliadas quanto ao surgimento ou não de colônias bacterianas, e também quanto ao tamanho, morfologia e coloração das colônias obtidas.

2.2.1.7 Avaliação do meio semi-seletivo desenvolvido

2.2.1.7.1 Avaliação da repressividade

Para avaliação da repressividade do meio foram utilizadas sete linhagens de Xspp (listadas no item 2.2.1.6.1). Alíquotas de 100 µL da suspensão de cada uma das linhgens de Xspp, em concentração aproximada de $1x10^3$ ufc/mL, foram espalhadas

com auxílio da alça de Drigalky, individualmente e em triplicata, no meio desenvolvido e no meio basal. Após incubação, a 28 °C, durante 48-72 h, procedeu-se a contagem do número de colônias de Xspp. O índice de repressividade (R) foi determinado pela fórmula:

R = 100 – [(média do número de colônias no meio semi-seletivo desenvolvido / média do número de colônias no meio basal) x 100]

A eficiência de recuperação (*plating efficiency*) foi calculada pela fórmula:

ER = 100 x (média do número de colônias no meio semi-seletivo desenvolvido / média do número de colônias no meio basal

2.2.1.7.2 Avaliação da supressividade

Para a determinação do índice de supressividade, realizou-se a extração de microrganismos associados (conforme descrito no item 2.2.1.1) a três amostras diferentes de sementes de tomate, com três subamostras de 12 g cada.

A avaliação consistiu em determinar o crescimento de Xspp e de outros microrganismos no meio semi-seletivo desenvolvido e no meio basal, de modo a se caracterizar a seletividade do meio desenvolvido.

O índice de supressividade (S) foi determinado utilizando-se a mesma fórmula descrita para o cálculo do índice de repressividade (R), descrito no item 2.2.1.7.1.

2.2.1.7.3 Detecção de Xspp pelo método de extração e semeio em meio semi-seletivo

Foram preparadas três amostras com diferentes proporções de sementes portadoras de Xspp. Para isso, sementes de tomate foram inoculadas artificialmente. A inoculação foi realizada pela imersão de 1 g de sementes em 20 mL de uma mistura das suspensões bacteriana das sete linhagens de Xspp citadas no item 2.2.1.6.1, com concentração ajustada para $1x10^7$ ufc/mL. As sementes foram mantidas sob vácuo durante 30 min e secas sobre papel de filtro em temperatura ambiente. Uma semente

inoculada artificialmente foi misturada, respectivamente, a 999, 4999 e 9999 sementes supostamente sadias, em triplicata, constituindo-se três subamostras para cada proporção. Realizou-se a extração das bactérias, conforme descrito no item 2.2.1.1. As diluições obtidas foram espalhadas na superfície do meio semi-seletivo desenvolvido, sendo realizadas três repetições para cada subamostra. As placas foram mantidas a 28 °C, no escuro, e, após 48-72 h, a avaliação foi realizada anotando-se a presença ou ausência de colônias de Xspp no meio semi-seletivo.

2.2.2 Resultados e Discussão

2.2.2.1 Patogenicidade das linhagens Xspp e confirmação da identidade dos isolados Xcv

Todos as linhagens de Xspp provocaram reação de hipersensibilidade em folhas de tomate da cultivar Santa Clara e sintomas característicos de mancha bacteriana em folhas e cotilédones de plântulas de tomate.

A análise de um fragmento do gene rpoB por PCR-RFLP forneceu indícios de que o isolado Xcv06 pertence a *X. gardneri*, o isolado XCV68 a *X. vesicatoria* e o isolado Xcv108 a *X. a.* pv. *vesicatoria*. Com relação à nomenclatura de *X. a.* pv. *vesicatoria* adotada neste estudo, deve ser esclarecido que essa é a classificação atualmente utilizada, porém, que também não é válida de acordo com a lista de validação publicada em 2005 (YOUNG et al., 2005). *X. a.* pv. *vesicatoria* agrupa os representantes de *X. euvesicatoria* e *X. perforans* de acordo com a reclassificação proposta por Jones et al. (2004). Uma vez que os resultados das análises de PCR-RFLP são baseados em comparação do perfil de bandas dos isolados que se deseja conhecer com um perfil padrão, de um isolado conhecido (preferencialmente a linhagem tipo), os ensaios foram restringidos aos perfis das linhagens depositadas na Coleção IBSBF: *X. vesicatoria* (IBSBF 1338[T*]), *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 929[P**]) e *X. gardneri* (IBSBF 1782, IBSBF 1783 e IBSBF 2201).

---

[*] T = Linhagem tipo da espécie
[**] P = Linhagem referência do patovar

2.2.2.2 Isolamento de bactérias e fungos associados a sementes de tomate

A partir da extração das quatro amostras de sementes de tomate, foram isoladas 21 colônias bacterianas associadas a sementes de tomate, com base nas características morfológicas (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Características morfológicas e reação de Gram das bactérias associadas a sementes de tomate (Bast) obtidas pela extração de frutos do comércio local

ISOLADO	CARACTERÍSTICAS DA COLÔNIA	REAÇÃO DE GRAM
1	Amarela escura, translúcida, convexa, gomosa, bordo liso	–
2	Branca, opaca, convexa, bordo liso	+
3	Bege, translúcida, convexa, gomosa, bordo liso	–
4	Amarela clara, opaca, aderente, bordo liso	+
5	Amarela, translúcida, convexa, bordo liso	–
6	Bege clara, opaca, aderente, bordo irregular	+
7	Bege clara, opaca, aderente, bordo liso	–
8	Amarela escura, translúcida, bordo liso	–
9	Bege, opaca, aderente, bordo irregular	–
10	Amarela, translúcida, aderente, bordo liso	–
11	Amarela clara, translúcida, aderente, bordo liso	–
12	Alaranjada, translúcida, bordo liso	–
13	Amarela clara, opaca, aderente, bordo liso	+
14	Branca, opaca, convexa, bordo liso	–
15	Amarela, translúcida, convexa, gomosa, bordo liso	–
16	Bege clara, translúcida, gomosa, bordo liso	–
17	Bege, opaca, convexa, bordo liso	–
18	Amarela, translúcida, saliente, rugosa, bordo liso	–
19	Amarela, opaca, bordo liso	–
20	Amarela escura, opaca, aderente, bordo liso	–
21	Amarela, opaca, convexa, bordo liso	–

Das bactérias isoladas, 17 são Gram-negativas e 4, Gram-positivas. Para realização dos testes de sensibilidade a antibióticos foram selecionados dez isolados, com base, principalmente, na velocidade de crescimento e características morfológicas distintas ou muito semelhantes às linhagens de Xspp. Os isolados utilizados foram: Bast1, Bast3, Bast4, Bast6, Bast9, Bast10, Bast11, Bast13, Bast 15 e Bast18.

Os resultados dos testes de sanidade das quatro amostras de sementes de tomate, a partir das quais foram isolados os fungos associados a sementes de tomate são, mostrados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Relação, incidência e freqüência dos fungos isolados das sementes de tomate

FUNGO	INCIDÊNCIA (%)				INCIDÊNCIA MÉDIA (%)	FREQÜÊNCIA
	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4		
Cladosporium sp.	32,8	30,3	21,5	13,0	24,4	1,00
Rhizopus sp.	31,8	28,0	5,5	5,6	17,7	1,00
Penicillium sp.	16,5	22,5	3,5	1,7	11,0	1,00
Epicocum sp.	5,0	1,8	2,5	21,5	7,7	1,00
Fusarium sp.	2,0	2,0	2,5	7,9	3,6	1,00
Indet. (picnídio)	0,5	0,5	0,3	12,4	3,4	1,00
Alternaria sp.	3,5	3,5	5,8	0,6	3,3	1,00
Curvularia sp.	0,5	0,0	0,0	10,2	2,7	0,50
Indeterminado	2,0	1,0	0,0	0,0	0,8	0,50
Phoma sp.	0,0	2,0	0,0	0,0	0,5	0,25
Pithomyces sp.	0,0	1,8	0,3	0,0	0,5	0,50
Periconia sp.	0,0	1,8	0,0	0,0	0,4	0,25
Dreshslera sp.	0,3	1,0	0,3	0,0	0,4	0,75
Aspergillus sp.	0,3	0,3	0,8	0,0	0,3	0,75
Pestalotia sp.	0,0	0,8	0,0	0,0	0,2	0,25
Diplodia sp	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,25

Verificou-se que os fungos de maior incidência e freqüência foram *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Epicocum* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. e um isolado formador de picnídio, cujo o gênero não foi possível determinar, sendo estes indicados para a avaliação da fungitoxicidade *in vitro*.

2.2.2.3 Fungitoxicidade *in vitro* para as linhagens de Xspp e fungos associados a sementes de tomate

Nenhum dos fungicidas escolhidos, nas concentrações analisadas, interferiu no crescimento das linhagens de Xspp avaliadas, sendo então utilizados para os testes de fungitoxicidade *in vitro* (Tabela 2.3). Os fungos utilizados foram *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp., uma vez que estão entre os fungos de maior incidência e/ou freqüência e são os mais preocupantes devido à grande velocidade de crescimento que apresentam em meio NA. Os isolados de *Epicocum* sp. e do fungo formador de picnídio, apesar de apresentarem alta incidência e freqüência, não foram utilizados nas avaliações por não terem se desenvolvido bem no meio NA.

Tabela 2.3 – Fungitoxicidade *in vitro* para os fungos associados a sementes de tomate expresso em ED_{50} (concentração, em ppm, de fungicida necessária para inibir em 50% o crescimento micelial dos isolados)

FUNGICIDA	ED_{50} (ppm INGREDIENTE ATIVO)*					
	Alternaria sp.	*Aspergillus* sp.	*Cladosporium* sp.	*Fusarium* sp.	*Penicillium* sp.	*Rhizopus* sp.
Benomil	<10	<10	<10	<10	<10	>100
Triadimenol	<10	>100	<10	>100	>100	33,5
Captana	<10	>100	>100	>100	>100	>100
Clorotalonil	<10	>100	>100	91,7	>100	>100
Nistatina	<10	<10	<10	50,7	>100	<10
Iprodione	<10	>100	<10	52,5	>100	<10
Carboxina/Tiram	<10	>100	<10	>100	<10	46,0

Os dados obtidos na Tabela 2.3, revelaram que nenhum dos fungicidas utilizados individualmente, foi capaz de controlar simultaneamente o crescimento de todos os fungos avaliados. Verificou-se que benomil foi eficiente (ED_{50} < 10ppm) para cinco dos seis isolados avaliados, sendo que este fungicida foi ineficiente para o controle de *Rhizopus* sp. A nistatina também foi altamente eficiente para o controle de cinco dos isolados avaliados, incluindo *Rhizopus* sp., porém foi ineficiente para o controle de *Penicillium* sp. Diante disso, a associação de benomil e nistatina foi considerada para a formulação do meio semi-seletivo para a detecção de Xspp causadoras da mancha bacteriana do tomateiro.

2.2.2.4 Sensibilidade das linhagens de Xspp e isolados de Bast a antibióticos

Os resultados do antibiograma qualitativo de *X*spp são mostrados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Sensibilidade *in vitro* de Xspp, agente causal da mancha bacteriana do tomateiro, a antibióticos, avaliada pelo teste de disco-difusão em ágar (continua)

ANTIBIÓTICO	µg/DISCO	LINHAGENS DE *Xanthomonas* spp. (Xspp)									
		1[1]	3	4	5	7	8	9	10	11	12
Ac. Nalidíxico	30	S[2]	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Ac. Pipemídico	20	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Amicacina	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Amoxicilina	10	s	s	s	R	s	s	s	s	s	R
Ampicilina	10	s	s	s	R	s	s	s	s	s	R
Azitromicina	15	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Aztreonan	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s

Tabela 2.4 – Sensibilidade *in vitro* de Xspp, agente causal da mancha bacteriana do tomateiro, a antibióticos, avaliada pelo teste de disco-difusão em ágar (continua)

ANTIBIÓTICO	µg/DISCO	LINHAGENS DE *Xanthomonas* spp. (Xspp)									
		1[1]	3	4	5	7	8	9	10	11	12
Bacitracina	10 UI[3]	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Canamicina	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Carbenicilina	100	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Cefaclor	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefadroxil	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalexina	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefalotina	5	R	R	R	R	s	R	R	R	R	R
Cefazolina	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefepime	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Cefipiroma	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Cefitriaxona	30	R	s	s	R	s	s	s	s	s	s
Cefixime	5	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R
Cefotaxima	30	s	s	s	R	s	s	s	s	s	R
Cefoxitina	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Ceftazidima	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Cefuroxima sódica	30	s	s	R	R	s	s	s	s	R	R
Ciprofloxacina	5	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Claritromicina	15	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Clindamicina	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cloranfenicol	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Cotrimoxazol	30	s	s	s	s	R	R	R	s	s	R
Eritromicina	15	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Espectinomicina	25	R	R	R	R	R	s	s	R	R	R
Estreptomicina	10	R	R	R	R	s	R	R	s	R	s
Fosfomicina	200	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Gentamicina	10	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Imipenema	10	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R
Lincomicina	10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Lomefloxacina	10	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Mupirocina	5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Neomicina	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Nitrofurantoína	300	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Norfloxacina	10	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Novobiocina	5	R	s	R	s	s	R	R	R	R	s
Ofloxacina	5	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Oxacilina	1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Oxitetraciclina	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Pefloxacina	5	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Penicilina	10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Polimixina B	300 UI	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Rifampicina	5	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s

Tabela 2.4 – Sensibilidade *in vitro* de Xspp, agente causal da mancha bacteriana do tomateiro, a antibióticos, avaliada pelo teste de disco-difusão em ágar (conclusão)

ANTIBIÓTICO	μg/DISCO	LINHAGENS DE *Xanthomonas* spp. (Xspp)									
		1[1]	3	4	5	7	8	9	10	11	12
Sulfafurazole	100	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R
Sulfametoxazole	25	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R
Sulfonamidas	300	R	R	R	R	R	R	R	s	s	R
Tetraciclina	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Tic[4] + Ac. Clavulânico	85+30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Ticarcilina	75	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Tobramicina	10	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Vancomicina	30	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s

[1] Xspp1, Xspp3 e Xspp4 = *X. vesicatoria*; Xspp5 = *X. euvesicatoria*; Xspp7, Xspp8 e Xspp9 = *X. gardneri*;
[2] s = sensível, R = resistente, de acordo com NCCLS (2003);
[3] UI = Unidades Internacionais;
[4] Tic = Ticarcilina

Verificou-se que houve variação entre as linhagens de Xspp quanto à sensibilidade aos antibióticos avaliados. De forma geral, não foram apresentados padrões distintos de resposta quando considerada cada espécie isoladamente.

Cefaclor, cefadroxil, cefalexina, cefazolina, clindamicina, lincomicina, mupirocina, nitrofurantoína, oxacilina e penicilina foram ineficientes contra todos as linhagens avaliadas de Xspp e cefalotina inibiu apenas o crescimento da linhagem Xspp5. Resistência a alguns destes antibióticos foram descritas para algumas espécies do gênero *Xanthomonas*. Dezordi et al. (2005) descreveram a resistência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a cefadroxil, cefalexina, lincomicina, nitrofurantoína e oxacilina; Romeiro et al. (1998) relataram resistência de *X. vesicatoria* a cefalotina, lincomicina, nitrofurantoína e oxacilina; de *X. campestris* pv. *passiflorae* a amoxicilina, ampicilina, cefadroxil, cefalexina, cefaclor, canamicina, oxacilina, penicilina, sulfatiazole, sulfazotrim, e sulfonamida e de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* a bacitracina, cefalexina, cefalotina, fosfomicina, eritromicina, canamicina, nitrofurantoína e oxacilina. Dos antibióticos para os quais as dez linhagens de Xspp foram resistentes, cefaclor, cefadroxil, cefalexina, lincomicina, nitrofurantoína e penicilina também foram ineficientes para, pelo menos, uma das espécies de *Xanthomonas* citadas acima, sendo que apenas oxacilina foi ineficiente contra todas as linhagens.

Os antibióticos ineficientes para o controle das linhagens de Xspp foram utilizados para a realização do teste de disco-difusão em ágar para os isolados de Bast. A sensibilidade de Bast aos antibióticos selecionados no teste de disco-difusão para Xspp é apresentada na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Sensibilidade *in vitro* de bactérias associadas a sementes de tomate (Bast) a antibióticos avaliada pelo do teste de disco-difusão em ágar

ANTIBIÓTICO	μg/DISCO	ISOLADOS DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A SEMENTES DE TOMATE (Bast)									
		2	3	4	6	9	10	11	13	15	18
Cefaclor	30	R*	R	s	R	R	S	s	R	R	s
Cefadroxil	30	s	R	s	s	s	R	s	R	R	s
Cefalexina	30	s	R	s	s	s	S	s	R	R	s
Cefalotina	5	R	R	s	R	R	R	s	R	R	s
Cefazolina	30	R	R	s	R	R	R	R	R	R	s
Clindamicina	2	s	R	R	R	s	R	R	R	R	R
Lincomicina	10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Mupirocina	5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Nitrofurantoína	300	s	R	s	s	R	R	s	s	R	R
Oxacilina	1	R	R	s	R	R	R	R	R	R	s
Penicilina	10	R	R	s	R	R	R	R	R	R	R
Sulfonamidas	300	R	s	s	R	R	R	s	R	s	s

* R = resistente; s = sensível, de acordo com NCCLS (2003)

Como observado para as linhagens de Xspp, verificou-se que houve grande variação entre os isolados de Bast quanto à sensibilidade para cada antibiótico, com exceção de lincomicina e mupirocina, para os quais todos os isolados se mostraram resistentes. Não se constatou nenhum antibiótico que tenha sido eficiente, isoladamente, contra todos os isolados de Bast. Para o antibiótico cefalexina, sete dos dez isolados foram sensíveis; cefadroxil foi eficiente para o controle de seis dos isolados e, nitrofurantoína e sulfonamidas controlaram cinco dos dez isolados avaliados.

De modo geral, entretanto, verificou-se que os isolados de Bast apresentaram padrão de resistência aos antibióticos avaliados semelhantes ao apresentado pelas linhagens de Xspp. Acredita-se que isso possa ser devido aos isolados Bast estarem sujeitos às mesmas pressões seletivas que as linhagens de Xspp ou pela transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos. Alguns genes de resistência podem se

movimentar entre bactérias de diferentes ambientes, quando juntas num dado momento (SEVENO et al, 2002). Estes, por sua vez, podem estar associados a elementos genéticos móveis, como plasmídeos, elementos transponíveis ou integrons (HALL, 1997; ROWE-MAGNUS; MAZEL, 1999). Outros mecanismos de aquisição de resistência a antibióticos que podem ser citados são a transformação e a transdução, os quais não requerem células doadoras e receptoras presentes no mesmo lugar ou sempre ao mesmo tempo (OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000).

Embora nenhum dos antibióticos avaliados tenha sido eficiente no controle simultâneo dos dez isolados de Bast, concentrações superiores às determinadas nos discos foram avaliadas pelo antibiograma quantitativo. Apenas os antibióticos cefaclor, cefadroxil, cefalexina, lincomicina e mupirocina foram avaliados no antibiograma quantitativo (Tabela 2.6), uma vez que os mesmos apresentam possibilidades práticas para utilização em meios semi-seletivos, como a facilidade de aquisição no comércio, por serem de ampla utilização clínica e baixo custo. Alguns dos antibióticos selecionados foram descartados por não serem comercializados, como no caso de cefazolina e oxacilina, por pertencerem à mesma classe de algum dos antibióticos citados (como no caso de clindamicina que pertence à classe de lincomicina; ambos são da classe das Lincosaminas) ou por não terem o ingrediente ativo especificado, como no caso de sulfonamidas, cujo nome utilizado pelo fabricante dos discos se refere a uma classe de antibióticos.

Tabela 2.6 – Sensibilidade *in vitro* de *Xanthomonas* spp., agente causal da mancha bacteriana do tomateiro, a antibióticos adicionados ao meio de cultura em diferentes concentrações (continua)

ANTIBIÓTICO	μg/mL	LINHAGENS DE *Xanthomonas* spp.									
		1*	3	4	5	7	8	9	10	11	12
Cefaclor	0	+**	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+

Tabela 2.6 – Sensibilidade *in vitro* de *Xanthomonas* spp., agente causal da mancha bacteriana do tomateiro, a antibióticos adicionados ao meio de cultura em diferentes concentrações (conclusão)

ANTIBIÓTICO	μg/mL	LINHAGENS DE *Xanthomonas* spp.									
		1*	3	4	5	7	8	9	10	11	12
Cefadroxil	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
Cefalexina	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+
	10	+	+	+	±	±	±	+	+	+	+
	15	+	+	+	±	±	±	+	+	+	+
	20	±	+	+	±	±	±	+	+	±	+
	30	±	+	+	±	±	±	±	+	±	+
	45	±	±	+	±	±	±	±	+	±	+
Lincomicina	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mupirocina	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
	30	+	+	–	+	–	–	–	+	–	+
	45	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Nitrofurantoína	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	50	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	100	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	200	–	±	±	–	±	±	±	±	±	±
	300	–	–	–	–	–	–	±	±	–	–
	450	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	500	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

* Xspp1, Xspp3 e Xspp4 = *X. vesicatoria*; Xspp5 = *X. euvesicatoria*; Xspp7, Xspp8 e Xspp9 = *X. gardneri*; Xspp10, Xspp11 e Xspp12 = *Xanthomonas* spp.;

** + = crescimento; ± = interferência no tamanho das colônias (colônias menores); – = ausência de crescimento.

Dos antibióticos avaliados, apenas lincomicina não afetou o crescimento de todos as linhagens de Xspp em nenhuma das concentrações avaliadas, de forma que concentrações superiores (como 50, 60, 70, 80, 90 e 100 μg/mL) podem ser incluídas nesse estudo. Cefadroxil, cefaclor e mupirocina, nas concentrações de 30, 30 e

15 μg/mL, respectivamente, também não afetaram o crescimento das linhagens de Xspp. Cefalexina e nitrofurantoína afetaram o crescimento destas mesmo nas menores concentrações avaliadas (5 e 50 μg/mL, respectivamente).

Salienta-se que a menor concentração de cefalexina que não afetou os isolados de Xspp foi menor que a comumente relatada para *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana em tomate. McGuire, Jones e Sasser (1986) e Sijam.; Chang e Gitaitis (1991), por exemplo, recomendam o uso de 65 µg/mL para isolamento desses patógenos. Este antibiótico é agente de seletividade a bactérias saprofíticas em vários outros meios descritos para *Xanthomonas* sp.; Mehta; Bomfeti e Bolognini (2005) recomendam o uso de 10 µg/mL para o meio desenvolvido para *X. axonopodis* pv. *malvacearum*; Pruvost et al. (2005), para *X. campestris* pv. *magiferaindicae*, recomendam 40 µg/mL; Roumagnac; Gagnevin e Pruvost (2000) para *X. axonopodis* pv. *allii* em sementes de cebola, 30 µg/mL, Davis et al. (1994), para *Xanthomonas albilineans*, 25 µg/mL, Claflin; Vidaver e Sasser (1987) e Maringoni; Kimati e Kurozawa (1994), para *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, 20 e 30 µg/mL, respectivamente; Schaad e Foster (1985), para *X. translucens* pv. *translucens*, 10 µg/mL, entre outros. Tal constância no uso de cefalexina para o isolamento de bactérias do gênero *Xanthomonas* sugere a existência de resistência intrínseca desse gênero a esse antibiótico. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo sugerem a necessidade de novas investigações, uma vez que não há nada descrito para os isolados bacterianos em questão.

As maiores concentrações dos antibióticos que não afetaram o crescimento de Xspp foram avaliadas quanto à inibição de Bast (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 – Sensibilidade *in vitro* dos isolados de Bast a antibióticos adicionados ao meio de cultura em concentrações não-inibitórias para os isolados de Xspp

ANTIBIÓTICO	**μg/mL**	**ISOLADOS DE BAST**									
		2	**3**	**4**	**6**	**9**	**10**	**11**	**13**	**15**	**18**
Cefaclor	**20**	+*	+	–	–	–	–	–	–	+	–
Cefadroxil	**30**	+	+	±	–	–	±	–	±	+	–
Cefalexina	**5**	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+
Lincomicina	**45**	+	+	±	±	–	+	+	+	+	+
Mupirocina	**15**	+	–	–	+	+	±	±	+	+	±
Nitrofurantoína	**45**	+	+	–	–	–	+	–	+	+	+

* + = crescimento; ± = interferência no tamanho das colônias (colônias menores); – = ausência de crescimento

Verificou-se que nenhum dos antibióticos e concentrações inibiu simultaneamente o crescimento de todos os isolados de Bast avaliados. Nota-se, no entanto, que cefaclor (20 μg/mL) inibiu sete dos dez isolados avaliados e que mupirocina inibiu o crescimento de dois isolados, incluindo um isolado não afetado pelo cefaclor. Os isolados Bast2 e Bast15 não foram afetados por nenhum dos antibióticos nas concentrações avaliadas. Uma vez que o isolado Bast2 possui características bem distintas daquelas apresentadas por Xspp, incluindo coloração e aspecto da colônia diferentes, apenas o isolado Bast15 mereceu especial consideração. Por se tratar de isolado muito parecido com as linhagens de Xspp, Bast15 foi avaliado quanto à patogenicidade em plântulas de tomates. Constatada a reação de hipersensibilidade em plântulas de tomate, optou-se por excluí-lo do grupo de Bast.

A associação dos antibióticos cefaclor e mupirocina, nas concentrações de 30 e 15 μg/mL, respectivamente, foi inibitória às linhagens de Xspp, com exceção de Xspp13 (*X. perforans*). Outras proporções avaliadas (30μg/mL cefaclor: 10 e 5 μg/mL de mupirocina e mupirocina 15 μg/mL: 5, 10 e 20 μg/mL de cefaclor) também foram inibitórias, de modo que estes antibióticos não puderam ser utilizados juntos na composição do meio semi-seletivo desenvolvido. Diante disso, cefaclor na concentração de 40 μg/mL foi escolhido para a composição do meio semi-seletivo para Xspp.

2.2.2.5 Determinação do meio basal para composição do meio semi-seletivo

2.2.2.5.1 Utilização de fontes de nitrogênio

Verificou-se que nenhuma das linhagens de Xspp foi capaz de crescer em meio definido contendo apenas fontes inorgânicas de nitrogênio ($(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl ou $NH_4H_2PO_4$), porém todas elas desenvolveram no meio contendo peptona.

2.2.2.5.2 Avaliação de diferentes meios

Os resultados da avaliação de diferentes meios para o crescimento de Xspp são mostrados na Tabela 2.8.

Tabela 2.8 – Média do número de colônias nos diferentes meios basais avaliados

MEIOS	LINHAGENS DE Xspp[1]						
	1	2	5	6	8	9	13
1	117[2]bc[3]	115c	108def	107ef	121bcd	112cd	117ab
2	104c	114c	110cdef	105fg	122bc	101d	126ab
3	21d	111c	121abcd	111def	122bc	116cd	115ab
4	14d	111c	100ef	84g	86fg	16e	110b
5	11d	114c	113cdef	30h	14h	8e	130a
6	9d	10d	25g	11h	12h	7e	116ab
7	115c	116bc	118abcde	11h	4h	9e	124ab
8	114c	117bc	98f	106f	78g	114cd	115ab
9	12d	13d	27g	27h	8h	7e	117ab
10	112c	134abc	123abcd	149ab	110cd	120cd	118ab
11	102c	111bc	111cdef	135abc	109cd	134bc	116ab
12	104c	142abc	129abc	134abc	122bc	109d	113ab
13	100c	108c	120abcd	127cde	95ef	111cd	110b
14	123abc	169a	131ab	151a	108de	105d	118ab
15	12d	15d	17g	12h	12h	9e	12c
16	151a	168a	134a	133abc	121bcd	158a	124ab
17	143ab	161ab	123abcd	129bcd	126ab	134bc	108b
18	129abc	157abc	110cdef	132abcd	121bcd	160a	120ab
19	141ab	171a	120abcd	135abc	121bcd	159a	125ab
20	139ab	168a	137a	124cdef	137a	154ab	125ab

[1] Xspp1 e Xspp2 = *X. vesicatoria*; Xspp5 e Xspp6 = *X. euvesicatoria*; Xspp8 e Xspp9 = *X. gardneri*; Xspp13 = *X. perforans*
[2] média de 3 repetições
[3] Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%

Dentre os meios avaliados, não houve nenhum que favorecesse, individualmente, o desenvolvimento de todas as linhagens analisadas. De forma geral, os meios 14, 16, 19 e 20 apresentaram as maiores médias de ufc/placa. Diante disso, optou-se por manter o meio NA como meio basal devido a facilidade de preparo e custo relativamente baixo do mesmo.

2.2.2.6 Avaliação do meio semi-seletivo desenvolvido

Com base nos resultados demonstrados anteriormente, o meio semi-seletivo desenvolvido teve a seguinte composição: dextrose (5,0 g/L), NaCl (5,0 g/L), KH_2PO_4 (1,4 g/L), K_2HPO_4 (3,6 g/L), extrato de carne (1,0 g/L), peptona (5,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L) e ágar (14,0 g/L); após autoclavagem foram acrescentados os

agentes de seletividade cefaclor (40,0 mg/L), nistatina (50,0 mg/L) e benomil (10,0 mg/L). Nesse meio, as colônias de Xspp eram lisas, de coloração amarelada e bordos lisos e apresentaram bastante produção de goma.

2.2.2.6.1 Avaliação da repressividade e supressividade

Nas Tabela 2.9 e 2.10 são apresentados os resultados de repressividade e supressividade, respectivamente, do meio semi-seletivo desenvolvido.

Tabela 2.9 – Número médio de colônias/placa para cada isolado nos meios basal e semi-seletivo e valor de repressividade

LINHAGENS Xspp*	MEIO BASAL	MEIO SEMI-SELETIVO	REPRESSIVIDADE (%)	EFICIÊNCIA DE RECUPERAÇÃO (%)
1	129**	128	1,0	99
2	178	169	5,2	94,8
5	90	76	15,9	84,1
6	324	315	2,7	97,3
8	94	92	2,7	97,2
9	160	190	- 18,54	118,5
13	121	123	- 1,93	101,9

* Xspp1 e Xspp2 = *X. vesicatoria*; Xspp5 e Xspp6 = *X. euvesicatoria*; Xspp8 e Xspp9 = *X. gardneri*; Xspp13 = *X. perforans*
** média de 3 repetições

De acordo com os resultados obtidos, o meio semi-seletivo desenvolvido apresentou repressividade entre 1 e 15% para as linhagens avaliadas, sendo a repressividade média de 4%, aproximadamente. A eficiência média de recuperação no meio semi-seletivo foi entre 84 e 118,5%, com média de 98,9%.

Os resultados do teste de repressividade são mostrados na Tabela 2.10.

Tabela 2.10 – Número de colônias/placa de bactérias extraídas de sementes de tomate em meio basal (testemunha) e no meio semi-seletivo desenvolvido e índice de supressividade (% inibição)

AMOSTRA	MEIO BASAL	MEIO SEMI-SELETIVO	SUPRESSIVIDADE
1	315*	154	51,1
2	368	198	46,1
3	327	165	49,5

*Média de três repetições

Para as três amostras avaliadas, o meio semi-seletivo apresentou supressividade em torno de 50%. Nas três subamostras (e três repetições/amostra) foram distinguidos dois de tipos de colônias brancas, Gram-negativas, sendo uma de aspecto e bordo lisos e outra rugosa, com bordo irregular. Comparando-se o crescimento destas bactérias no meio semi-seletivo com o do meio basal, verificou-se que ambas as bactérias apresentaram crescimento lento e desenvolveram colônias pequenas no meio semi-seletivo. Isto indica que, apesar de não haver inibição do crescimento destas bactérias, os agentes de seletividade retardaram o crescimento das mesmas. Salienta-se que, embora abundantes no meio semi-seletivo, a presença destas bactérias não mascarou a presença de Xspp nas amostras, fato este verificado nos ensaios de detecção de Xspp pelo método de extração e semeio.

No desenvolvimento de um meio semi-seletivo, a ausência de repressividade (ou repressividade muito baixa) e supressividade elevada são características muito desejáveis. Porém, isso quase sempre não é conseguido. Embora sejam escolhidos apenas agentes de seletividade que sejam ineficientes contra os microrganismos alvos, verificou-se que quando misturados esses agentes apresentam efeito negativo, ainda que pequeno, sobre o crescimento dos mesmos. Tal fato é também observado por outros autores.

Toussaint; Morris e Carisse (2001) relataram que a recuperação de *X. axonopodis* pv. *vitians* foi muito menor no meio seletivo desenvolvido (MMG) quando comparado a um meio não-seletivo. No entanto, os autores salientam que em meio não-seletivo seria quase impossível identificar e quantificar a bactéria alvo, devido ao grande número de microrganismos saprofíticos com desenvolvimento mais rápido no meio de cultura do que as bactérias do gênero *Xanthomonas*, que dificultam o crescimento do patógeno. Fessehaie; Wydra e Rudolph (1999) obtiveram eficiência média de recuperação de 85 e 50% nos meios CTA e SXM desenvolvidos para a detecção de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, ou seja, uma taxa de repressividade média em torno de 15 e 50%, respectivamente. Para o meio semi-seletivo desenvolvido para a detecção de *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, Mehta; Bomfeti e Bolognini (2005) obtiveram uma eficiência média de recuperação de aproximadamente 98,1% para a bactéria alvo e de 75% para linhagens de *Xanthomonas* spp. não-alvos, evidenciando a semi seletividade

do meio desenvolvido. A eficiência média de recuperação de *Burkholderia glumae* no meio CCNT foi de aproximadamente 70% (KAWARADANI; OKADA; KUSAKARI, 2000) e de *X. oryzae* pv. *oryzae* (MING et al., 1991), foi reduzida em 13% quando comparado o meio XOS com o XOS basal. Para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (FATMI; SCHAAD, 1988) eficiência de recuperação foi em média 107% para a bactéria alvo e 98% para as bactérias saprofíticas, respectivamente. Mohan e Schaad (1987) tiveram eficiência de recuperação média de 105% para *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e redução em mais de 90% do crescimento de bactérias saprofíticas.

Diante do exposto, verificou-se que o meio semi-seletivo desenvolvido apresentou alta eficiência de recuperação e índice de supressividade satisfatório, quando comparado aos meios descritos para detecção de bactérias em sementes.

2.2.2.6.2 Detecção de Xspp pelo método de extração e semeio em meio semi-seletivo

Foi verificada a recuperação de Xspp nas três proporções de sementes analisadas.

No presente trabalho, a alta taxa de recuperação de Xspp, observada nas amostras de sementes, reflete o sucesso do método de extração, bem como a baixa repressividade do meio semi-seletivo desenvolvido. Sucesso na extração também foi relatado por Kawaradani; Okada e Kusakari (2000) para a recuperação de *Burkholderia glumae* em sementes de arroz, por Romeiro; Moura e Monteiro (1998), para detectar e isolar *X. campestris* em sementes de girassol, por Romeiro et al. (1993), para detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro, por Moura e Romeiro (1993), para detectar e isolar *P. syringae* pv. *lachrymans* em lotes de sementes de pepino, por Ming et al. (1991), para a recuperação de *Xanthomonas* spp. em sementes de arroz, por Fatmi e Schaad (1988), para a recuperação de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em sementes de tomate naturalmente contaminadas e lotes comerciais, e por Mohan e Schaad (1987), para a recuperação de *P. syringae* pv. *syringae* em sementes de feijoeiro, entre outros.

Embora os meios semi-seletivos sejam úteis para a detecção e identificação presuntiva de certos patógenos associados a sementes, não há meios descritos para *X.*

axonopodis pv. *vesicatoria*, tampouco no que diz respeito aos quatro grupos (A, B, C e D) ou quatro espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro. Não existem ferramentas moleculares disponíveis para detecção dos patógenos em testes de rotina e com relação às técnicas serológicas, tal como ELISA, para as quais existem alguns kits comerciais (ALVAREZ, 2004), são apresentadas algumas desvantagens com relação à sensibilidade, especificidade e viabilidade do patógeno.

Deve-se considerar que, embora os meios semi-seletivos aumentem as chances de sucesso no isolamento do patógeno, eles não são de valor diagnóstico definitivo. O aperfeiçoamento dos métodos de amostragem e extração do patógeno das sementes, associado a modos rápidos e específicos de identificação da bactéria isolada no meio são imprescindíveis para tornar os testes de sementes mais eficientes e confiáveis (MOHAN; SCHAAD, 1987).

Para avaliação de sementes de tomate para Xspp, o seguinte método é recomendado. Três amostras de 12 g de sementes devem ser imersas em 100 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) e mantidas a 4ºC durante 12 h. Após incubação, as amostras devem ser colocadas sob agitação durante 30 min em temperatura ambiente e filtradas em gaze esterilizada (para retenção de sementes e impurezas maiores). O filtrado deve ser centrifugado a 10000 *g* durante 15 min e o sedimento, para cada subamostra, ressuspendido em 5 mL de solução salina esterilizada. Cem μL de diluições 10^{-6}, 10^{-7} e 10^{-8} até 10^{-8} em água destilada esterilizada devem ser espalhados na superfície do meio semi-seletivo com auxílio de alça de Drigalsky, em triplicata.

Após incubação, a 28 °C durante 48-72 h, seria ideal que as colônias suspeitas, com características de *Xanthomonas*, fossem avaliadas quanto ao teste de Gram e patogenicidade em plântulas de tomate ou qualquer outro método para confirmação da identidade do patógeno.

2.3 Conclusões

O meio de cultura semi-seletivo desenvolvido mostra baixa repressividade a *Xanthomonas* spp. e supressividade moderada aos microrganismos não-alvos associados a sementes de tomate, apresentando alta sensibilidade e baixo custo.

O meio semi-seletivo desenvolvido tem a seguinte composição: dextrose (5,0 g/L), NaCl (5,0 g/L), KH_2PO_4 (1,4 g/L), K_2HPO_4 (3,6 g/L), extrato de carne (1,0 g/L), peptona (5,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), cefaclor (40,0 mg/L), nistatina (50,0 mg/L), benomil (10,0 mg/L) e ágar (14,0 g/L).

Referências

ALVAREZ, A.M. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 339-66, 2004.

BARNET, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4th ed. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 1998. 218 p.

BEHLAU, F.; NUNES, L.M.; LEITE JR., R.P. Meio de cultura semi-seletivo para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo e sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 394-396, 2006.

CLAFLIN, L.E.; VIDAVER, A.K.; SASSER, M. MXP, a semi-selective medium for *Xathomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, n. 5, p. 268-272, 1987.

CUPPELS, D.; KELMAN, A. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil ant plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, p. 468-475, 1974.

DAVIS, M.J.; ROTT, P.; BAUDIN, P.; DEAN, J.L. Evaluation of selective media and immunoassays for detection of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of sugarcane leaf scald disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, n. 1, p. 78-82, 1994.

DESTEFANO, S.A.L; RODRIGUES NETO, J. Rapid differentiation of *Xanthomonas* strains causing disease in citrus plants based on polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 167-172, 2002.

DEZORDI, C.; MARINGONI, A.C.; MENTEN, J.O.M.; CÂMARA, R.C.; MORAES, M.H.D.; NEVES, D.A. Avaliação de sensibilidade *in vitro* de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a antibióticos de uso clínico. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, supl., p. 35, 2005.

EDGINGTON, L.V.; KHEN, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, p. 42-44, 1971.

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes.** Surred: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608 p.

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes.** Surred: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 507 p.

FATMI, M.; SCHAAD, N.W. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 1, p. 121-126, 1988.

FESSEHAIE, A.; WYDRA, K.; RUDOLPH, K. Development of a new semiselective medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 7, p. 591-597, 1999.

FNP CONSULTORIA E AGROINFORMATIVOS. Tomate. In: _____. **Agrianual 2005**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2005. p. 495-502.

HALL, R.M. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria. **CIBA Foundation Symposium,** London**,** v**.** 207, p. 192-205, 1997.

JONES, J.B.; LACY, G.H.; BOUZAR, H.; STALL, R.E.; SCHAAD, N.W. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematics Applied Microbiology,** Dordrecht**,** v. 27, p. 755–762, 2004.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Semiselective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-76, 1970.

KAWARADANI, M.; OKADA, K.; KUSAKARI, S. New selective medium for isolation of *Burkholderia glumae* from rice seeds. **Journal of General Plant Pathology**, Toquio, v. 66, p. 234-237, 2000.

KIM, H.M.; SCHAAD, N.W. Modified tween medium for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, p. 1140, 1989.

KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. (Ed.). **Methods in phytobacteriology.** Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. 568 p.

KRUPPA, P.C. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes e no interior de frutos de tomateiro pelo uso de meios de cultura semi-seletivos.** Botucatu, 1993. 71p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, 1993.

LUCA-FILHO, O.A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; SILVA-WETZEL, M.M.V. (Ed.) **Patologia de sementes.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 276-298

MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Científica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 277-288, 1994.

MARTHUR, S.B.; KONGSDAL, O. **Common laboratory seed health testing methods for detection fungi.** Basserdorf: International Seed Testing Association, 2003. 425 p.

McGUIRE, R.G.; JONES, J.B.; SASSER, M. Tween media for semi-selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. **Plant Desease**, Saint Paul, v. 70, p. 887-891, 1986.

MEHTA, Y.R.; BOMFETI, C.; BOLOGNINI, V. A semi-selective medium to detect the presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in naturally infected cotton seed. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p. 489-496, 2005.

MENTEN, J.O.M.; MACHADO, C.C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, p. 55-66, 1976.

MING, D.; YE, H.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. Selective recovery of *Xanthomonas* spp. from rice seed. **Phytopathology**, Saint. Paul, v. 81, n. 11, p. 1358-1363, 1991.

MOHAN, S.K.; SCHAAD, N.W. Semiselective agar media for isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* pathogenic to bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, p. 1351, 1985.

MOHAN, S.K.; SCHAAD, N.W. An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, n. 10, p. 1390-1395, 1987.

MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S. Detecção e quantificação de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em lotes de sementes de pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 15, p. 183-186, 1993.

NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests:** approved standard – 8th ed. (NCCLS document M2-A8/ISBN 1-56238-485-6). Pennsylvania, 2003. p.1887-1898.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J.G.; GROISMAN, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, London, v. 405, p. 299-304, 2000.

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

PARISI, J.J.D.; MALAVOLTA, V.M.A.; LEONEL, F.L. Controle químico de fungos em sementes de arroz (*Oryza salival* L.) **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 4, p. 403-409, 2001.

PRUVOST, O.; ROUMAGNAC, P.; GAUBE, C.; CHIROLEU, F.; GAGNEVIN, L. New media for the semiselective isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, p. 803-815, 2005.

RANDHAWA, P.S.; SCHAAD, N.W. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 3, p. 268-272, 1984.

ROMEIRO, R.S.; MOURA, A.B.; OLIVEIRA, J.R.; SILVA, H.S.A.; BARBOSA, L.S.; SOARES, F.M.P.; PERES, F. Evidences of constitutive multiples resistance to antibiotics in some plant pathogenic bacteria. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 24, n. 3/4, p. 220-225, 1998.

ROMEIRO, R.S.; MOURA, A.B.; MONTEIRO, A.J. A bioassay for detection and quantification of *Xanthomonas campestris* in sunflower seeds. **Seed Technology**, Lincoln, v. 20, p. 94-99, 1998.

ROMEIRO, R.S.; PERES, F.; OLIVEIRA, J.R.; DEL PELOSO, M.J. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro: quantificação e percentagem de transmissão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 15, p. 1-5, 1993.

ROUMAGNAC, P.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Detection of *Xanthomonas* spp., the causal agent of onion bacterial blight, in onion seeds using a newly developed semi-selective isolation medium. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrechet, v. 106, p. 867-877, 2000.

ROWE-MAGNUS, D.A.; MAZEL, D. Resistence gene capture. **Current Opinion in Microbiology,** Oxford, v. 2, p. 483-489, 1999.

SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. **Detection of bacteria in seed and other planting materia**l. Minneapolis: American Phytopathologycal Society, 1989. 122 p.

SCHAAD, N.W. Detection of seedborne bacterial plant pathogens**. Plant Disease**, Saint. Paul, v. 66, p. 885-890, 1982.

SCHAAD, N.W.; DONALDSON, R.C. Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas campestris* in Infected crucifer seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 8, p. 383-391, 1980.

SCHAAD, N.W.; FOSTER, R.L.; A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 75, n. 3, p. 260-263, 1985.

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

SCHAAD, N.W.; JONES, LACY, G.H. II. Gram-negative bacteria: *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (Ed) **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**, 3th ed. Saint Paul: APS Press., p. 175-200, 2001.

SEVENO, N.A.; KALLIFIDAS, D.; SMALLA, K.; van ELSAS, J.K.; COLLARD, J.M.; KARAGOUNI, A.D.; WELLINGTON, E.M.H. Occurrence and reservoirs of resistance genes in the environment. **Reviews in Medical Microbiology**, London, v.13, n.1, p.15-27, 2002.

SHARON, E.; OKON, Y.; BASHAN, Y.; HENIS, Y. Detached leaf enrichment: a method for detecting small mumbers of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in seed and symptomless leaves of tomato and pepper. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 53, p. 371-377, 1982.

SHIRAKAWA, T.; SASAKI, T. A selective medium for isolation of *Clavibacter michiganense* pv. *michiganense*, the pathogen of tomato bacterial canker disease. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Morika, v. 54, p. 540-543, 1988.

SIJAM, K.; CHANG, C.J.; GITAITIS, R.D. An agar medium for isolation and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 8, p. 831-834, 1991.

SIJAM, K.; CHANG, C.J.; GITAITIS, R.D. A medium for differentiating tomato and pepper strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 14, p. 182-184, 1992.

SOARES, F.M.P.; VALARINI, P.J.; MENTEN, J.O.M. Meio semi-seletivo para detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente causal da mancha bacteriana pequena do tomateiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 21-26, 2001.

SUSLOW, T.; V.; SCHROTH, M. N.; ISAKA, M. Application of a rapid method for Gram-differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 917-918, 1982.

TIGCHELAAR, E.C. Botany and culture. In: JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E.; ZITTE, T.A. (Ed.). **Compendium of tomato diseases**. Saint. Paul: APS Press, 1991. p. 2-4.

TOUSSAINT, V.; MORRIS, C.E.; CARISSE, O. A new semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 131-136, 2001.

VIDAVER, A.K. Gram positive bacteria. In: SCHAAD, N.W. (Ed) **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 2th ed. Saint Paul: APS Press, 2001. p. 12-16.

WANG, Z.K.; COMSTOCK, J.C.; HATZOLOUKA, E.; SCHAAD, N.W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA, and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilianeans*, the causal agent of elaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, London, v. 48, p. 245-252, 1999.

WILLIFORD, R.E.; SCHAAD, N.W. Agar medium for selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* from carrot seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, p. 1142, 1984.

YOUNG, J.M.; BULL, C.T.; DE BOER, S.H.; FIRRAO, G.; SADDLER, G.E.; STEAD, D.E.; TAKIKAWA, Y. Names of plant pathogenic bacteria, 1864-2004. International Society for Plant Pathology, 2005. 74 p. Disponível em: <http://www.isppweb.org/Names%20of%20Plant%20Pathogenic%20Bacteria%202005. Acesso em: 27 mar. 2007.

3 DIFERENCIAÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas* spp. CAUSADORAS DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO POR PCR-RFLP DA REGIÃO ESPAÇADORA 16S-23S DNAr E DO GENE *rpo*B

Resumo

Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. euvesicatoria* e *X. vesicatoria* foram utilizados nesse estudo. Dois marcadores moleculares foram utilizados com o objetivo de se avaliar a ocorrência de características que auxiliem na diferenciação dessas espécies. A região espaçadora 16S-23S DNAr dos isolados de *Xanthomonas* spp. foi amplificada utilizando-se o par de *primers* pHr/p322-anti e para o gene *rpo*B foram utilizados os *primers* rpoB-2F/rpoB-3R. A amplificação da região espaçadora resultou num fragmento de aproximadamente 1.100 pares de bases (pb), enquanto que para o gene *rpo*B o fragmento obtido foi de aproximadamente 800 pb. Os produtos de PCR correspondentes à região espaçadora 16S-23S DNAr foram digeridos com as enzimas de restrição *Afa* I, *Dde* I, *Hinf* I, *Hpa* II e *Mbo* I e os referentes ao gene *rpo*B foram digeridos com as endonucleases: *Afa* I, *Cfo* I, *Hae* III, *Hpa* II e *Hsp92* II. Os resultados obtidos do PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S DNAr, com todas as enzimas testadas, mostraram apenas dois perfis distintos entre as espécies comparadas, exceto com a enzima *Afa* I, onde *X. a*. pv. *vesicatoria* e *X. euvesicatoria* apresentaram perfis idênticos entre si, o mesmo ocorrendo com *X. gardneri* e *X. vesicatoria*. As digestões dos produtos do gene *rpo*B, utilizando-se as enzimas *Hae* III e *Hpa* II, revelam perfis distintos entre as espécies comparadas, indicando a possibilidade de diferenciação das espécies analisadas por PCR-RFLP.

Palavras chave: PCR-RFLP, Região espaçadora 16S-23S, Gene *rpo*B, Mancha-bacteriana, *Xanthomonas*, Tomate

Differentiation of *Xanthomonas* spp. strains causing the tomato bacterial-spot by PCR-RFLP of the 16S-23S DNAr spacer region and of the *rpo*B gene

Abstract

Strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. euvesicatoria* and *X. vesicatoria* were used in this study. Two molecular markers were used with the objective of evaluating the occurrence of characteristics that can aid in the differentiation of these species. The 16S-23S DNAr spacer region of *Xanthomonas* spp. strains was amplified using the primers pair pHr/p322-anti and for the *rpo*B gene were used the primers rpoB-2F/rpoB-3R. The spacer region amplification resulted in a fragment of approximately 1.1 kb**,** while for the *rpo*B gene the obtained fragment was of approximately 0.8 kb. The products of PCR, corresponding to the 16S-23S DNAr spacer region, were digested with the restriction enzymes *Afa* I, *Dde* I, *Hinf* I, *Hpa* II and *Mbo* I and the ones, referring to the *rpo*B gene, were digested with the endonucleases: *Afa* I, *Cfo* I, *Hae* III, *Hpa* II and *Hsp92* II. The results that were obtained from the 16S-23S DNAr spacer region PCR-RFLP with all the tested enzymes showed only two distinct profiles among the compared species, except with the *Afa* I enzyme, where *X. a*. pv. *vesicatoria* and *X. euvesicatoria* presented identical profiles among themselves, the same occurring with *X. gardneri* and *X. vesicatoria*. The digestions of the *rpo*B gene products, using the *Hae* III and *Hpa* II enzymes, revealed distinct profiles among the compared species, indicating the possibility of the species differentiation by PCR-RFLP.

Key-words: PCR-RFLP, 16S-23S spacer region, *rpo*B gene, Bacterial-spot, *Xanthomonas*, Tomato

3.1 Introdução

A mancha-bacteriana, causada por espécies do gênero *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* e *X. vesicatoria*) é uma das doenças mais importantes do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

O princípio básico para a prevenção de uma doença no campo é a adoção de medidas efetivas para prevenir o favorecimento da propagação e subseqüente aparecimento da doença, pelo conhecimento da fonte de inóculo para essa doença. Vários métodos, tradicionais ou novos, estão disponíveis para a detecção de fitopatógenos conhecidos que sobrevivem nos mais diversos tipos de habitat, incluindo sementes, restos culturais, solo e água. Como a maioria das doenças bacterianas são transmitidas por sementes ou material propagativo contaminados, a detecção de patógenos nesses materiais é de grande importância (ALVARES, 2004).

Os protocolos de certificação de qualidade são baseados, frequentemente, no isolamento da bactéria a partir da semente por cultivo em meio semi-seletivo, seguido por identificação da colônia por meio de características morfológicas, bioquímicas e testes de patogenicidade, o que demanda muito tempo (de uma a várias semanas) para a confirmação dos resultados. Há, portanto, a necessidade do desenvolvimento de testes mais rápidos e confiáveis para recuperar o custo e o tempo consumidos no cultivo e ensaios com plantas (ALVARES, 2004).

Técnicas moleculares podem contribuir na otimização desse processo e podem ainda auxiliar em programas de controle de qualidade de empresas produtoras de sementes, permitindo o monitoramento da qualidade genética, fisiológica e sanitária das sementes antes, durante e após o processo de produção (BORÉM, 2005).

A utilização de métodos moleculares (baseados em ácidos nucléicos) para detecção de fitopatógenos está descrita desde a década de 1970 (como, por exemplo, protocolos de hibridização *dot-blot*), porém não causaram impacto nos laboratórios de diagnóstico de rotina durante a década de 1980. Somente após o desenvolvimento da metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) os diagnósticos moleculares ganharam força (MUNFORD et al., 2006).

Na ultima década, os progressos nos métodos moleculares de diagnóstico têm contribuído significativamente na detecção de fitopatógenos. A aplicação de métodos

como a PCR tornou possível o diagnóstico de microrganismos que não podem ser identificados seguramente pelo uso de métodos baseados em testes convencionais (MUNFORD et al., 2006).

A análise de polimorfismo de fragmentos obtidos por digestão com enzimas de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) baseia-se no princípio de especificidade de clivagem do DNA com endonucleases, de forma a gerar fragmentos de DNA de acordo com a freqüência e localização de seqüências de reconhecimento da enzima; a distância entre os sítios de restrição contidos no DNA, difere entre indivíduos geneticamente distintos e é única a cada um. Portanto, o padrão de bandas resultante pode ser visualizado em gel e agarose por eletroforese convencional ou de campo pulsado e pode ser utilizado para identificar e/ou diferenciar, de forma confiável, o indivíduo provedor do DNA (LANE, 1991; TOWNER; COCKAYNE, 1993; BORÉM, 2005). O RFLP baseado em PCR consiste na amplificação de seqüências gênicas alvo utilizando *primers* específicos para posterior restrição enzimática dos produtos amplificados, produzindo RFLPs a serem analisados por eletroforese. Qualquer gene pode ser avaliado por meio dessa técnica, incluindo seqüências altamente conservadas, tais como rDNA16S, 23S ou regiões espaçadoras (LANE, 1991).

A técnica requer pequena quantidade de DNA e tem sido muito utilizada na investigação das relações filogenéticas de bactérias e fungos fitopatogênicos. Baseados na análise de variação do padrão de RFLP, Gabriel et al. (1989) propuseram uma nova classificação para as linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, enquanto Qhobela et al. (1991) descreveram a separação de patovares e Jones et al. (1998), diferenciaram *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (grupo A) e *X. vesicatoria* (grupo B).

Análises da região espaçadora para a diferenciação de espécies bacterianas têm sido empregadas no estudo de diversos grupos taxonômicos. Variações no tamanho dessas seqüências podem ser suficientes para discriminar entre diferentes linhagens, enquanto que análises de fragmentos amplificados por PCR através de RFLP podem fornecer informações adicionais para a diferenciação de organismos (GÜRTLER; STANISICH, 1996).

A utilização de PCR e amplificação de seqüências de região espaçadora para a diferenciação de *Xanthomonas* pode ser exemplificada pelo estudo de Honeycutt; Sobral e McClelland (1995). Esses autores desenharam um par de *primers* capaz de detectar variações no tamanho das seqüências espaçadores de rDNA 16S-23S de *X. albilineans* e outros patovares e espécies *Xanthomonas*, servindo, inclusive, como um método diagnóstico para a espécie.

Manceau e Horvais (1997), analisando a região espaçadora de linhagens de *Pseudomonas syringae* por meio de PCR-RFLP, demonstraram que ocorre grande variabilidade entre essas seqüências nesse grupo, possibilitando a diferenciação em nível infra-específico. Destéfano e Rodrigues Neto, (2002) estudaram a região espaçadora em diferentes espécies de *Xanthomonas* que causam doenças em citros. Este grupo é representado por 3 patovares diferentes, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, responsável pelo cancro cítrico, *X.a.* pv. *aurantifolii*, responsável pela cancrose tipo C, no Brasil, e *X.a.* pv. *citrumelo*, responsável pela mancha bacteriana das folhas de citros. O PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S revelou diferenças entre os patovares analisados permitindo o diagnóstico rápido e preciso das diferentes espécies bacterianas que afetam os citros. Outro estudo efetuado por Destéfano *et al.* (2003) permitiu que espécies de *Xanthomonas* patogênicas à cana-de-açúcar (*X. albilineans*, *X. sacchari*, *X. axonopodis* pv. *vasculorum* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*) pudessem ser diferenciadas por PCR-RFLP da região espaçadora.

Everett e Andersen (1997) investigaram as seqüências espaçadoras do rDNA 16S-23S e parte do gene rDNA 23S de espécies de *Chlamydia*, concluindo que esse método é rápido e confiável para a identificação, agrupamento e classificação de linhagens desse gênero.

A partir de 1997, um outro marcador molecular vem sendo utilizado para a identificação e diferenciação de microrganismos. O gene *rpo*B, que codifica a subunidade β da RNA polimerase, vem sendo utilizado com freqüência em microbiologia clínica. Comparações das seqüências desse gene em análises filogenéticas e experimentos de identificação foram descritas para bactérias entéricas (MOLLET; DRANCOURT; RAOULT, 1997), *Mycobacterium* (KIM et al., 2002), espiroquetas (LEE et al., 2001; RENESTO et al., 2000) e espécies de *Staphylococcus*

(DRANCOURT, 1999), *Legionella* (KO et al, 2002), *Bartonella* (RENESTO et al., 2001) e *Rickettsia* (DRANCOURT; RAOULT, 1999).

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método para detecção e diferenciação das espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana em tomate por meio de PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S DNAr e do gene *rpo*B.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Linhagens bacterianas

A identificação e procedência das linhagens utilizadas nesse estudo estão descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Linhagens de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro.

Linhagens		Hospedeiro	Origem
Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria*	IBSBF 464	*Capsicum annuuum*	Brasil
	IBSBF 1387	*Capsicum annuuum*	Brasil
	LMG 929[P]	*Capsicum annuuum*	Bélgica
Xanthomonas euvesicatoria	IBSBF 2202	*Lycopersicon esculentum*	EUA
Xanthomonas gardneri	IBSBF 1782	*Lycopersicon esculentum*	Brasil
	IBSBF 1783	*Lycopersicon esculentum*	Brasil
	IBSBF 2201	*Lycopersicon esculentum*	EUA
Xanthomonas vesicatoria	IBSF 465	*Lycopersicon esculentum*	Brasil
	XV89	*Lycopersicon esculentum*	Brasil
	IBSF 1338[T]	*Lycopersicon esculentum*	Nova Zelândia
Xanthomonas spp.	Xcv06	*Lycopersicon esculentum*	Brasil
	Xcv68	*Lycopersicon esculentum*	Brasil
	Xcv108	*Lycopersicon esculentum*	Brasil

IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil); Xcv (*Xanthomonas* spp. causadoras da mancha-bacteriana do tomate - Sakata Seeds Sudamérica S.A.), XV (*Xanthomonas vesicatoria* - Laboratório de Bioquímica e Fisiologia do Parasitismo da ESALQ/USP-Piracicaba); LMG (Laboratorium voor Microbiologie, Bélgica); T= linhagem tipo da espécie; P= linhagem patotipo

3.2.1.2 Extração de DNA cromossômico

As culturas bacterianas foram submetidas à extração de DNA cromossômico segundo a metodologia descrita por Pitcher; Saunders e Owen (1989).

Um total de 5 mL das culturas bacterianas crescidas em meio agar-nutriente (NA) foi centrifugado a 12.000 rpm por 2 min. Os sedimentos foram ressuspensos em 100 μL de tampão TE pH 8.0 contendo 2 mg/mL de lisozima e foram incubados a 37 °C por 1 h. Adicionou-se 500 μL da solução de tiocianato de guanidina 5 M e agitou-se brevemente em vortex. As soluções foram incubadas a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, os lisados foram resfriados em gelo e foram adicionados 250 μL de acetato de amônio 7,5M. Misturou-se gentilmente invertendo os tubos várias vezes e incubou-se no gelo por mais 10 min. Adicionou-se 500 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v), agitou-se manualmente e o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e adicionou-se aproximadamente 430 μL de isopropanol, para precipitar o DNA. Os tubos foram invertidos várias vezes, até a visualização um precipitado branco e fibroso. Em seguida o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 2 min. Os sedimentos de DNA foram lavados com etanol 70% cerca de três vezes e secos em estufa a 37 °C, sendo, em seguida, dissolvido em 200 μL de tampão TE. Adicionou-se 2 μL de RNAse A (10 mg/mL) e incubou-se a 37 °C por 1 h. Após este tratamento, foram adicionados 40 μL de cloreto de lítio 4 M e, posteriormente, aproximadamente 240 μL de clorofórmio-álcool isoamílico, que foram misturados até a emulsificação. O material foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min para separação das duas fases. Aproximadamente 400 μL de etanol foram utilizados para a precipitação do DNA. Após centrifugação a 12.000 rpm por 2 min, os sedimentos foram lavados com etanol a 70%, secos em estufa a 37 °C, ressuspensos em 40 μL de água Milli-Q esterilizada e estocado a 4 °C.

A pureza e quantificação do DNA das amostras foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose 0,6%. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,1 μg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em sistema digital Alpha Innotech 2200®.

3.2.1.3 Amplificação da região espaçadora DNAr 16S-23S e do gene *rpo*B

O par de *primers* utilizado para a amplificação da região espaçadora 16S-23S foi o pHr (MASSOL-DEYA et al., 1995) e p322-anti (HONEYCUTT; SOBRAL; MCCLELLAND, 1995) (Tabela 3.2). Para o gene *rpo*B foram utilizados os *primers* rpoB-2F e rpoB-3R (Laboratório de Bacteriologia Vegetal – LBV, Instituto Biológico de Campinas – dados ainda não publicados).

Tabela 3.2 – Seqüência dos *primers* utilizados nas reações de amplificação por PCR da região espaçadora

Seqüência do *primer* (5' → 3')*	**CÓDIGO**	**nt**	**especificidade**
TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT	pHr	20	DNAr 16S-23S
GGT TCT TTT CAC CTT TCC CTC	p322-anti	21	DNAr 16S-23S

Foram utilizados aproximadamente 200 ng de DNA genômico em reações de 25 μL contendo 2,0 U de *Taq* polimerase Invitrogen; tampão da enzima *Taq* 1X; 0,2 mM de uma mistura de dNTPs e 0,4 μM de cada *primer*.

O programa de amplificação da região espaçadora DNAr 16S-23S consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95 ^{o}C/2 min; seguido de 30 ciclos a 94 ^{o}C/1 min; 60 ^{o}C/1 min. e 72 ^{o}C/3 min; e um ciclo a 72 ^{o}C/5 min. (extensão final).

Para amplificação do gene *rpo*B o programa consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94 ^{o}C/2 min; seguido de 35 ciclos a 94 ^{o}C/30 seg; 63 ^{o}C/30 seg. e 72 ^{o}C/1 min; e um ciclo a 72 ^{o}C/5 min. (extensão final). Os experimentos foram realizados em termociclador da marca Perkin Elmer modelo 9700.

A observação dos produtos de amplificação obtidos foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato/0,001 M EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,1 μg/mL), visualizados transiluminador sobre luz ultravioleta e fotografados em sistema digital Alpha Innotech 2200.

3.2.1.4 Digestão dos produtos de PCR com endonucleases de restrição (PCR-RFLP)

Os produtos de PCR correspondentes à região espaçadora 16S-23S DNAr foram digeridos com as enzimas de restrição*: Afa* I, *Dde* I, *Hinf* I, *Hpa* II e *Mbo* I e os referentes ao gene *rpo*B foram digeridos com as endonucleases*: Afa* I, *Cfo* I, *Hae* III, *Hpa* II e *Hsp*92 II. Foram utilizados 4 μL dos produtos obtidos na amplificação em reações de 15 μL com 5U da enzima por reação. As condições de temperatura foram empregadas de acordo com as recomendações do fabricante.

A observação do perfil de restrição obtido foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 3%. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,1 μg/mL), visualizados em fonte de luz U.V. e fotografados em sistema digital de fotodocumentação.

3.2.1.5 Purificação dos produtos de amplificação para seqüenciamento

Os produtos de amplificação correspondentes ao gene *rpo*B dos isolados de *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464, 929^{P}, 1387 e Xcv108), *X. gardneri* (IBSBF 1782, 1783, 2201 e Xcv06), *X. euvesicatoria* (IBSBF 2202) e *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465, Xv89 e Xcv68) foram purificados utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences®) de acordo com as recomendações do fabricante, para posterior seqüenciamento.

Após as purificações, o DNA das diferentes linhagens foi quantificado em gel de agarose 1%.

3.2.1.6 Seqüenciamento do fragmento do gene *rpo*B

As reações para seqüenciamento dos DNAs correspondentes ao gene *rpo*B foram efetuadas por meio de PCR com o kit Big Dye v.3 (Applied Biosystems®). utilizando-se o par de *primers* rpoB-2F e rpoB-3R. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador automático ABI Prism 377 Sequencer (Applied Biosystems®), no Laboratório de Virologia, NIB/UMC, sob responsabilidade do Dr. José Luiz Caldas Wollf.

As seqüências obtidas no seqüenciamento foram comparadas pelo programa BLAST disponível na página do “National Center for Biotechnology Information” (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). As seqüências de maior identidade (*X. axonopodis* pv. *citri* 306 (AE 011726.1), *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913 (AE012187); *X.* c. pv. *campestris* 8004 (CP000050); *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10 (AM 039952); *X. oryzae* pv. *oryzae* MAFF 311018 (AP00829) e *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 (AE013598)); foram utilizadas para o alinhamento e análise filogenética dos isolados de *X. gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465 e Xv89), *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 929^{P}, 1387 e 464), *X. euvesicatoria* (IBSBF 2202, IBSBF 2348), *X. perforans* (IBSBF 2349) e Xcv06, Xcv68 e Xcv108. Utilizou-se o programa Mega v. 3.1 (KUMAR et al., 2004), de acordo com o método Neighbor-Joining, com base na matriz de distância genética obtida pelo modelo de Jukes e Cantor, considerando-se 1000 repetições.

3.2.3 Resultados e Discussão

3.2.3.1 Análise da região espaçadora 16S-23S DNAr por PCR-RFLP

Foram amplificados os DNAs genômicos das seguintes linhagens: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), *Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89) e os isolados Xcv06, Xcv68 e Xcv108. A amplificação resultou em um fragmento específico de aproximadamente 1.100 pares de bases (pb) para todas as linhagens testadas.

Os produtos resultantes da amplificação foram submetidos à digestão com endonucleases de restrição com sítio de reconhecimento de 4 pb: *Afa* I, *Dde* I, *Hinf* I, *Hpa* II e *Mbo* I. O fragmento amplificado apresentou sítio de restrição para todas as enzimas avaliadas, sendo detectado polimorfismo entre as linhagens analisadas (Tabela 3, Figuras 1 e 2).

Tabela 3.3 – Resultados da análise de restrição de fragmentos da região espaçadora 16S-23S DNAr utilizando diferentes enzimas de restrição. (continua)

Enzimas	Fragmentos (pb)	Linhagens
Afa I	140	*Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89) e Xcv68
	350	*Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89) e Xcv68
	490	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), Xcv06, Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
Afa I	500	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), isolados Xcv06, Xcv68 e Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
Dde I	100 e 120	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), isolados Xcv06, Xcv68 e Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	190	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89) e Xcv68
	230	*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), isolado Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	240	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), Xcv06, Xcv68, Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	310	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), Xcv06 e Xcv68
Hinf I	Menor que 100	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), isolados Xcv06 e Xcv68
	180	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), iXcv06, Xcv68, Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	200	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), Xcv06 e Xcv68
	250	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), Xcv06, Xcv68, Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	280	*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)

Tabela 3.3 – Resultados da análise de restrição de fragmentos da região espaçadora 16S-23S DNAr utilizando diferentes enzimas de restrição. (conclusão)

Enzimas	Fragmentos (pb)	Linhagens
Hinf I	310	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), Xcv06, Xcv68, Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
Hpa II	Menor que 100	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), Xcv06, Xcv68, Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	100	*X. euvesicatoria*, Xcv06, Xcv68 e Xcv108
	280	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), Xcv06, Xcv68, Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	500	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89) e isolados Xcv06, Xcv68 e Xcv108
	610	*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464) e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
Mbol I	180	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89) e Xcv06 e Xcv68.
	190	*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	300	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), Xcv06 e Xcv68.
	380	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 465 e Xv89), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), iXcv06, Xcv68, Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	450	*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)

Nas digestões com *Afa* I as linhagens de *Xanthomonas* spp. apresentaram dois perfis principais, sendo que os representantes de *X. gardneri*, *X. a.* pv. *vesicatoria*, Xcv06, Xcv108 e *X. euvesicatoria* apresentaram perfis idênticos; *X. vesicatoria* e Xcv68 também apresentaram o mesmo padrão de fragmentos, entre si e distinto das demais.

As digestões com *Dde* I revelaram três perfis, sendo que as linhagens de *X. gardneri*, *X. vesicatoria* e Xcv68 apresentaram perfis idênticos; *X. vesicatoria*, Xcv108 e

X. euvesicatoria apresentaram perfis semelhantes e o isolado Xcv06 apresentou padrão distinto das demais linhagens (Figura 3.1).

Nas digestões com *Hinf* I, foram obtidos apenas dois padrões distintos, sendo o primeiro representado por linhagens de *X. gardneri*, *X. vesicatoria*, Xcv06 e Xcv68, e o segundo por *X. a.* pv. *vesicatoria*, Xcv108 e *X. euvesicatoria* (Figura 3.1).

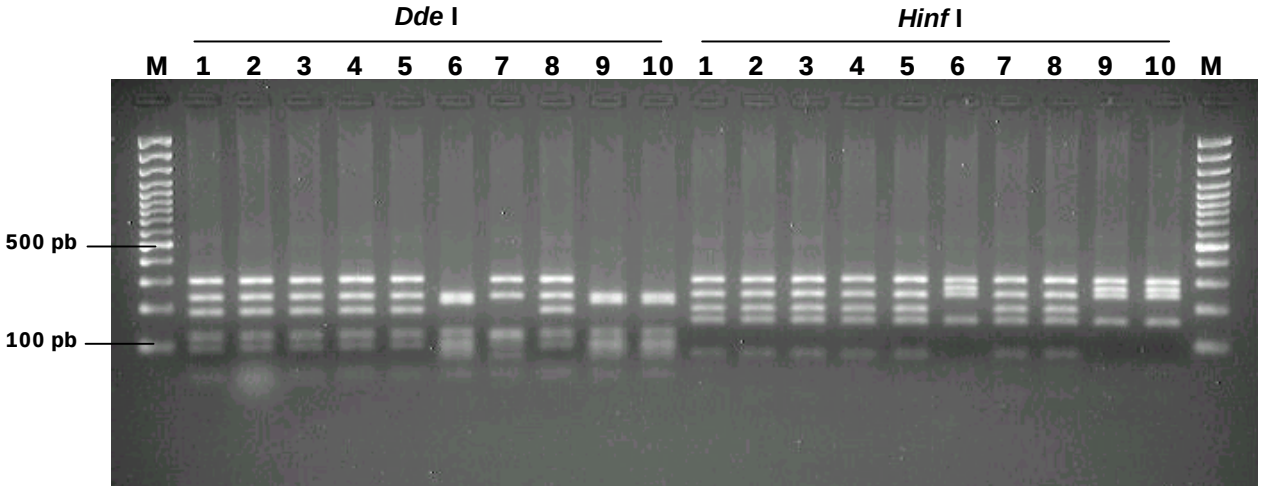

Figura 3.1 – Digestão dos produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S DNAr com as enzimas *Dde* I e *Hinf* I. (M) marcador de peso molecular de 100pb (MBI-Fermentas); (1) *X. gardneri* (IBSBF 1782); (2) *X. gardneri* (IBSBF 1783); (3) *X. gardneri* (IBSBF 2201); (4) *X. vesicatoria* (IBSBF 465) (5) *X. vesicatoria* (Xv89); (6) *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464); (7) Xcv06; (8) Xcv68, (9) Xcv108; (10) *X. euvesicatoria* (IBSBF 2202).

Os isolados de *X. gardneri*, *X. vesicatoria*, Xcv06 e Xcv68 exibiram o mesmo perfil, que foi distinto do padrão de fragmentos exibidos pelos isolados de *X. a.* pv. *vesicatoria*, Xcv108 e *X. euvesicatoria*, quando os produtos foram digeridos com a endonuclease *Mbo* I (Figura 3.2).

Na digestão com a enzima *Hpa* II verificou-se a ocorrência de três padrões distintos. As linhagens *X. gardneri* e Xcv06 formaram o primeiro grupo; isolados Xcv 89, Xcv68 e Xcv108 o segundo grupo e *X. a.* pv. *vesicatoria* e *X. euvesicatoria,* o terceiro grupo (Figura 3.2).

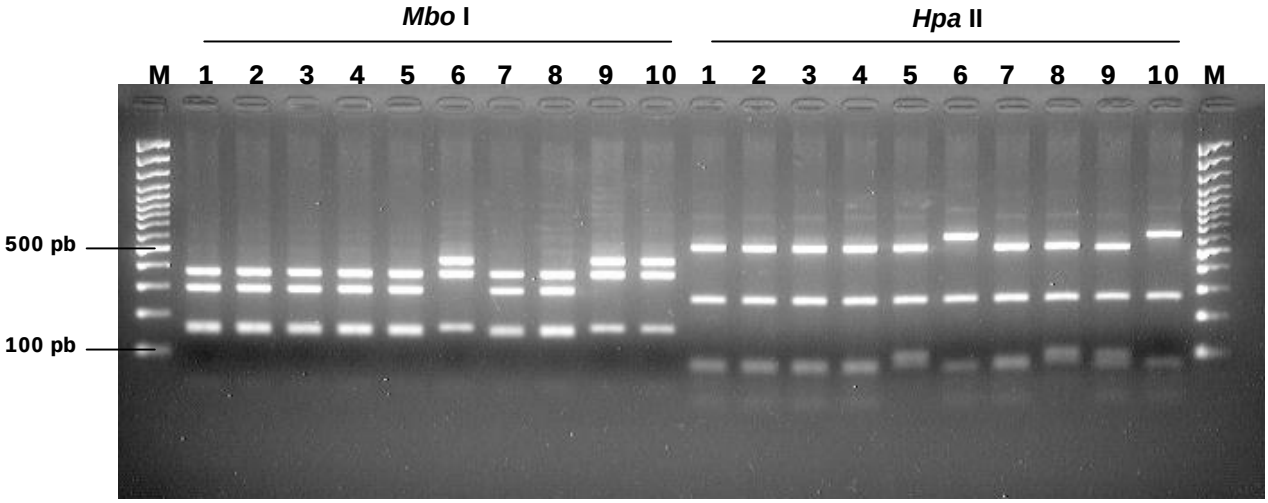

Figura 3.2 – Digestão dos produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S DNAr com as enzimas *Mbo* I e *Hpa* II. (M) marcador de peso molecular de 100pb (MBI-Fermentas); (1) *X. gardneri* (IBSBF 1782); (2) *X. gardneri* (IBSBF 1783); (3) *X. gardneri* (IBSBF 2201); (4) *X. vesicatoria* (IBSBF 465); (5) *X. vesicatoria* (Xv89); (6) *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464); (7) Xcv06; (8) Xcv68, (9) Xcv108; (10) *X. euvesicatoria* (IBSBF 2202).

Nas digestões com enzimas de restrição *Mbo* I, *Hpa* II, *Dde* I e *Hinf* I as linhagens de *X. gardneri* e *X. vesicatoria* foram agrupadas em um mesmo perfil, enquanto *X. a.* pv. *vesicatoria* e *X. euvesicatoria* num outro perfil, porém idênticos entre si. Esses resultados demonstraram a similaridade genética entre essas linhagens.

Somente com a utilização da enzima *Afa* I foi possível a diferenciação de *X. vesicatoria* e *X. gardneri*, mas esta última exibiu padrão idêntico a *X. a.* pv. *vesicatoria* e *X. euvesicatoria,* dificultando, assim, a sua distinção das demais.

Com relação à identidade do isolado Xcv06, os resultados de PCR-RFLP indicaram que o mesmo deve pertencer à espécie *X. gardneri*, uma vez que, com todas as enzimas avaliadas, foi agrupado com essa espécie. Essa conclusão foi corroborada nos experimentos com a enzima *Afa* I, que diferenciou *X. gardneri* de *X. vesicatoria* e agrupou o isolado com *X. gardneri* .

O isolado Xcv68 teve sua identidade confirmada como *X. vesicatoria,* uma vez que o mesmo agrupou sempre com essa espécie, em todos os experimentos realizados.

O isolado Xcv108 agrupou com *X.a.* pv. *vesicatoria* em todas as enzimas avaliadas, exceto *Hpa* II. Portanto, há indícios de que sua identidade seja *X. a.* pv.

vesicatoria. Estudos complementares serão necessários para confirmar se o isolado pertence à espécie *X. euvesicatoria* ou *X. perforans*, uma vez que a espécie *X. a.* pv. *vesicatoria* teve sua taxonomia alterada, com o desdobramento nessas duas novas espécies.

Pelos resultados de PCR-RFLP da região espaçadora, verificou-se, portanto, a impossibilidade de diferenciação das quatro espécies de *Xanthomonas* utilizadas nesse estudo, uma vez que os padrões obtidos não foram distintos para cada uma delas.

Análises da região espaçadora para diferenciação de espécies bacterianas têm sido empregadas no estudo de diversos grupos taxonômicos. Variações nessas seqüências podem ser suficientes para discriminar diferentes espécies, enquanto que análises de fragmentos amplificados por PCR através de RFLP ou análise de seqüências podem fornecer informações adicionais para diferenciação de organismos com região espaçadora de mesmo tamanho.

O alinhamento das sequências do gene RNAr 16S de grupos de interesse pode fornecer informações como regiões especificas para casa espécie ou grupos, favorecendo com isso o desenho de oligonucleotídeos específicos que pode abranger diversos níveis taxonômicos. Uma grande variedade de sondas ou *primers* ribossômicos específicos para gêneros, espécies ou estirpes tem sido desenvolvida visando à detecção rápida e direta de bactérias em amostras diversas (médicas, industriais ou ambientais) e para estudos de ecologia microbiana (PACE et al., 1986).

Em bactérias do gênero *Xanthomonas,* Moore et al. (1997) analisaram seqüências de DNAr 16S de oito taxo-espécies e verificaram que há um grau muito elevado de conservação entre elas, limitando a possibilidade do desenvolvimento de *primers* específicos para diferenciação de espécies.

Mães; Garbeva e Kamoen (1996) desenharam *primers* específicos para diferenciação de patovares de *Xanthomonas* que causam CLS (*Cereal Leaf Streak*), a partir da análise de seqüências variáveis da região espaçadora do DNAr 16S-23S de linhagens de dois patovares associados a doenças em cereais.

Uma vez que, a diferenciação direta, por PCR-RFLP da região espaçadora, das espécies *X. gardneri*, *X. vesicatoria, X. a.* pv. *vesicatoria* e *X. euvesicatoria* não foi possível, decidiu-se avaliar um outro marcador molecular para tal objetivo.

3.2.3.2 Análise do gene *rpo*B por PCR-RFLP

A amplificação do gene *rpo*B com os *primers* rpoB-2F e rpoB-3R resultou em um fragmento específico de aproximadamente 800 pb para todas as linhagens testadas.

Foram amplificados os DNAs genômicos de representantes das espécies *X. gardneri* (IBSBF 1782), X. *a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464), *X. euvesicatoria* (IBSBF 2202), *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}). Os produtos resultantes da amplificação foram submetidos à digestão com *Afa* I, *Cfo* I, *Hae* III, *Hpa* II e *Hsp*92 II. (Figura 3.3).

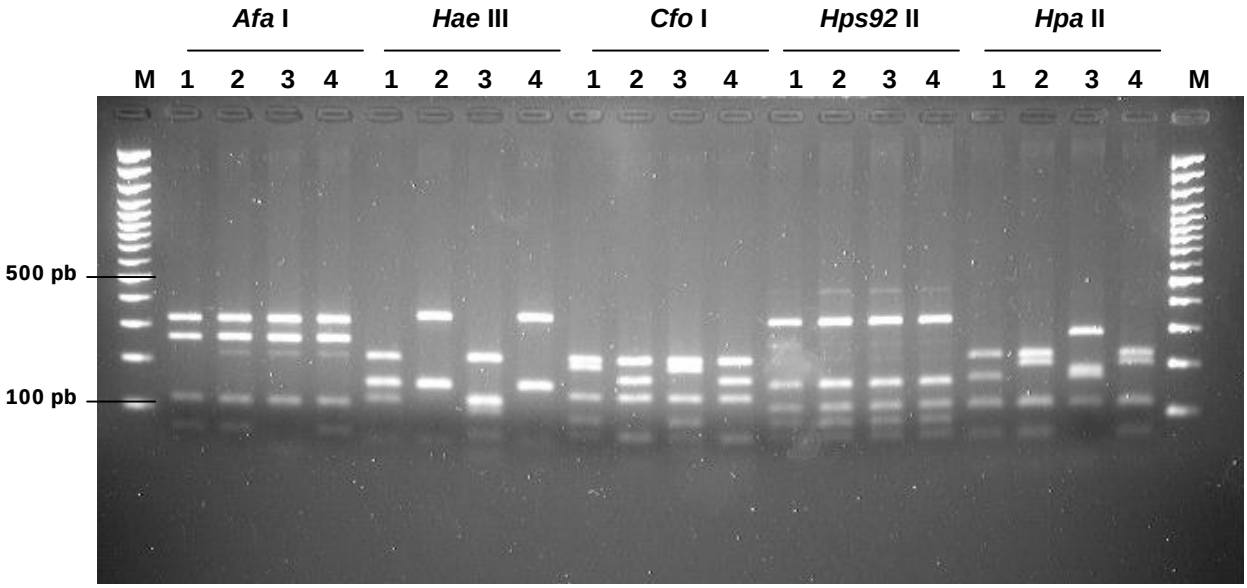

Figura 3.3 – Digestão dos produtos de amplificação do gene *rpo*B com as enzimas *Afa* I, *Cfo* I, *Hae* III, *Hpa* II e *Hsp92* II. (**M**) marcador de peso molecular de 100pb (MBI-Fermentas); (**1**) *X. gardneri* (IBSBF 1782); (**2**) X. *a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464); (**3**) *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}); (**4**) *X. euvesicatoria* (IBSBF 2202).

O fragmento amplificado apresentou sítio de restrição para todas as enzimas testadas, sendo detectado polimorfismo entre *X. gardneri*, *X. vesicatoria* e *X. a.* pv. *vesicatoria* apenas com as enzimas *Hae* III e *Hps*92 II, as quais foram utilizadas para digestões com as demais linhagens de *X. gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465 e Xv89), *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 929^{P}, 1387 e 464), *X. euvesicatoria* (IBSBF 2202) e dos isolados Xcv06, Xcv68 e Xcv108 (Tabela 4). *X. euvesicatoria* agrupou sempre com *X.a*. pv *vesicatoria* indicando que a mesma deve pertencer à espécie *X. euvesicatoria.*

Tabela 3.4 – Resultados da análise de restrição de fragmentos do gene *rpo*B utilizando diferentes enzimas de restrição

Enzimas	Fragmentos (pb)	Linhagens
Hae III	Menor que 100	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465 e Xv89), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF929^{P}, 1387 e 464), isolados Xcv06, Xcv68 e Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	140	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465 e Xv89), isolados Xcv06 e Xcv68
	160	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF929^{P}, 1387 e 464), isolado Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	180	Isolado Xcv06
	220	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465 e Xv89) *e* isolados Xcv06 e Xcv68
	340	*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF929^{P}, 1387 e 464), isolado Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
Hpa II	Menor que 100	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF929^{P}, 1387 e 464), isolados Xcv06 e Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	130	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201) e isolado Xcv06
	180	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465 e Xv89), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF929^{P}, 1387 e 464), isolados Xcv06, Xcv68 e Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	190	*Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465 e Xv89) e isolados Xcv68
	200	*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF929^{P}, 1387 e 464), isolado Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	210	*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF929^{P}, 1387 e 464), isolado Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	220	*Xanthomonas gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (IBSBF929^{P}, 1387 e 464), isolados Xcv06 e Xcv108 e *Xanthomonas euvesicatoria* (IBSBF 2202)
	300	*Xanthomonas vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465 e Xv89) e isolado Xcv68

^{T} = linhagem tipo; ^{P} = linhagem referência do patovar; IBSBF (Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil).

Na digestão com *Hae* III as linhagens *X. gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465 e Xv89), *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 929^{P}, 464 e 1387) e o isolado Xcv06 apresentaram perfis distintos. O isolado Xcv68 apresentou perfil

idêntico ao das linhagens de *X. vesicatoria,* confirmando sua identidade. O isolado Xcv108 apresentou perfil idêntico a *X. a.* pv. *vesicatoria* e *X. euvesicatoria.* Essa última agrupou com *X. a.* pv. *vesicatoria* em todos os experimentos realizados (Figura 3.4A). Quando os produtos de amplificação foram digeridos com a enzima *Hpa* II verificou-se a ocorrência de três padrões distintos entre as linhagens analisadas (Figura 3.4B).

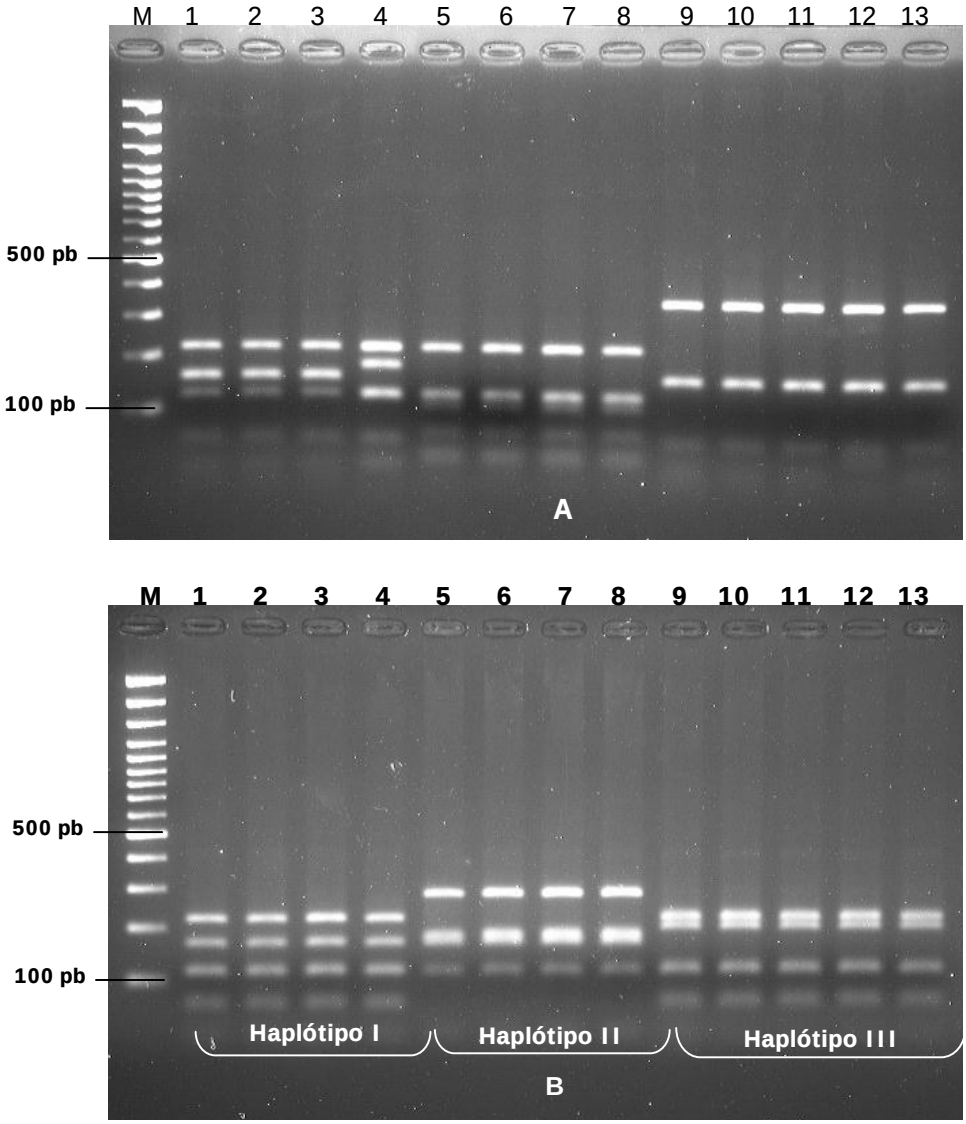

Figura 3.4 – Digestão dos produtos de amplificação do gene *rpo*B com as enzimas (A) *Hae* III e (B) *Hpa* II. (M) marcador de peso molecular de 100pb (MBI-Fermentas); (1) *X. gardneri* (IBSBF 1782); (2) *X. gardneri* (IBSBF, 1783); (3) *X. gardneri* (IBSBF 2201); (4) Xcv06; (5); *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}); (6) *X. vesicatoria* (IBSBF 465); (7) *X. vesicatoria* (Xv89); (8) Xcv68; (9) *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 929^{P}); (10) *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 1387); (**11**) *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF 464); (**12**) Xcv108; (**13**) e *X. euvesicatoria* (IBSBF 2202).

A análise dessa região pela metodologia de PCR- RFLP forneceu fortes indícios de que o isolado Xcv06 pertence à *X. gardneri*, o isolado XCV68 à *X. vesicatoria* e o isolado Xcv108 pertence à *X. a.* pv. *vesicatoria*. Entretanto, novos estudos deverão ser realizados com os isolados Xcv06 e Xcv68 para confirmar a identificação dos mesmos.

A partir de 1997, um outro marcador molecular vem sendo utilizado para identificação e diferenciação de espécies de microrganismos. Mollet et al. (1997) fizeram um estudo comparativo do poder discriminatório de seqüências dos genes 16S RNA e *rpo*B (sub-unidade β da RNA polimerase). Os autores geraram uma base de dados de seqüências para 14 espécies de Enterobacteriaceae e investigaram a divergência intra e inter-espécie entre os genes 16S RNA e *rpo*B. Os resultados mostraram que os níveis de divergência entre as seqüências *rpo*B de diferentes linhagens eram notoriamente maiores que aqueles observados entre os genes 16S, sugerindo que o gene *rpo*B pode ser uma poderosa ferramenta para a identificação de microrganismos. A partir deste relato inúmeros trabalhos, principalmente na área clínica, têm sido desenvolvidos utilizando o gene *rpo*B. Temos como exemplos a detecção, identificação e análises filogenéticas de *Bartonella* spp. (RENESTO et al., 2000; RENESTO et al., 2001), *Borrelia* spp. (LEE et al., 2000), micobactérias patogênicas (KIM et al., 1999; 2001; 2004), diferenciação de sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (KWON et al., 2001), estudos de filogenia de micoplasma do grupo pneumoniae (KIM et al., 2003), detecção e identificação de *Legionella pneumophila* (KO et al., 2002; Ko et al., 2003), identificação de isolados de *Staphylococcus* spp. (DRANCOURT; RAOULT, 2002), identificação de *Bacillus* spp. não patogênicos e clínicos (BLACKWOOD et al., 2004) e ainda, estudos de diversidade de amostras ambientais (DAHLLÖF; BAILLIE; KJELLEBERG, 2000; DA MOTA et al., 2005). Recentemente, Ferreira e Destéfano (2007) demonstraram que o gene *rpo*B pode diferenciar claramente as 19 espéceis descritas de *Xanthomonas.*

Os resultados obtidos pela análise por PCR-RFLP do gene *rpo*B possibilitaram a diferenciação das espécies *X. gardneri*, *X. vesicatoria*, *X. a.* pv. *vesicatoria* , possibilitando assim, um diagnóstico mais rápido e preciso desses fitopatógenos.

3.2.3.3 Seqüenciamento do gene *rpo*B

As seqüências obtidas do sequenciamento do fragmento do gene *rpo*B dos isolados de *X. gardneri* (IBSBF 1782, 1783 e 2201), *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465 e Xv89), *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF929^{P}, 1387 e 464), isolados Xcv06, Xcv68 e Xcv108 e *X. euvesicatoria* (IBSBF 2202 e IBSBF 2348) permitiram a construção de uma árvore filogenética (Figura 3.5), a qual mostrou a relação genética entre os isolados.

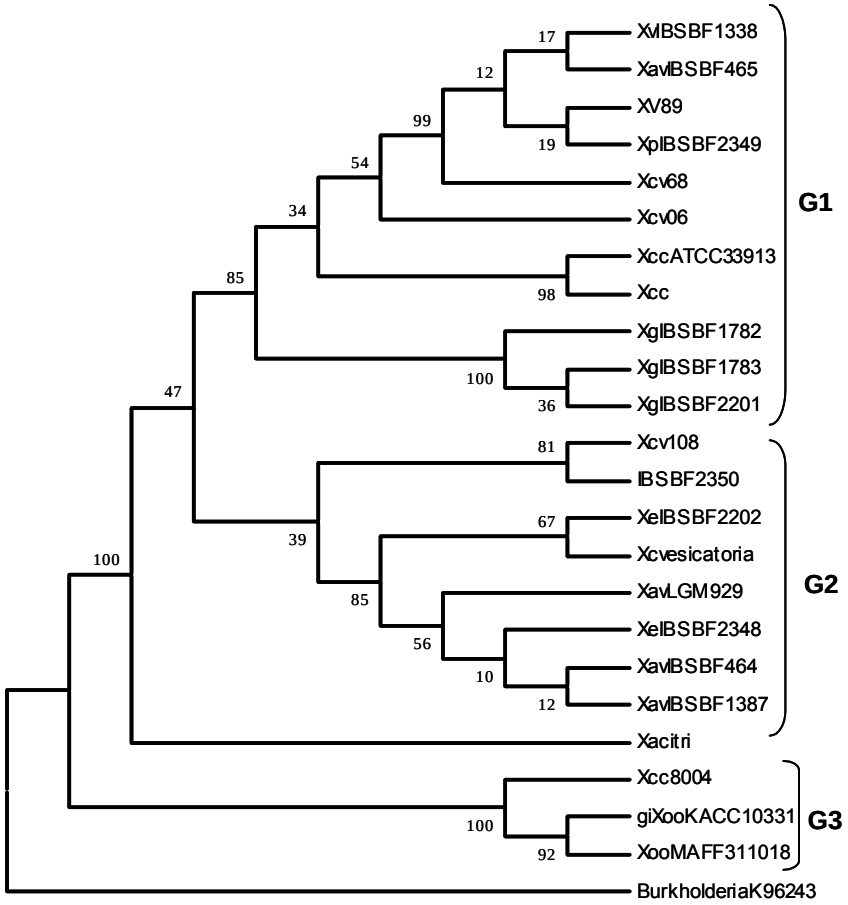

Figura 3.5 – Árvore filogenética baseada numa seqüência parcial do gene *rpo*B mostrando a relação filogenética entre 23 isolados de *Xanthomonas*, incluindo *xanthomonas* spp. causadoras da mancha bacteriana do tomateiro. Utilizou-se o método *neighbor-joining*; a topologia foi avaliada por análise de *bootstrap* (programa Mega 3.1, com 1000 repetições, com *Burkholderia* como grupo externo).

As linhagens de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha bacteriana do tomateiro ficaram agrupadas em dois grandes grupos (G1 e G2). O grupo G1 incluiu os isolados de *X. vesicatoria* (IBSBF 1338^{T}, 465, Xv89 e isolado Xcv68), sendo esse agrupamento também observado no RFLP. Nota-se que o isolado de *X. perforans*

(IBSBF 2349) está mais próximo deste grupo. O grupo G1 também incluiu os isolados de *X. gardneri*, que agruparam entre si, como observado no haplótipo I do RFLP. Verifica-se aqui, que o isolado Xcv06, que apresentou padrão característico de *X. gardneri* no RFLP, aqui se encontra mais próximo à *X. vesicatoria* que *X. gardneri*.

O grupo G2 incluiu os isolados de *X. a.* pv. *vesicatoria* (IBSBF929^{P}, 1387 e 464), *X. euvesicatoria* (IBSBF 2202 e IBSBF 2348) e os isolados Xcv06 e Xcv108, confirmando os resultados obtidos no RFLP (haplótipo III), no qual não foi possível distinguir esses dois grupos. Salienta-se que, de acordo com a reclassificação proposta por Jones et al. (2004) *X. a.* pv. *vesicatoria* foi subdividida em duas novas espécies: *X. euvesicatoria* e *X. perforans*, o que pode justificar o agrupamento dessas espécies.

Ressalta-se também, que a falta de linhagens tipo para as espécies *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans* depositadas em coleções de culturas brasileiras e a carência de seqüências depositadas no GenBank dificultaram as análises.

3.3 Considerações finais

Os resultados indicam que existem seqüências no fragmento do gene *rpo*B que podem diferenciar os haplótipos obtidos no RFLP; a partir dessas seqüências, poderão ser desenvolvidos *primers* que permitam a detecção das diferentes espécies de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha bacteriana em sementes e partes da planta do tomateiro.

Referências

ALVARES, A.M. Integrated approaches for detection of palnt pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 339-366, 2004.

BLACKWOOD, K.S.; TURENNE, C.Y.; HARMSEN, D.; KABANI A.M. Reassessment of sequence-based targets for identification of *Bacillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 1626-1630, 2004.

DA MOTA, F.F.; GOMES, E.A.; PAIVA, E.; SELDIN, L. Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species in environmental samples by a novel *rpo*B-based PCR-DGGE method. **FEMS Microbiology Ecology**, in press. 2005.

DAHLLÖF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. *rpo*B-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3376-3380, 2000.

DESTÉFANO, S.A.L.; RODRIGUES NETO, J. Caracterização de *Xanthomonas axonopodis* pv. a*urantifolii* (Tipo C) produtora de pigmento escuro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n. 3, p. 287-291, 2001.

DESTÉFANO, S.A.L; RODRIGUES NETO, J. Rapid differentiation of *Xanthomonas* strains causing disease in citrus plants based on polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 167-172, 2002.

DESTÉFANO, S.A.L.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J.; FERREIRA, M.; BALANI, D.M. Differentiation of *Xanthomonas* species pathogenic to sugarcane by PCR-RFLP. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 283-288, 2003.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Characterization of mutations in the *rpo*B gene in naturally rifampin-resistant *Rickettsia* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, p. 2400-2403, 1999.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpo*B gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 1333-1338, 2002.

EVERETT, K.D.E.; ANDERSEN, A.A. The ribosomal intergenic spacer and domain I of the 23S rRNA gene are phylogenetic markers for *Chlamydia* spp. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 461-473, 1997.

GABRIEL, D.W.; KINSGSLEY, M.T.; HUNTER, J.E.; GOTTWALD, T. Reinstatement of *Xanthomas citri* (ex Hasse) and *X*. *phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 39, p. 14-22, 1989.

GÜRTLER, V.; STANISICH,V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, New York, v. 142, p. 3-16, 1996.

HONEYCUT, R.J.; SOBRAL, B.W.S.; MCCLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphism diagnostic of *Xanthomonas albilineans.* **Microbiology**, New York, v. 141, p. 3229-3239, 1995.

JONES, J.B.; STALL, R.E.; BOUZAR, H. Diversity among xanthomonads pathogenic on tomato and pepper. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto**,** v. 36, p. 41-48, 1998.

KIM, B.J.; LEE, S.H.; LYU, M.A.; KIM, S.J.; BAI, G.H.; KIM, S.J.; CHAE, G.T.; KIM, E.C.; CHA, C.Y.; KOOK, Y.H. Identification of mycobacterial species by conparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpo*B). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1714-1720, 1999.

KIM, B.J.; LEE, K.H.; PARK, B.N.; KIM, S.J.; BAI, G.H.; KIM, S.J.; KOOK, Y.H Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the rna polymerase gene (*rpo*B). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 2102-2109, 2001.

KIM, K.S.; KO, K.S.; CHANG, M.W.; HAHN, T.W.; HONG, S.K.; KOOK, Y.H. Use of *rpo*B sequences for phylogenetic study of *Micoplasma* species. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 226, p. 299-305, 2003.

KIM, B.J.; LEE, K.H.; YUN, Y.J.; PARK, E.M.; PARK, Y.G.; BAI, G.H.; CHA, C.Y.; KOOK, Y.H. Simultaneous identification of rifampin-resistant *Micobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism and sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpo*B). **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 111-118, 2004.

KO, K.S.; LEE H.K.; PARK, M.Y.; LEE, K.H, YUN, Y.J.; WOO, S.Y., MIYAMOTO, H., KOOK Y.H. Application of RNA polymerase β-subunit gene (*rpo*B) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 2653-2658, 2002.

KO, K.S.; HONG S.K.; LEE K.H.; LEE H.K.; PARK M.Y.; MIYAMOTO H. & KOOK Y.-H. Detection and identification of *Legionella pneumophila* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the RNA polymerase gene (*rpo*B). **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 54, p. 325-337, 2003.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 5, p. 150-163, 2004.

KWON, H.J.; PARK, K.Y.; KIM, S.J.; YOO, H.S. Application of nucleotide sequence of RNA polymerase β-subunit gene (*rpo*B) to molecular differentiation of serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 82, p. 121-129, 2001.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M.(Eds). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1991. p. 115-175.

LEE, S.H.; KIM, B.J.; KIM, J.H.; PARK, K.H.; KIM, S.J.; KOOK, Y.H. Differentiation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato on the basis of RNA polymerase gene (*rpo*B) sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 2557-2562, 2000.

MAES, M.; GARBEVA, P.; KAMOEN, O. Recognition and detection in seed of the *Xanthomonas* pathogens that cause cereal leak streak using rDNA spacer sequences and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 63-69, 1996.

MANCEAU, C.; HORVAIS, A. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato.* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 498-505, 1997.

MASSOL-DEYA, A.A.; ODELSON, D.A.; HICKEY, R.F.; TIEDJE, J.M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: AKKERMANS, A.D.L.;. VAN ELSAS; J.D.; DE BRUIJN, F.J. (Ed.). **Molecular microbial ecology manual.** Kluwer: Academic Publishers, 1995.

MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpo*B sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 26, p. 1005-1011, 1997.

MOORE, E.R.B.; KRÜGER, A.S.; HAUBEN, L.; SEAL, S.E.; DE BAERE, R.; DE WACHTER, R.; TIMMIS, K.N.; SWINGS, J. 16S rRNA gene sequence analysis and inter- and intragenic relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia.* **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 151, p. 145-153, 1997.

MORSE, R.; COLLINS, M.D; O'HANLON,K.; WALBANKS, S.; RICHARDSON, P.T. Analusis of the β subunit of DNA-dependent RNA polymerase does not support the hypothesis inferred from 16 RNA analysis that *Oenococcus oeni* (formely *Leuconostoc oenos*) is a tachytelic (fast-evolving) bacterium. **Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, p. 1004-1009, 1996.

MUMFORD, R.; BOONHAM, N.; TOMLINSON, J.; BARKER, I. Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. **European Journal of Plant Pathology**. Dordrecht, v. 116, p. 116-119, 2006.

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

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology,** New York, v. 9, p. 1-55, 1986.

PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extration of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 151-156, 1989.

QHOBELA, M.; LEACH, J.E.; CLAFIN, L.E.; PEARSON, D.L. Characterization of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *hocilcola* by PAGE of membrane proteins and by REA and RFLP of genomic DNA. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 32-36, 1991.

RENESTO, P.; GAUTHERET, D.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Determination of the *rpo*B gene sequences of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* for phylogenic analysis. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 831-836, 2000.

RENESTO, P.; GOUVERNET, J.; DRANCOURT, M.; ROUX, V.; RAOULT, D. Use of *rpo*B gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 430-437, 2001.

ROWLAND, G.C.; ABOSHIKIWA, M.; COLEMAN, G. Comparative sequence analysis and predicted phylogeny of the DNA-dependent RNA polymerase β subunit of *Staphylococcus aureus* and other eubacteria. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 21, p. 40, 1992.

SCHAAD, N.W. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, p. 885-890, 1982.

SOARES, F.M.P.; VAVARINI, P.J.; MENTEN, J.O.M. Meio semi-seletivo para detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente causal da mancha bacteriana pequena do tomateiro. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 21-26. 2001.

TOWNER, K.J.; COCKAYNE, A. **Molecular methods for microbial identification and typing**. London: Chapman & Hall, 1993. 200 p.

Bibliografia Consultada

KOROLKOVAS, A.K.; CARNEIRO DE FRANÇA, F.F.A. **Dicionário terapêutico guanabara.** Ed. 2004/2005. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

SUSLOW, T.; V.; SCHROTH, M. N.; ISAKA, M. Application of a rapid method for Gram-differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 917-918, 1982.

YOUNG, J.M.; BULL, C.T.; DE BOER, S.H.; FIRRAO, G.; GARDAN, G.; SADDLER, G.E.; STEAD, D.E.; TAKIKAWA, Y. Names of plant pathogenic bacteria published since 1995. International Society for Plant Pathology, 30/03/2004. Disponível em <http://www.isppweb.org/names_bacterial_new2004.asp>. Acesso em: 26 out. 2006.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo