

INOCULAÇÃO E DETECÇÃO DE
Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum*
EM SEMENTES DE ALGODÃO
(Gossypium hirsutum L.)

JULIANA FRANCO BARBOSA

2007

JULIANA FRANCO BARBOSA

INOCULAÇÃO E DETECÇÃO DE
Xanthomonas axonopodis **pv. malvacearum**
EM SEMENTES DE ALGODÃO
(Gossypium hirsutum L.)

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Barbosa, Juliana Franco.

Inoculação e detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) / Juliana Franco Barbosa. -- Lavras : UFLA, 2007.

135 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Bibliografia.

1. Mancha angular. 2. Bactéria fitopatogênica. 3. Sementes. 4. rep-PCR. 5. Imunofluorescência. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.5121
633.51932

JULIANA FRANCO BARBOSA

**INOCULAÇÃO E DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv.
malvacearum EM SEMENTES DE ALGODÃO (*Gossypium hirsutum* L.)**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Curso
de Doutorado em Agronomia, área de
concentração Fitopatologia, para obtenção do
título de “Doutor”.**

APROVADA em 08 de agosto de 2007

Dr. Luís Otávio S. Beriam	INSTITUTO BIOLÓGICO
Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho	UFLA
Profa. Dra. Antonia dos Reis Figueira	UFLA
Prof. Dr. José da Cruz Machado	UFLA

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos maravilhosas em minha vida, meu pai e rocha da minha salvação.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento de parte deste trabalho.

Ao Professor Ricardo Magela de Souza, pela orientação, paciência e confiança.

Aos professores Antonia dos Reis Figueira, José da Cruz Machado e Édila Vilela Resende Von Pinho, pelas valiosas sugestões e participação na banca examinadora.

Ao pesquisador Luís Otávio S. Beriam pelo antissor, pelas sugestões e participação na banca examinadora.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos.

Aos funcionários e laboratoristas do DFP que sempre me auxiliaram.

Aos colegas de labuta do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Ana Maria, Ana Beatriz, Carolina, Flávio, Nilvanira, Henrique, Gustavo, Luís Fernando, Juliana Pires pelas sugestões e apoio constantes e à Doutora Alessandra Ishida pela colaboração em todas as fases deste trabalho.

Aos colegas do curso de doutorado, Fernando e Jadir, pela convivência solícita.

À Dra. Deila Magna pelo apoio nas análises estatísticas.

À Eloísa Leite pelo apoio com as amostras para análise no microscópio eletrônico de varredura, a Larissa e ao Fabiano pela análise das eletromicrografias.

A Professora Giovana Augusta Torres e a Dra. Rosilene Pereira que me auxiliaram com as análises de imunofluorescência.

Ao Julio Negreli da Syngenta, pelo envio das sementes de algodão.

Ao Dr. Rui Pereira Leite Junior, Dra. Leimi Kobayasti, Dra. Norimar Denardi e ao Victor Shigueru, pelos isolados de Xam.

Aos meus pais, Lais e Renato e meus irmãos Renata e Narciso pelo amor incondicional.

À minha avó, Divina e a Tia Leila e a todos das famílias Franco e Barbosa e amigos, pela torcida.

Ao meu esposo, Anderson, meu maior incentivador.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1 Inoculação e detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i> L).....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 A cultura do algodão.....	4
2.2 A mancha angular do algodoeiro – histórico e etiologia	5
2.3 Disseminação e transmissão	6
2.4 Inoculação artificial de bactérias em sementes.....	8
2.5 O uso da condicionamento osmótico para inoculação de patógenos em sementes.....	8
2.6 Detecção de fitobactérias em sementes.....	11
2.7 Técnicas baseadas em PCR para caracterização e identificação de <i>Xanthomonas</i>	15
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
CAPÍTULO 2 Uso da condicionamento osmótico na inoculação de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão	27
RESUMO.....	28
ABSTRACT	30
1 INTRODUÇÃO.....	32
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Origem e caracterização das sementes utilizadas	34
2.2 Obtenção do isolado de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	34
2.3 Preparo do meio de cultura básico	34

2.4 Pré-condicionamento de sementes de algodoeiro em relação à condicionamento osmótico do substrato agarizado	35
2.5 Crescimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em meio 523 com diferentes níveis de restrição hídrica.....	36
2.6 Idade da cultura de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	37
2.7 Inoculação de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão.....	38
2.8 Comparação de métodos de inoculação de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão.....	39
2.9 Preparo das sementes inoculadas e observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV).....	41
3 RESULTADOS	42
3.1 Sanidade das sementes.....	42
3.2 Pré-condicionamento de sementes de algodão em relação à condicionamento osmótico do substrato agarizado.....	42
3.3 Crescimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em meio 523 com diferentes níveis de restrição hídrica.....	44
3.4 Uso da condicionamento osmótico para inoculação de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão	45
3.5 Comparação de métodos de inoculação de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes de algodoeiro	56
3.6 Observação de sementes de algodão inoculadas com <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em microscópio eletrônico de varredura (MEV)	59
4 CONCLUSÕES.....	62
5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	63

CAPÍTULO 3 Virulência de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	67
RESUMO.....	68
ABSTRACT	69
1 INTRODUÇÃO.....	70
2 MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	72
2.2 Reação de hipersensibilidade em plantas de fumo, tomate e pimentão	72
2.3 Patogenicidade dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em plântulas de algodoeiro	73
2.4 Amplificação dos genes da região ITS, ERIC e REP dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	74
2.4.1 Preparo do inóculo para extração do DNA	74
2.4.2 Extração do DNA dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	74
2.4.3 Amplificação dos primers 16S e 23S.....	75
2.4.4 Condições da PCR para os primers ERIC e REP.....	75
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4 CONCLUSÕES	86
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
CAPÍTULO 4 Desenvolvimento de meio semi-seletivo para detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão	91
RESUMO.....	92
ABSTRACT	93
1 INTRODUÇÃO.....	94
2 MATERIAL E MÉTODOS	95

2.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	95
2.2 Utilização de manitol em meio de cultura para o isolamento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> a partir de sementes de algodão	95
2.3 Antibióticos na inibição do crescimento <i>in vitro</i> de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	96
2.3.1 Antibiograma quantitativo	97
2.4 Sensibilidade de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> a fungicidas recomendados para a cultura do algodão	97
2.5 Sensibilidade de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> à exposição simultânea a antibióticos e fungicidas	98
2.6 Determinação do índice de repressão	99
2.7 Determinação do índice de supressão	99
3 RESULTADOS	101
3.1 Antibióticos na inibição do crescimento <i>in vitro</i> de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	101
3.2 Antibiograma quantitativo	103
3.3 Sensibilidade de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> a fungicidas recomendados para a cultura do algodão	104
3.4 Sensibilidade de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> à exposição simultânea a antibióticos e fungicidas	105
3.5 Índice de repressão do crescimento <i>in vitro</i> de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> pelo meio 523 modificado.....	108
3.6 Índice de supressão à microbiota associada às sementes de algodão pelo meio 523 modificado	109
4 CONCLUSÃO	111
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

CAPÍTULO 5 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão	114
RESUMO.....	115
ABSTRACT	116
1 INTRODUÇÃO.....	117
2 MATERIAL E MÉTODOS	119
2.1 Origem e perfil do lote de sementes	119
2.2 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes	119
2.4 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> por imunofluorescência.....	121
3 RESULTADOS	124
3.1 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes inteiras de algodão	124
3.2 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em extratos de sementes.....	126
3.3 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> por imunofluorescência.....	127
4 CONCLUSÕES	130
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	134

RESUMO

BARBOSA, J. F. **Inoculação e detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.).** 2007. 135 p. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.*

No presente trabalho objetivou-se desenvolver uma técnica de inoculação artificial de sementes de algodão com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), por meio do condicionamento osmótico do meio, visando a obtenção de sementes uniformemente contaminadas, sem alterar o poder germinativo das mesmas, bem como estabelecer metodologia segura, eficiente e rápida de detecção da bactéria em sementes de algodão. Avaliou-se a variabilidade entre isolados de Xam por meio da inoculação artificial em plantas de algodão, hipersensibilidade em plantas de fumo, tomate e pimentão, amplificação do DNA utilizando-se os primers 16S e 23S, ERIC e REP; desenvolveu-se um meio de cultura semi-seletivo para a detecção de Xam em sementes de algodão e testou-se a eficiência da técnica de imunofluorescência indireta na detecção da bactéria, utilizando-se três tipos de extrato de sementes: bruto, centrifugado e filtrado em membrana de Millipore®. Por meio do condicionamento osmótico, verificou-se que não houve diferença estatística entre os solutos manitol e sacarose quanto à porcentagem de germinação de sementes e crescimento bacteriano, e que nos potenciais osmóticos de -0,85 e -1,0 MPa a inibição de germinação das sementes sobre o meio 523 foi mais eficiente. A inoculação por condicionamento osmótico foi eficiente e o tempo de 24 horas de exposição à bactéria permitiu obter sementes com 84,5% de incidência de Xam. Eletromicrografias, realizadas por microscopia de varredura, revelaram a presença de Xam associada à tegumento das sementes em todos os tempos de inoculação. A incidência da bactéria nas sementes, detectada pelo plaqueamento direto em meio semi-seletivo, foi maior no método de inoculação por condicionamento osmótico com 88% de sementes infectadas, não havendo diferença significativa entre os métodos de inoculação utilizados para a porcentagem de cotilédones com sintomas da mancha angular. Diferenças quanto a virulência dos isolados em algodão foram observadas, sendo constatados quatro grupos distintos entre si. Para a reação de hipersensibilidade, plantas de tomateiro foram as mais indicadas na identificação de isolados patogênicos de Xam. Os primers 16S e 23S permitiram obter fragmentos de aproximadamente 680 pb. A amplificação via PCR utilizando a unidade

* Comitê orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Co-orientadora), José da Cruz Machado – UFLA (Co-orientador).

repetitiva REP, foi efetiva para todos os isolados de Xam. No entanto, o número de padrões de bandas em cada isolado foi significativamente menor quando comparado aos primers ERIC. Utilizando-se o meio 523 de Kado & Heskett (1970) como base, desenvolveu-se o seguinte meio seletivo: 30 g manitol, 4 g de extrato de levedura, 8 g de caseína hidrolizada, 2 g de K_2HPO_4 , 0,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g agar, 1000 mL água destilada, após autoclavagem adicionar, 50 mg de cefalexina, 50 mg de cefadroxil, 10 mg de clorotalonil e 300 μL de triadimenol. Comparado aos meios de cultura semi-seletivos descritos por Metha et al., (2005) e Dezordi (2006), verificou-se que todos os meios utilizados foram eficientes na recuperação de Xam em sementes. Por meio da técnica de imunofluorescência indireta, foi possível verificar a presença de Xam em todos os extratos avaliados.

ABSTRACT

BARBOSA, J. F. **Inoculation and detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in cotton seeds (*Gossypium hirsutum* L.).** 2007. 135p. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant Pathology) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The objectives in the present study were to develop a technique for artificial inoculation of cotton seeds with *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), through the use of the osmotic conditioning technique, aiming to obtain uniformly contaminated/infected seeds, with preservation of the germination potential of the seeds, as well as to establish a safe, efficient and fast methodology for the detection of the bacterium in cotton seeds. The variability of isolates of Xam was assessed through the artificial inoculation of cotton plants, hypersensitivity in tobacco, tomato and sweet pepper plants and amplification of DNA with the primers 16S and 23S, ERIC and REP. A semi-selective culture medium was developed for the detection of Xam in cotton seeds and the efficiency of the indirect immunofluorescence technique was tested in the detection of this bacterium. In the artificial inoculation with the osmotic conditioning technique it was verified that the solutes mannitol and sucrose had no statistical difference in relation to percentage of seed germination and bacterial growth. The osmotically modified 523 medium with potential of -0.85 and -1.0 MPa presented the strongest effect on the inhibition of seed germination. The inoculation through osmotic conditioning technique was efficient and the 24 hours seed exposition to the bacterial inoculum allowed the recovering of seeds with 84.5% incidence of that pathogen. Electromicrographs (taken in a Scanning Electron Microscope) revealed the presence of Xam associated with the seed peel in all the inoculation periods. The incidence of the bacterium in the seeds, detected by direct plating in semi-selective medium, was higher in the inoculation method that used osmotic conditioning, with level of 88% occurrence, with no statistical difference for the percentage of cotyledons with symptoms of bacterial blight amongst the inoculation methods used. Differences in virulence amongst the isolates in cotton were observed, with four distinct groups. In relation to HR reaction, the tomato plants were the most adequate host for the identification of the Xam pathogenic strains. The primers 16S and 23S amplified fragments of approximately 680 bp. The PCR amplification using the REP, repetitive unit, was effective to all Xam strains, however, the number of band patterns in each

* Advising committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Adviser), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Co-adviser), José da Cruz Machado – UFLA (Co-adviser).

strain was significantly lower when compared with the ERIC oligonucleotides. Using the 523 medium of Kado and Heskett (1970) as the basal medium, the following selective medium was developed: 30 g of mannitol, 4 g of yeast extract, 8 g of hydrolyzed casein, 2 g of K_2HPO_4 , 0.3 g of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g of agar, 1000 mL of distilled water, with addition of 50 mg of cefalexin, 50 mg of cefadroxil, 10 mg of chlorathalonil and 300 μ L of triadimenol after autoclaving. This medium and the semi-selective culture medium of Metha et al., (2005) and Dezordi (2006), were all effective in recovering of Xam from the seeds. The efficiency of the indirect immunofluorescence technique also was tested by using three types of seed extracts (crude, centrifuged and filtered in Millipore® membrane), with the observation of the bacterium in all extracts when using this technique.

CAPÍTULO 1

**INOCULAÇÃO E DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv.
malvacearum em SEMENTES DE ALGODÃO (*Gossypium hirsutum* L.)**

1 INTRODUÇÃO

Xanthomonas axonopodis pv. *malvaceraum* (Smith) (Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, 1995) (= *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*) (Xam) é o agente etiológico da mancha angular do algodoeiro. Esta doença há muito tempo controlada na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum*) pelo uso de cultivares resistentes, volta ao cenário produtivo como uma das enfermidades mais importantes da cultura, devido ao extenso cultivo em regiões nas quais predominam condições favoráveis à sua ocorrência.

As sementes contaminadas representam o principal veículo de introdução do patógeno na lavoura, pois a bactéria pode estar a elas associadas tanto externa quanto internamente, sendo ambas as formas eficientes na transmissão da doença. No campo, condições favoráveis para o desenvolvimento do algodoeiro são as mesmas requeridas pelo patógeno para infectar o hospedeiro suscetível. Portanto, todo o investimento depositado em uma lavoura pode estar comprometido com a utilização de sementes contaminadas.

Para o controle efetivo desta bacteriose seria necessário a produção de sementes certificadas, assegurando-se assim, a utilização de sementes sadias. O programa envolveria uma série de inspeções de campo, complementadas com exame de sanidade das sementes em laboratório (Schaad, 1988). Para explorar este último aspecto, é necessário contar com métodos específicos, sensíveis e de fácil execução para a detecção de bactérias em sementes.

A escolha do método é função de dados epidemiológicos, níveis de tolerância do patógeno na semente, taxa de transmissão da bactéria pela semente e correlação entre experimentos de campo e laboratório (Schaad, 1988). No entanto, para realizar estes estudos, deve haver a disponibilidade de lotes de sementes uniformemente contaminadas, sendo necessário, portanto, o

desenvolvimento de uma técnica onde as sementes inoculadas artificialmente tenham alto poder de germinação, mesmo após a inoculação e armazenagem.

Deste modo, um dos objetivos neste trabalho foi o desenvolvimento de uma técnica de inoculação artificial de sementes de algodão com Xam, para a obtenção de sementes uniformemente contaminadas, mantendo-se o poder germinativo das mesmas.

A detecção de patógenos associados às sementes é fator essencial para a adoção de práticas de controle, evitando-se a introdução do inóculo em áreas livres ou a utilização excessiva de defensivos químicos ou outras práticas de controle que aumentam o custo de produção, e para a determinação de padrões de tolerância.

Várias técnicas foram desenvolvidas para a detecção de fitobactérias em sementes, entretanto, especificamente para Xam em sementes de algodão os métodos são escassos. Desse modo, no presente trabalho também objetivou-se, estabelecer metodologia segura, eficiente e rápida de detecção de Xam em sementes de algodão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do algodão

O cultivo do algodão no Brasil sofreu grandes modificações tecnológicas, as quais criaram um novo modelo produtivo, com extensas áreas de plantio e mecanização da lavoura desde o plantio até a colheita, aliado aos investimentos em qualidade de fibra, melhorando o produto interno e principalmente visando ao comércio exterior. Além disso, ocorreu o fortalecimento e o crescimento da indústria têxtil no país (Agriannual, 2007; Beltrão, 1999). O Brasil se destaca com uma das maiores produtividades do mundo, devido ao alto grau tecnológico das lavouras, principalmente do Centro-Oeste, onde a cotonicultura está cada vez mais tecnificada (Agriannual, 2007).

A cultura do algodão está entre as de maior importância econômica e social para o Brasil. Na agricultura familiar, o algodão contribui consideravelmente para a fixação do pequeno produtor no campo, pelo papel que exerce na geração de renda e empregos (Corrêa, 1989).

A expansão da área de plantio e do fluxo geográfico propiciou o cultivo do algodão no Centro-Oeste, o que contribuiu para a manifestação de novas doenças e até mesmo aquelas já conhecidas e que não causavam perdas à cultura no passado, manifestaram-se no presente, trazendo novos desafios aos pesquisadores (Camargo, 2003; Penna, 2000). Os cerrados dos estados de Mato Grosso, Bahia e Goiás, representam a maior área plantada e se caracterizam pelo emprego de alta tecnologia na produção (Suassuna et al., 2006). Em relação ao ano safra 2006/07, há previsão de aumento da área plantada (Agriannual, 2007).

2.2 A mancha angular do algodoeiro – histórico e etiologia

A mancha angular é uma doença potencialmente importante para a cultura do algodão, pois o agente etiológico, *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* está distribuído em várias regiões de cultivo, sendo problemático naquelas em que as chuvas ou a irrigação disseminam o patógeno durante a estação de produção (Akello & Hillocks, 2002; Cia & Salgado, 2005). Além disso, a saturação do tecido hospedeiro e as injúrias mecânicas causadas pelas chuvas fortes, irrigação ou granizo e a alta umidade relativa aumentam a severidade da mancha angular (Brinkerhoff, 1970).

Os sintomas apresentados nas folhas de algodão após a colonização pela bactéria são lesões angulosas, inicialmente de coloração verde e oleosa e posteriormente parda e necrosada. O patógeno pode ser encontrado nas maçãs, causando manchas semelhantes às induzidas nas folhas, podendo ainda, em condições, especiais incidir nos pecíolos, pedúnculos e hastes principais da planta (Cia, 1977).

Os estômatos e hidatódios representam a via preferencial de penetração da bactéria nas folhas. Com a expansão dos tecidos suscetíveis, aquelas folhas com lesões encharcadas, não mortas até uma semana ou mais depois da infecção, sofrem reação de hipersensibilidade (HR) e dentro de dois dias há colapso do tecido, necrose e dessecação (Al-Mousawi et al., 1982; Cason et al., 1977). Em observações ultra-estruturais foram verificados em tecidos suscetíveis, a degeneração de organelas e da membrana plasmática, o preenchimento dos espaços intercelulares pelas bactérias e por uma matriz fibrilar e, em seis dias, o rompimento das paredes celulares (Al-Mousawi et al., 1982).

Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum*, é uma bactéria gram-negativa, movimenta-se por apenas um flagelo polar e, em meio de cultura, as colônias são lisas e amarelas (Watkins, 1981).

Hunter et al. (1968) identificaram 15 raças de Xam quanto aos sintomas em diferentes hospedeiros. Posteriormente foram identificadas mais duas raças na Índia (Brinkerhoff, 1970). No Brasil foram descritas três raças no estado de São Paulo (Cia, 1972). Atualmente estão descritas 20 raças de Xam em diferentes países da África, incluindo um sintoma mais severo, denominado “blackarm” em que ocorre a dispersão do patógeno da folha para o pecíolo e a queda deste, resultando na perda das maçãs (Akello & Hillocks, 2002).

O inóculo de Xam está presente no campo em resíduos de colheita anteriores ou pode ser introduzido associado às sementes. Lesões nos cotilédones são incitadas pela bactéria dentro da semente durante o processo de germinação.

2.3 Disseminação e Transmissão

Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum* está associada às sementes tanto interna como externamente (Brinkerhoff & Hunter, 1963). Sob condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, a incidência e severidade da mancha angular em uma determinada área em qualquer estação de crescimento estão diretamente relacionadas à infecção das sementes e à suscetibilidade das cultivares de algodão. Segundo Bomfeti, Rossi & Mehta (2003) Xam pode sobreviver mantendo suas características patogênicas por até 21 meses, a 5⁰C, nas sementes do algodoeiro.

O inóculo presente nos restos culturais pode ser disperso sobre a folhagem nova e sobreviver epifiticamente. Quando condições ambientes são favoráveis, a bactéria penetra na folha através dos estômatos ou hidatódios. Nas lesões, o exsudato bacteriano fica na superfície foliar para posterior dispersão. O patógeno está pronto para infectar a semente quando as maçãs infectadas, maduras, se abrem e recebem a água da chuva antes da colheita.

Os sintomas da mancha angular desenvolvem-se à temperatura média de 25°C e umidade relativa de 85%. O vento e as chuvas de granizo aumentam a severidade da doença significativamente. Dentro de estufas não ocorre o desenvolvimento da mancha angular sob temperaturas abaixo de 25°C ou se as folhas forem mantidas secas. O patógeno pode sobreviver por longos períodos nos restos culturais infectados ou dentro da semente. A sobrevivência em resíduos da colheita é favorecida por condições de tempo seco. A presença da bactéria na semente permite a sua dispersão por longas distâncias e introdução, incluindo novas raças, em áreas novas, países e campos (Allen, 2006).

De acordo com Schnathorst (1964) a porcentagem de infecção de mudas de algodão por Xam está relacionada ao grau de contaminação das sementes pelo patógeno, que varia de local para local e de ano a ano, como verificado por Poswal & Erinle (1983) nos anos 1979 e 1980, em amostras de sementes provenientes de algumas regiões da Nigéria. Resultados semelhantes foram observados por Hunter & Brinkerhoff (1964), que concluíram que o grau de desenvolvimento da mancha angular em qualquer local ou região está relacionado à extensão da infecção na semente, às diferenças nos níveis de suscetibilidade do hospedeiro, à presença de possíveis raças virulentas do patógeno e às condições climáticas favoráveis.

Assim, a combinação entre avaliações anuais de amostras de sementes de diferentes locais e pesquisas com plantas expressando os sintomas da doença é uma ferramenta importante dentro do monitoramento do desempenho de cultivares, dos níveis de doença e da evolução de raças do patógeno (Hunter & Brinkerhoff, 1964; Akello & Hillocks, 2002).

2.4 Inoculação artificial de bactérias em sementes

A inoculação artificial na avaliação de testes de sanidade de sementes auxilia no desenvolvimento de métodos de controle e nos estudos epidemiológicos de bacterioses, os quais requerem lotes de sementes uniformemente contaminadas. Pode ser útil ainda na verificação da localização do patógeno nas sementes e na determinação do seu efeito sobre a qualidade fisiológica das mesmas, assegurando assim resultados experimentais mais próximos da realidade (Valarini & Menten, 1991).

Dentre os métodos usados para a inoculação de fitobactérias em sementes, o mais freqüente tem sido a imersão das mesmas em suspensão bacteriana (Halfon-Meiri & Volani, 1977; Wrather et al., 1986; Moffet & Wood, 1985), onde provavelmente, a associação da bactéria com a semente seja somente externa (Valarini & Menten, 1991). Também tem sido utilizada a inoculação de plantas para a produção de sementes infectadas (Marques et al., 1994), embora seja um método demorado e requer espaço para a propagação de plantas. Outro método utilizado é o de contato da semente diretamente com a colônia bacteriana (Valarini & Menten, 1991). No entanto, dependendo do tempo de exposição à colônia bacteriana, há redução significativa do poder germinativo das sementes, o que não é desejável numa técnica de inoculação artificial.

2.5 O uso do condicionamento osmótico para inoculação de patógenos em sementes

A germinação de sementes é caracterizada pela retomada do desenvolvimento do eixo embrionário interrompido na maturidade fisiológica (Carvalho & Nakagawa, 1988). Esse processo é iniciado com a entrada de água

na semente por embebição e utilização de substâncias de reserva da própria semente (Popinigis, 1977). Em condições favoráveis de germinação, as sementes geralmente têm um padrão trifásico de embebição (Bewley & Black, 1994). Na fase I, ocorre a rápida absorção de água devido à diferença do potencial osmótico entre a semente e o substrato e o início da degradação das reservas da semente. Na fase II ocorre menor velocidade de embebição, já que o potencial hídrico da semente e do substrato se aproximam. Esta fase é caracterizada pelo transporte de substâncias desdobradas na fase anterior para o tecido meristemático e por pequenas mudanças no conteúdo de água das sementes. A fase III de germinação é caracterizada pelo aumento na velocidade de embebição e pelo crescimento visível do eixo embrionário. Nesta fase, as substâncias desdobradas na fase I e transportadas na fase II são organizadas em substâncias complexas para formar o citoplasma, o protoplasma e a parede celular, permitindo o crescimento do eixo embrionário (Bewley & Black, 1994).

Técnicas de controle da hidratação e germinação de sementes, como condicionamento osmótico ou “priming” ou condicionamento fisiológico (Heydecker, Higgins & Turner, 1975; Braccini, 1996; Guimarães, 1991; Vasquez, 1995) foram desenvolvidas com base na seqüência de eventos do processo germinativo. Tais técnicas visam controlar a velocidade de embebição de água pelas sementes, pelo uso de soluções osmóticas ajustadas a potenciais hídricos que permitam a ocorrência dos processos fisiológicos iniciais (fases I e II), sem atingir o grau de umidade suficiente para que ocorra o alongamento celular e, conseqüentemente, a emergência de radícula (Bradford, 1986).

Vários produtos foram utilizados para o ajuste do potencial hídrico de substratos envolvendo o estudo de condicionamento osmótico de sementes de diferentes espécies. Entre estes, cita-se os solutos iônicos, como NaCl, KCl, KNO₃, e não iônicos, como manitol e polietileno glicol (Eira, 1988; Guimarães, 1991; Bracini, 1996; Camargo, 1998).

Em estudos de estresse hídrico, Guimarães (1991), verificou que os potenciais de -6, -9 e -12atm, induzidos por NaCl e Manitol, a partir de 24 horas reduziram significativamente a germinação de sementes de algodão. Em estudos semelhantes com sementes de soja, soluções de NaCl, manitol e polietileno glicol, com potenciais mais negativos que -0,3 MPa, utilizadas para umedecer o substrato, reduziram significativamente a germinação e o vigor das sementes (Braccini, 1996). Nesses estudos, o potencial hídrico de -0,9 MPa, induzido principalmente por polietileno glicol e NaCl, afetou severamente a emissão da radícula.

Dessa forma, vários pesquisadores utilizaram o condicionamento osmótico para a inoculação de fungos em sementes de algodão (Souza, 2006; Araújo et al., 2006; Celano, 2004; Machado et al., 2004; Machado, 2002). Segundo Machado et al., 2004, o potencial hídrico até o nível de -1,0 MPa proporcionou maiores índices de infecção das sementes de algodão por fungos sem inviabiliza-las para usos posteriores, sendo que a contaminação da sementes, com *C. gossypii*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* e *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* variou em função do período de exposição das sementes a estes fungos.

Para a inoculação de bactéria em sementes, no entanto, nos métodos descritos, a semente fica em contato com a suspensão bacteriana ou em contato com a colônia em meio sem o condicionamento osmótico. No entanto, Galli et al., (2001), relataram que após a inoculação de sementes em meio de cultura sem o condicionamento osmótico, decorridas 48 horas de contato, observou-se que algumas sementes germinaram, o que torna necessário a utilização das sementes logo após a sua retirada do meio de cultura, seja para a realização de testes de germinação, testes de sanidade ou para a semeadura no campo, descartando-se a possibilidade de armazenamento das sementes contaminadas para uso posterior.

Segundo Kobayashi (2002) o meio 523 suplementado com manitol a - 1,05 MPa foi eficiente na inoculação de Xap em sementes de feijão. Neste experimento foi possível recuperar a bactéria tanto externa quanto internamente na semente, por meio do plaqueamento direto em meio de cultura. Porém, o maior tempo de exposição das sementes à bactéria não aumentou o índice de infecção, pois após 96 horas de exposição a porcentagem de infecção foi de 77% e, após 36, horas 98%.

2.6 Detecção de fitobactérias em sementes

As técnicas de detecção de patógenos em sementes vêm sendo cada vez mais estudadas. A importância da qualidade sanitária vem ganhando espaço juntamente com os padrões já estabelecidos para a qualidade genética e fisiológica das sementes. Para a determinação de padrões de tolerância a um patógeno específico, deve-se primeiro conhecer o comportamento deste patógeno no campo e em associação com a semente, a porcentagem de contaminação necessária para desencadear uma epidemia (Pinto et al., 2001; Talamini et al., 2002). Neste caso, técnicas de detecção e identificação do patógeno na semente são necessárias.

Vários métodos foram descritos para detecção de fitobactérias em lotes de sementes de diferentes culturas (Saettler, 1989; Schaad et al., 1995; Verdier, Ojeda & Mosqueda, 2001). Para a detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, o agente etiológico do crestamento de halo do feijoeiro, em sementes, os métodos descritos são baseados na inoculação de extratos em plantas testes, métodos imunológicos e uso de meio semi-seletivo (Guthrie et al. 1965; Lahman & Schaad 1985; Mohan & Schaad 1987). Entretanto, para o uso rotineiro apresentam as desvantagens de possuir baixa sensibilidade, ser demorado e induzir a ocorrência de resultados falso-positivos.

Essas e outras características limitam o uso de algumas técnicas, como o custo de implantação, tempo dispensado para obtenção dos resultados, espectro de uso, ou habilidade para diferenciar isolados em patovares. A sensibilidade e rapidez nos resultados são importantes ferramentas na escolha de um método de detecção, principalmente para análises de rotinas em laboratórios credenciados (Machado, 2002).

Assim, em 1993, Prosen et al. confirmaram a identificação de *P. syringae* pv. *phaseolicola* em sementes de feijão, pela técnica de PCR, a partir de colônias crescidas em meio de cultura semi-seletivo. Dessa forma, foi possível a detecção do patógeno de forma rápida, simples e com alta sensibilidade.

A aplicação da PCR para a diagnose de doenças, no entanto, é limitada pela presença de inibidores da reação. Esta inibição pode ser superada e a sensibilidade aumentada através do cultivo da bactéria em meio de cultura antes da PCR. Esta técnica foi descrita por Schaad et al., (1995) e tem como terminologia a sigla BIO-PCR.

Schaad et al. (1995) utilizaram esta técnica para o diagnóstico de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, em sementes de feijão. O método evita a detecção de células mortas presentes nas sementes, permitindo a detecção apenas de células viáveis (Schaad et al., 1995; Wang et al., 1999). O enriquecimento de células viáveis de bactérias em meio líquido ou sólido, permite a detecção do patógeno mesmo quando presente em baixos níveis nas sementes ou outros materiais de propagação (Schaad et al., 1995). Para o preparo de uma amostra, o extrato da planta é depositado sobre o meio líquido ou sólido, incubado de 15 a 72 h, dependendo do organismo, e as colônias resultantes usadas diretamente na PCR. Não é necessária a extração do DNA das bactérias, uma vez que a lise das células ocorrerá naturalmente durante a desnaturação inicial empregada no processo de amplificação (Schaad et al., 1995).

Protocolos de BIO-PCR foram desenvolvidos para várias bactérias como *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Schaad et al., 1995), *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Kobayashi, 2002), *Clavibacter michigenesis* subsp. *sepedonicus* (Schaad et al., 1999), *Ralstonia solanacearum* (Ito et al., 1998; Weller et al., 2000 a e b), *Xanthomonas albilineans* (Wang et al., 1999), *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Schaad et al., 2001), *Agrobacterium tumefaciens* (Weller & Stead, 2002) e *E. coli* (Sharma & Carlson, 2000). Quando o tempo é mais importante que a sensibilidade da técnica, BIO-PCR não é recomendado (Schaad et al., 1995).

Para a detecção de *Xanthomonas albilineans*, agente causal da escaldadura da folha da cana-de-açúcar, foram comparadas a eficiência e a segurança da PCR, da BIO-PCR, do ELISA e o isolamento clássico. As suspensões de *X. albilineans* foram preparadas a partir de extratos de toletes e de folha de cana-de-açúcar. A PCR clássica e a BIO-PCR apresentaram como vantagem a não necessidade dos testes de patogenicidade para se confirmar a identidade das colônias. O meio semi-seletivo foi tão sensível quanto a BIO-PCR, entretanto, sete dias foram necessários para a obtenção dos resultados, além da necessidade de se confirmar a identidade das colônias (Wang et al., 1999).

Outra técnica utilizada para detectar fitobactéria em sementes é a hibridização por Southern blot. Mosqueda-Cano & Herrera-Estrella (1997) utilizaram essa técnica para detectar o gene específico de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, codificador da phaseolotoxina. A detecção da bactéria em extrato aquoso de semente de feijão a partir de primers desenhados com base na seqüência da *argK* permitiu a detecção de um fragmento específico de 1 kb. O protocolo é simples uma vez que a PCR foi aplicada diretamente na suspensão bacteriana, evitando-se assim, a extração de DNA.

A bacteriose da mandioca, causada por *X. axonopodis* pv. *manihotis*, é particularmente uma das doenças mais destrutivas da cultura na América do Sul e África. O movimento de manivas infectadas, porém sem expressão de sintomas, é um dos principais meios de dispersão do patógeno, bem como as sementes contaminadas. O sucesso de um programa de certificação de manivas e sementes verdadeiras depende da disponibilidade de testes seguros para detectar o patógeno nos materiais de propagação (Verdier et al., 2001). A técnica de PCR foi eficiente para detecção desse patógeno em extratos de folha e manivas lesionadas. O número mínimo de células encontradas variou de 3×10^2 a 10^4 CFU/mL.

Para a detecção de *X. axonopodis* pv. *manihotis* em sementes naturalmente infectadas foi utilizada a técnica Nested-PCR, que consiste em um segundo ciclo de amplificação usando primers internos ao primeiro produto obtido na primeira PCR. Esta técnica foi específica, sensível e rápida, detectando de 1 a 2 células viáveis por reação. Ensaio com dot-blot foram desenvolvidos avaliando-se fragmentos de DNA de 898 bp como sonda para diagnose. Pela sonda foram detectados isolados da bactéria em extratos de folha e manivas lesionadas, nas raízes tuberosas e em sementes verdadeiras naturalmente contaminadas. A sensibilidade do método dot-blot foi de aproximadamente 10^3 CFU por reação (Verdier et al., 2001). Os mesmos autores testaram um anticorpo monoclonal (MAb) para o teste de ELISA em vários tecidos infectados. A sensibilidade do método foi de aproximadamente 10^3 CFU por reação (Verdier et al., 2001).

Dessa forma, fica evidente que as técnicas de detecção devem se adequar aos vários seguimentos dentro da pesquisa, com segurança e rapidez nos resultados em casos de programas de certificação ou indexação, condições do laboratório, incluindo o custo de novos equipamentos, características do organismo alvo e da planta hospedeira.

2.7 Técnicas baseadas em PCR para caracterização e identificação de *Xanthomonas*

Recentemente, vários trabalhos foram publicados avaliando-se a eficiência de anticorpos (Chittaranjan e De Boer, 1997; Vijayanand et al., 1999), análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (Lazo & Gabriel, 1987; Peters et al., 2004), análise de ácido graxos (Norman et al., 1997), DNA fingerprinting (Smith, Hennessy & Stead, 2001) e seqüências 16S rRNA (DeParasis & Roth, 1990), para caracterização de patovares de *X. campestris* ou grupos de isolados de vários patovares.

Vauterin et al. (1995) utilizando a técnica de hibridização DNA-DNA para análise de 183 isolados de *Xanthomonas*, propuseram uma nova classificação para o gênero.

Gurtler & Stanisich (1996) apresentaram uma revisão sobre pesquisas envolvendo as regiões espaçadoras 16S e 23S rDNA e concluíram que para a identificação de bactérias devem ser construídos primers referentes às regiões 2 do gene 16S rRNA e 10 do gene 23S rRNA.

A caracterização do gene 16S rRNA está bem estabelecida como padrão para identificação de espécies, gêneros e famílias de bactérias (Gurtler & Stanisich, 1996). O fato de muitas bactérias terem cópias múltiplas (alelos) por genoma do rRNA operon favorece a possibilidade de variações neste espaço entre isolados.

De acordo com Maes (1993) a amplificação por PCR de um único fragmento do gene 16S rDNA de 480 bp permitiu identificar diferenças entre fitobactérias do gênero *Xanthomonas*. DeParasis & Roth (1990) seqüenciaram parcialmente a molécula 16S rRNA de fitobactérias e encontraram variação na seqüência entre os gêneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Erwinia* na região entre as bases 1064-1090. Entretanto, as diferenças entre os 9 patovares de *Xanthomonas* testados foram mínimas.

Relações fenotípicas e genotípicas entre isolados de *X. campestris* pv. *zinniae* baseadas no padrão de reação serológica, perfis de ácido graxos, rep-PCR fingerprinting e da análise da seqüência da região 16S–23S rDNA foram semelhantes, mas claramente distintas de outras espécies de *Xanthomonas* incluindo, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria* e *X. hortorum* pv. *vitians* (Sahin et al., 2003). Por meio dos resultados foi demonstrada também que a técnica de rep-PCR fingerprinting é rápida, segura e prática para detectar e identificar *X. campestris* pv. *zinniae*.

A amplificação de um único produto de PCR (aproximadamente 680 bp) da região espaçadora 16S-23S rDNA de isolados representando os seis patovares de *X. campestris*, inclusive *X. campestris* pv. *zinniae*, sugere que esses são relacionados de perto e podem ser discriminados com base nas variações do tamanho desta região. Análise da seqüência do fragmento do DNA dos produtos amplificados por PCR dessa região 16S-23S rDNA revelaram semelhança entre as seqüências (aproximadamente 89-97%) dos isolados de *X. campestris* pv. *campestris*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *vitians* e *X. campestris* pv. *zinniae*. Porém, essas seqüências diferiram entre os isolados de forma significativa separando a espécie *X. campestris* pv. *zinniae* dos outros isolados testados. Estes resultados reafirmam os estudos prévios que sugerem que rep-PCR fingerprinting e a análise da região 16S-23S rDNA não são técnicas moleculares promissoras só para o cálculo de relações genômicas, mas também para detectar e identificar isolados bacterianos tal como *X. campestris* pv. *zinniae* (Gurtler & Stanisich 1996; Louws et al., 1994; 1995; Opgenorth et al., 1996).

Embora o seqüenciamento da região 16S-23S rDNA para diagnose de rotina seja caro e demorado é necessário realizar um estudo adicional para designação de primers específicos para PCR da região espaçadora 16S-23S

rDNA que possam ser usados para detecção e identificação rápida de *X. campestris* pv. *zinniae* e outras espécies de *Xanthomonas*.

A análise de rep-PCR foi desenvolvida com base na ocorrência de seqüências repetitivas conservadas (seqüências extragênicas palindrômicas repetitivas, REP, seqüências repetitivas intergênicas consenso de enterobactérias, ERIC, e elementos BOX) distribuídas dentro do genoma de diversas bactérias (Versalovic et al., 1991; Bruijn, 1992, Louws et al., 1994). O uso em conjunto dessas seqüências como primers na amplificação por PCR é denominada rep-PCR (Louws et al., 1994). Os três jogos de primers comumente usados para análise rep-PCR fingerprinting, correspondem às seqüências REP, ERIC e BOX tendo seus protocolos assim denominados, REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, respectivamente. Os primers são projetados para amplificar o DNA entre dois elementos repetitivos adjacentes, embora o anelamento dos primers a outras seqüências de DNA homólogas não possa ser descartado (Gillings & Holley, 1997). Uma ordem complexa de 10 a 30 ou mais fragmentos de PCR é gerada por genoma, variando em tamanho, menos de 200 bp para mais de 6 kb. Rep-PCR tem sido usado extensivamente para identificar patógenos, diferenciar isolados e para avaliar a diversidade genética de patógenos de planta. Em algumas revisões têm-se encontrado protocolos detalhados e aplicações de rep-PCR (Louws et al., 1995, 1999; Rademaker et al., 2000). Cada par de primers (REP, ERIC e BOX) é útil para o “fingerprinting” de diversas bactérias, incluindo, fitobactérias gram-negativas e gram-positivas, como também actinomicetes associados às plantas (Bruijn, 1992; Louws et al., 1994; Versalovic et al., 1991).

3 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AKELLO, B.; HILLOCKS, R. J.; Distribution and Races of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* on Cotton (*Gossypium hirsutum*) in Uganda. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 2, p. 65-69, Feb. 2002.

ALLEN, S. J. Bacterial blight - *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. In: _____. National Cotton Industry Biosecurity Plan - Appendix 3: Pest Risk Reviews, Communications Manager, Plant Health Australia. 70p. 2006. Disponível em: <http://www.planthealthaustralia.com.au>. Acesso em : 15 fev. 2007.

AL-MOUSAWI, A. H.; RICHARDSON, P. E.; ESSENBERG, M.; JOHNSON, W. M. Cotyledon and leaf ultrastructure of bacterial blight-immune cotton line inoculated with a low level of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, n. 9, p.1231–1234, Sept. 1982.

AL-MOUSAWI, A. H.; RICHARDSON, P. E.; ESSENBERG, M.; JOHNSON, W. M. Ultrastructural studies of a compatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, n. 9, p.1222–1230, Sept. 1982.

ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. Agriannual 2007. São Paulo: Instituto FNP, 2007. p. 198-201.

ARAÚJO, D. V.; POZZA, E.A.; MACHADO, J.C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CELANO, F. A. O.; CARVALHO, E. M.; CAMARGOS, V. N. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 35-40, jan./fev. 2006.

BELTRÃO, N. E. M. Bom negócio para o Nordeste. **Cultivar**, Pelotas, n. 8, p.19-20. 1999.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed., New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BOMFETI, C. A.; ROSSI, D.; MEHTA, Y. R. Longevidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., 2003, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: UFU, 2003. 1 CD-ROM.

BRACCINI, A. de L. **Relação entre potencial hídrico, condicionamento osmótico e qualidade fisiológica de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1996. 135 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p. 1105-1112, Oct. 1986.

BRINKERHOFF, L. A. Variation in *Xanthomonas malvacearum* and its relation to control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 8, p. 85-110, 1970.

BRINKERHOFF, L. A.; HUNTER, R. E. Internally infected seed as a source of inoculum for the primary cycle of bacterial blight of cotton. **Phytopathology**, St. Paul, v. 53, n. 12, p. 1397-1401, Dec. 1963.

BRUIJN, F. J. de. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprinting the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 7, p. 2180-2187, July 1992.

CAMARGO, R. de. **Condicionamento fisiológico de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 1998. 108 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAMARGO, T. V. **Análise de dois sistemas de cultivo do algodoeiro, associado ao desenvolvimento de doenças**. Rondonópolis: Fundação MT/FACUAL, 2003. 58 p. Disponível em: <http://www.facual.org.br/pesquisa/arquivos/relatorio_final_1109336555.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2006.

CARVALHO, N. M. de; NAGAKAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424 p.

CASON, E. T.; RICHARDSON, P. E.; BRINKERHOFF, L. A.; GHOLSON, R. K. Histopathology of immune and susceptible cotton cultivars inoculated with *Xanthomonas malvacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, n. 2, p.195–98, 1977.

CHITTARANJAN, S.; DE BOER, S. H. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* in geranium and greenhouse nutrient solution by serological and PCR techniques. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 6, p. 555–563, Aug. 1997.

CIA, E.; FUZATTO, M. G. Manejo de doenças na cultura do algodão. In: Cia, E.; Freire, E. C.; Santos, W. J. (Eds.). **Cultura do Algodoeiro**. Piracicaba: POTAFÓS, 1999. p.121-131.

CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 3, n. 3, p. 167-177, maio/jul. 1977.

CIA, E. **Variabilidade de *Xanthomonas malvacearum* (E.F. Smith) Dowson, no Estado de São Paulo**. 1972. 57 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: Hiroshi Kimati et al. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 2 v., cap. 8, p. 41-52.

CORRÊA, J. R. V. **Algodoeiro: informações básicas para seu cultivo**. Belém: Embrapa-UEPAE Belém, 1989. 29 p. (Documentos, 11).
de sementes de feijão contaminadas por *Xanthomonas campestris*

DEPARASIS, J. ROTH, D. A. Nucleic acid probes for identification of phyto-bacteria: Identification of genus specific 16S rRNA sequences. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 7, p. 618-621, July 1990.

EIRA, M. T. S. da. **Condicionamento osmótico de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) efeitos sobre a germinação e desempenho sob estresse hídrico, salino e térmico**. 1988. 90 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Letters of Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 17–21, July 1997.

GUIMARÃES, R. M. **Efeito do condicionamento osmótico sobre a germinação e desempenho de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sob condições ideais e de estresse térmico, hídrico e salino.** 1991. 78 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras – UFLA, Lavras.

GURTLER, V.; STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. **Microbiology Readings**, v. 142, n. 1, p. 3–16, Jan. 1996.

GUTHRIE, J. W.; HUBER, D. M.; FENWICK, H. S. Serological detection of halo-blight. **Plant Disease Reports**, St. Paul, v. 49, 297-299, 1965.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; TURNER, Y. J. Invigoration of seeds? **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 3, n. 4, p. 881-888, Mar. 1975.

HUNTER, R. E.; BRINKERHOFF, L. A.; BIRD, L. S. The development of a set of upland cotton lines for differentiating races of *Xanthomonas malvacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 58, n. 6, p. 830-832, June 1968.

HUNTER, R. E.; BRINKERHOFF, L. A. Longevity of *Xanthomonas malvacearum* on and in cotton seed. **Phytopathology**, St. Paul, v. 54, n. 5, p. 617, May 1964.

ITO, S.; USHIJIMA, Y.; FUJII, T.; TANAKA, S.; KAMEYA-IWAKA, M.; YOSHIWANA, S. KISHI, F. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using semiselective medium and a PCR technique. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 146, n. 8-9, p. 379–84, Sept. 1998.

KOBAYASTI, L. **Inoculação, transmissão e detecção por Bio-PCR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão.** 2002. 127 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LAHMAN, L. K.; SCHAAD, N. W. Evaluation of the “Dome Test” as a reliable assay for seedborne bacterial blight pathogens of beans. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, n. 8, p. 680-683, Aug. 1985.

LAZO, G. R.; E GABRIEL, D. W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n. 3, p. 448–453, Mar. 1987.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; BRUJIN, F. J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**, Saint Paul v. 85, n. 5, p. 528-536, May 1995.

LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; BRUJIN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, July 1994.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJIN, F. J. de. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de sementes**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 62-67, 2004.

MACHADO, J. C. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7., 2002, Sete Lagoas. **Resumos e Palestras...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 198p.

MAES, M. Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 161-166, Oct. 1993.

MARQUES, A.S.A.; PARENTE, P. M. G.; MACHADO, F. O. C.; MELO FILHO, G. A.; RICHETTI, A. **Cadeia produtiva do algodão de Mato Grosso do Sul: eficiência econômica e competitiva**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Campo Grande: Seprotur, 2003. 72 p. (Documentos, 54).

MOFFETT, M. L., WOOD, B. A. Resident population of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* on cotton leaves: a source of inoculum for bacterial blight. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 607-612, 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**, St. Paul, v. 77, n. 10, p. 1390-1395, Oct. 1987.

MOSQUEDA-CANO, G.; HERRERA-ESTRELLA, L. A simple and efficient PCR method for the specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seeds. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, p. 463-467, July 1997.

NORMAN, D. J.; CHASE, A. R.; HODGE, N. C.; E STALL, R. E. Differentiation of three species of *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas maltophilia* using cellular fatty acid analyses **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 8, p. 687-693, Nov. 1997.

OPGENORTH, D.C.; SMART, C. D.; LOUWS, F. J.; BRUIJIN, F. J. de.; KIRKPATRICK, B. C. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genimic fingerprintings. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 8, p. 868-873, Aug. 1996.

PENNA, J. C. V. Cultivares diferentes, lucro maior. **Cultivar**, Pelotas, v. 2, n.17, p.32-36, jun., 2000.

PETERS, B. J.; ASH, G. J.; COTHER, E. J.; HAILSTONES, D. L.; NOBLE, D. H.; URWIN, N. A. R. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Austrália: pathogenic, phenotypic and genetic diversity. **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 73-79, Feb. 2004.

PINTO, A. C. S. ; POZZA, E.A.; TALAMINI, V.; MACHADO, J. C.; SALES, N. L. P.; GARCIA JUNIOR, D., SANTOS, D.M. Análise do padrão espacial e do gradiente da antracnose do feijoeiro em duas épocas de cultivo. **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 4, p. 392-398, out./dez. 2001.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289 p.

POSWAL, M. A. T.; ERINLE, I. D. A survey of extent of infection and contamination of cotton-seed market and commercial gin samples by *Xanthomonas malvacearum* (E.F.Smith) Dowson in the Northern States of Nigeria. **Crop Protection**, Madison, v. 2, n. 4, p. 473-481, 1983.

PROSEN, D.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N. W.; PANOPOULOS, N. J. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 9, p. 965–970, Sept. 1993.

RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; DE BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA–DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, St. Paul, v. 50, n. 9, p. 665–677, Sept. 2000.

SAETTLER, A. W. The need for detection assays. In: SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. (EDS.). **Detection of Bacteria in Seed**. American Phytopathological Society, Saint Paul MN, USA, (pp 1–2). 1989.

SAHIN, F.; KOTAN, R.; ABBASI, P. A.; MILLER, S. A. Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* strains. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 165–172. 2003.

SANTANA, C. R. Avaliação de métodos de inoculação na produção
SCHAAD, N. W. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. Bacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 6, p. 872-875, June 1988.

SCHAAD, N. W.; CHEONG, S. S.; TAMAKI, E.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N. J. A. Combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 2, p. 243-48, Feb. 1995.

SCHAAD, N.W.; FREDERICK, R. D.; SHAW, J.; SCHNEIDER, W. L.; HICKSON, R.; PETRILLO, M. D.; LUSTER, D. G. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul, v. 41, n. 2, p. 305–324, Feb. 2003.

SCHAAD, N. W.; BERTHIER-SCHAAD, Y.; SECHLER, A.; KNORR, D. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated real-time fluorescence detection system. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, Palo Alto, v. 41, n. 12, p. 1095–1100, 1999.

SCHAAD, N. W.; GAUSH, P.; POSTNIKOVA, E.; FREDERICK, R. On-site one hour PCR diagnosis of bacterial diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, p. S79–89, 2001. Abstrat.

SCHNATHORST, W. C. Longevity of *Xanthomonas malvacearum* in dried cotton plants and its significance in dissemination of the pathogen on seed. **Phytopathology**, St. Paul, v. 54, n. 8, p. 1009-1011, Aug. 1964.

SHARMA, V.; CARLSON, S. A. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* 0157:7 with fluorogenic PCR and single-enrichment-broth culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5472–76, Dec. 2000.

SMITH, N. C.; HENNESSY, J.; E STEAD, D. E. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1R primer for rapid identification of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 7, p. 739–748, Sept. 2001.

SUASSUNA, N. D.; CHITARRA, L.G.; ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M. **Manejo de doenças do algodoeiro**. Campina Grande: EMBRAPA /CNPQ, 2006. 24 p. (EMBRAPA/CNPQ. Circular Técnica, 97).

TALAMINI, V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, F. A. Epidemiologia de doenças associadas a *Colletotrichum* ssp transmitidas por sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 10, n. 3/4, p. 219-248, 2002.

VALARINI, P. J.; MENTEN, J. O. M. Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e seu efeito sobre a qualidade sanitária e a germinação. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 17, n. 3/4, p. 227-231, jul./dez. 1991.

VASQUEZ, G. H. **Condicionamento fisiológico de sementes de soja: efeitos sobre a germinação, vigor e potencial de armazenamento**. 1995. 138 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 472-489, July 1995.

VERDIER, V.; OJEDA, S.; E MOSQUERA, G. Methods for detecting the cassava bacterial blight pathogen: A practical approach for managing the disease **Euphytica**, Wageningen, v. 120, n. 1, p. 103–107, 2001.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research.**, Oxford, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, Dec. 1991.

VIJAYANAND, G. K.; SHYLAJA, M. D.; KRISHNAPPA, M.; SHETTY, H. S. An approach to obtain specific polyclonal antisera to *Xanthomonas campestris* pv. *cyamopsidis* and its potential application in indexing of infected seeds of guar. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, n. 5, p. 711–717, Nov. 1999.

WANG, Z. K.; COMSTOCK, J. C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N. W. Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA, and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 245–52, Apr. 1999.

WATKINS, G. M. **Compendium of cotton diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1981. 87 p.

WELLER, S. A.; ELPHINSTONE, J. G.; SMITH, N.; STEAD, D. E. Detection of *Ralstonia solanacearum* from potato tissue by post enriched TaqMan™ PCR. **OEPP/EPPPO Bulletin**, Amsterdam, v. 30, p. 381–83, 2000.

WELLER, S. A.; ELPHINSTONE, J. G.; SMITH, N. C.; BOONHAM, N.; STEAD, D.E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 7, p. 2853–58, July 2000.

WELLER, S. A.; STEAD, D. E. Detection of root mat associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. **Journal Applied Microbiology**, v. 92, p.118–12. 2002.

WRATHER, J. A. Colonization of cotton buds by *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **Plant Disease**, Oxford, v. 70, n. 6, p. 551-552, June 1986.

CAPÍTULO 2

USO DA CONDICIONAMENTO OSMÓTICO NA INOCULAÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* EM SEMENTES DE ALGODÃO

RESUMO

BARBOSA, J. F. **Uso do condicionamento osmótico na inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão.** 2007. p. 27 - 66. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.*

A viabilidade do condicionamento osmótico na inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) em sementes de algodão, foi verificada utilizando-se o meio de cultura 523 de Kado & Heskett (1970) como básico para a obtenção dos tratamentos. A este meio básico foram acrescidos os solutos manitol e sacarose à temperatura de 28 °C, gerando os potenciais hídricos de 0; -0,65; -0,85 e -1,0 MPa. Como testemunha foi utilizado o meio básico 523 (-0,54 MPa) sem a adição dos solutos. O efeito do condicionamento osmótico foi avaliado na qualidade fisiológica das sementes e no crescimento de Xam. Definido o melhor potencial hídrico, foi avaliada a melhor idade da cultura de Xam (0, 24, 36 e 48 horas) em meio de cultura acrescido do soluto manitol (-1,0 MPa) para se inocular as sementes. A inoculação artificial foi realizada partindo-se basicamente de quatro períodos de exposição (24, 48, 72, 96 h) das sementes à colônia bacteriana. A avaliação consistiu no número de sementes contaminadas com Xam, por meio da semeadura direta de sementes desinfestadas em meio de cultura semi-seletivo; na quantidade de UFC/semente; no teste de germinação em rolo de papel e na avaliação da emergência de plântulas em substrato. As variáveis analisadas foram: porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência (IVE), peso de massa úmida e seca de plântulas, estande final, incidência da mancha angular nos cotilédones após 21 dias e observação em microroscópio eletrônico de varredura (MEV). Foram comparados três métodos de inoculação de Xam nas sementes de algodão: a) contato direto da semente com a colônia bacteriana em substrato osmoticamente modificado; b) imersão das sementes em suspensão bacteriana enriquecida com leite desnatado; c) imersão das sementes em suspensão bacteriana em água destilada esterilizada. Não houve diferença estatística entre os solutos manitol e sacarose quanto à porcentagem de germinação de sementes, sendo que nos potenciais osmóticos de -0,85 e -1,0 MPa foi observada melhor inibição de germinação das sementes sobre o meio 523.. Todos os cinco isolados de Xam apresentaram crescimento semelhante à testemunha em todos os

* Comitê orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Co-orientadora), José da Cruz Machado – UFLA (Co-orientador).

potenciais osmóticos estudados. A inoculação pelo condicionamento osmótico foi eficiente e o tempo de 24 horas de exposição à bactéria permitiu obter sementes com 84,5% de incidência. A partir de 48 horas de exposição, as sementes apresentaram contaminação com fungos e bactérias saprófitas. Na germinação das sementes em rolo de papel a maior porcentagem ocorreu nos tratamentos com condicionamento osmótico sem a bactéria em relação à observada em sementes que permaneceram em contato com bactéria. Menores valores de índice de velocidade de emergência, altura, peso de massa úmida e seca das plântulas foram observados em sementes expostas por 96 horas em meio com restrição hídrica. Não houve diferença significativa para a porcentagem de sintomas da mancha angular nos cotilédones e folhas primárias de plântulas de algodão provenientes de sementes desinfestadas superficialmente. Por meio de eletromicrografias realizadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi observada a presença de Xam associada à tegumento das sementes em todos os tempos de inoculação. No tratamento com 96 horas de exposição foi possível verificar a presença de hifas fúngicas nas sementes. A incidência da bactéria nas sementes, detectada pelo plaqueamento direto em meio semi-seletivo, foi maior no método de inoculação com condicionamento osmótico com 88% de sementes infectadas e a menor incidência foi observada no método de inoculação por imersão das sementes em suspensão bacteriana, com apenas 1% incidência. No entanto, não houve diferença significativa entre os métodos de inoculação utilizados neste estudo para a porcentagem de cotilédones com sintomas da mancha angular. As porcentagens de emergência de sementes oriundas dos tratamentos inoculados foram semelhantes entre si e diferentes estatisticamente da testemunha não inoculada.

ABSTRACT

BARBOSA, J. F. **Use of water restriction in the inoculation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in cotton seeds.** 2007. p. 27 - 66. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant Pathology) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The viability of the osmotic seed conditioning technique in the inoculation of cotton seeds by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), was verified using the 523 culture medium of Kado & Heskett (1970) as basal medium for the treatments established. The solutes mannitol and sucrose were added to the basal medium at 28°C, producing the water potentials of 0; -0.65; -0.85 and -1.0 MPa. The 523 basal medium (-0.54 MPa) was used without addition of the solutes as the control treatment. The effect of the osmotic conditioning was assessed in the physiological quality of the seeds and in the growth of Xam. After the definition of the most appropriate water potential, the age of the Xam colony (0, 24, 36 and 48 hours) in culture medium supplemented with mannitol (-1,0 MPa) was determined in order to inoculate the seeds. The artificial inoculation was carried out starting from four exposition times (24, 48, 72, 96 h) of the seeds to the bacterium colony. Evaluation was done by taking the number of Xam contaminated seeds through the direct seeding of the disinfested seeds in the semi-selective culture medium; the quantity of CFU/Seed; the germination in roll paper test and the emergency of the seedlings in substrate. The analyzed variables were: emergency percentage, emergency speed index (ESI), fresh and dry mass weight of seedlings, final stand, bacterial blight incidence on the cotyledons after 21 days and observations in scanning electron microscope (SEM). Three inoculation methods for Xam were compared in cotton seeds: a) direct contact of the seed with the bacterium colony in osmotically modified substrate; b) immersion of the seeds in bacterium suspension enriched with skim milk; c) immersion of the seeds in bacterium suspension in sterile distilled water. No statistical difference was observed between mannitol and sucrose solutes as to the percentage of seed germination, however, the 523 medium osmotically modified to -0.85 and to -1.0 MPa were the treatments where there was a higher inhibition of the seed germination. All five Xam strains showed similar growth to that of the control in all osmotic potentials used. The colonies showed abundant growth and typical yellow color

* Advising committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Adviser), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Co-adviser), José da Cruz Machado – UFLA (Co-adviser).

in all sectors of the analyzed plates. The inoculation by osmotic conditioning technique was efficient and the 24 h exposition of seeds to the bacterium allowed the recovering of seeds with 84.5% of incidence. After 48 hours of exposition, the seeds showed contamination with saprophytic fungi and bacteria. In the germination of the seeds in roll paper test the higher percentage occurred in the treatments with osmotic conditioning without bacterium in comparison with the seeds that were kept in contact with the bacterium. The treatment with 96 hours showed the lower emergency speed index, size, fresh and dry weight of seedlings. No statistical difference was observed for the percentage of bacterial blight symptoms on the cotyledons and primary leaves of cotton seedlings originated from superficially disinfested seeds. Electromicrographs taken in SEM revealed the presence of Xam associated with the seeds peel in all inoculation periods. In the treatment with 96 hours of exposition it was possible to verify the presence of fungal hyphae on the seeds. The incidence of the bacterium in the seeds, detected by the direct plating on semi-selective medium, was higher in the method of inoculation with osmotic technique, with 88% of the seed infected, and a lower incidence was observed in the inoculation method where the seeds were immersed in bacterial suspension, with 1% incidence only. However, no statistical difference was observed between the inoculation methods used in this study based on the percentage of cotyledons with bacterial blight symptoms. The percentages of emergency of seeds originated from the inoculated treatments were similar between all methods but were statistically different from the non inoculated control.

1 INTRODUÇÃO

O uso de sementes de algodão de alta qualidade é essencial para o controle das principais doenças da cultura. Como a semente é o principal veículo de introdução do inóculo no campo, o sucesso para o bom desenvolvimento das plantas depende do manejo adequado e da qualidade das sementes utilizadas.

Dentre os patógenos de importância econômica para a cultura do algodão, a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), se destaca, causando sérios prejuízos, principalmente porque as condições favoráveis para o desenvolvimento do algodão são as mesmas requeridas pela bactéria. A bactéria sobrevive em restos culturais e no interior das sementes, e , depois do inóculo no campo, é de difícil controle.

Para se verificar os danos causados por bactérias em sementes de algumas culturas, tem-se procurado desenvolver métodos mais eficazes de inoculação. Esses métodos são importantes na patologia de sementes, para várias finalidades, como em estudos de tratamento de sementes, estudos epidemiológicos, desenvolvimento de métodos de detecção, etc. (Machado, 2000; Carvalho, 1999).

Os métodos de inoculação de bactérias fitopatogênicas em sementes revelam baixa eficiência em se obter índices desejáveis de infecção, em manter a qualidade fisiológica das mesmas após a inoculação e, em sua maioria, consistem de imersão em suspensão bacteriana, o que muitas vezes proporciona apenas a contaminação das sementes.

O uso do condicionamento osmótico foi eficaz para inocular *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (Carvalho, 1999), *Diplodia maydis*, *Fusarium verticillioide* e *Cephalosporium acremonium* em sementes de milho (Machado et al., 2001).

O pré-condicionamento de sementes de algodão utilizando manitol como restritor hídrico, foi eficaz na obtenção de sementes infectadas por importantes fungos como: *Botryodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gossypii*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Machado et al., 2004). Neste trabalho, os autores verificaram que o aumento do potencial hídrico até o nível de $-1,0$ MPa proporcionou maiores índices de infecção das sementes de algodão pelos fungos testados sem inviabilizar as sementes para usos posteriores.

O meio 523 (Kado & Heskett, 1970) suplementado com manitol a $-1,05$ MPa foi eficiente na inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão (Kobayashi, 2002).

No presente trabalho foi verificada a viabilidade da técnica de condicionamento osmótico na inoculação da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, em sementes de algodão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia e em casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

2.1 Origem e caracterização das sementes utilizadas

Foram utilizadas sementes da cultivar Makina, safra 2004/2005, suscetível à Xam, fornecidas pela empresa Syngenta Seeds Ltda (Matão/SP). As sementes foram armazenadas em câmara fria até o início dos experimentos. A germinação inicial das sementes foi verificada no sistema de rolo de papel e a sanidade em blotter test, para a presença de fungos (Brasil, 1992), e plaqueamento em meio de cultura semi-seletivo (Mehta, Bomfeti & Bolognini, 2005) para Xam.

2.2 Obtenção do isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum*: foi isolada de folhas de algodão herborizadas, utilizando-se placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 20 mL do meio 523 (Kado & Heskett, 1970) pelo método de estrias paralelas e levadas para incubação por 48 h a 28°C.

2.3 Preparo do meio de cultura básico

O meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) foi utilizado como básico para a obtenção dos tratamentos pelo condicionamento osmótico. Ao meio básico foram acrescidos os solutos manitol e sacarose à temperatura de 28 °C, gerando os potenciais hídricos de -0,54; -0,65; -0,85 e -1,0 MPa (Mega

Pascal). Para calcular as quantidades de manitol e sacarose (Tabela 1) utilizadas na concentração final do meio 523, nos diferentes níveis de potencial osmótico testados, utilizou-se o software SPPM[®] (Michel & Radchffe, 1995). Como testemunha foi utilizado o meio básico 523 (-0,54 MPa) sem a adição dos solutos.

2.4 Efeito do condicionamento osmótico na qualidade fisiológica de sementes de algodão

Os tratamentos consistiram em expor, por diferentes períodos de tempo, sementes de algodoeiro desinfestadas em 8 substratos, constituídos por 4 níveis de condicionamento osmótico do meio 523 (-0,54; -0,65; -0,85; e -1,0, MPa), acrescidos de sacarose ou manitol. A assepsia superficial das sementes consistiu na imersão das mesmas em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante 3 minutos e posterior imersão, por 3 vezes, em água destilada e esterilizada. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 20 mL de substrato e 25 sementes equidistantes entre si, sendo utilizadas 3 placas por repetição. As placas foram incubadas em câmara de crescimento (BOD) a 28 °C.

TABELA 1 Concentrações em gramas de sacarose e manitol, utilizadas para a obtenção dos níveis de restrições hídricas do meio de cultura básico.

Solutos	Potencial osmótico do meio de cultura (MPa)			
	0	-0,65	-0,85	-1,0
Sacarose	10 g*	82,6 g	105,8 g	122,8 g
Manitol	0 g	45,9 g	59,4 g	69,4 g

* Quantidade em gramas de sacarose presente em 1L do meio 523

As avaliações consistiram no número total de sementes germinadas em cada placa após 36, 72 e 108 horas de pré-condicionamento, considerando-se como germinadas as sementes com sinais visíveis de emissão da radícula (comprimento $\geq 0,1$ cm). Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições e a análise em esquema fatorial 3x4x2 (3 tempos de incubação x 4 potenciais osmóticos x 2 solutos). As análises estatísticas dos experimentos foram realizadas utilizando-se o sistema estatístico SAS (Statistical Analysis System) e SISVAR (Ferreira, 2000). As variáveis significativas no teste de F da análise de variância foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Para avaliar o efeito do condicionamento osmótico na qualidade fisiológica, as sementes de cada tratamento foram secadas ao ar por 24 horas, sendo em seguida submetidas ao teste de germinação.

O teste de germinação foi realizado no sistema de rolo de papel germiteste umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, em incubadora a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. As avaliações consistiram no percentual de sementes germinadas após sete dias de acordo com as Regras para análise de sementes (Brasil, 1992).

2.5 Cultivo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em meio 523 com diferentes níveis de condicionamento osmótico

Foram utilizados quatro níveis de condicionamento osmótico do meio 523 (-0,54, -0,65; -0,85; e -1,0 MPa), pelo uso dos solutos manitol e sacarose. Foram utilizadas quatro placas de Petri, de 9 cm de diâmetro por tratamento, contendo cada uma 20 mL de substrato. As placas foram subdivididas em seis setores equidistantes e semeados 2 μ l de suspensão bacteriana (24 horas de

crescimento em meio líquido) de cinco isolados de Xam. Em seguida, as placas foram distribuídas ao acaso em incubadora do tipo BOD a 28 °C, por 48 horas.

Na avaliação verificou-se a presença ou não do crescimento bacteriano de cada isolado em cada placa setorizada. O meio 523 sem a adição dos solutos foi utilizado como testemunha, observando-se a coloração e o formato das colônias.

2.6 Definição da idade da Cultura de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Definido o potencial hídrico mais adequado, foi avaliada a idade da cultura de Xam para se inocular as sementes. Foram avaliados quatro períodos de incubação das colônias (0, 24, 36 e 48 horas). Foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 20 mL de meio de cultura acrescido do soluto, manitol (-1,0 MPa). Em todos os tratamentos, foram espalhados 100 µL de suspensão bacteriana (24 horas de crescimento em meio líquido) sobre o meio de cultura, sendo as placas incubadas a 28 °C. Após a incubação, procedeu-se à inoculação em condições assépticas, colocando-se 50 sementes/placa, seguido de agitação manual por 30 segundos. Cada tratamento foi constituído por 2 placas. As avaliações foram realizadas após 48 horas, onde sementes individuais, sem desinfestação, foram colocadas em microtubos de 1,5 mL, contendo 1 mL de água destilada esterilizada e incubados por 18 horas em geladeira. Posteriormente, procedeu-se a diluição em série em tubos de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) de 10^{-1} a 10^{-3} . Em seguida, 100µL da diluição 10^{-3} foram espalhados com uma alça de Drigalsky em meio semi-seletivo (Mehta, Bomfeti & Bolognini, 2005). Para cada semente, foram utilizadas quatro placas por tratamento. Como testemunha utilizou-se a diluição

10^{-5} da suspensão do isolado puro de Xam. Após a incubação a 28°C por 72 horas, a avaliação foi feita pela contagem do número de UFC/placa.

2.7 Inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão

Com base nos resultados dos itens anteriores foram utilizados o tratamento de pré-condicionamento de sementes de algodão mais adequado, assim como o crescimento bacteriano e idade da cultura de acordo com o condicionamento osmótico para que se pudesse efetuar a inoculação artificial das sementes.

O delineamento experimental foi definido partindo-se basicamente de quatro períodos de exposição (24, 48, 72, 96 h) das sementes à colônia bacteriana. A avaliação consistiu no número de sementes contaminadas com Xam, por meio da semeadura direta das sementes desinfestadas em meio de cultura semi-seletivo (Mehta, Bomfeti & Bolognini, 2005); na quantidade de UFC/semente; no teste de germinação em rolo de papel (Brasil, 1992) e na avaliação da emergência de plântulas em substrato Plantimax[®], em dois experimentos independentes, sendo um com as sementes desinfestadas e o outro com as sementes sem a desinfestação superficial. As variáveis analisadas foram: porcentagem de emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência (IVE), peso seco e úmido de plântulas, estande final e incidência da mancha angular nos cotilédones após 21 dias. A porcentagem de emergência foi determinada pela porcentagem de plântulas emergidas aos quatro dias após a semeadura. O índice de velocidade de germinação foi obtido pelo somatório das razões do número de plântulas germinadas no período, pelo número de dias decorridos da semeadura até a germinação (Maguire, 1962). Após a emergência das plântulas os vasos foram envolvidos com saco plástico para formação de

câmara úmida, por quatro dias. Aos 21 dias após a semeadura verificou-se a presença de sintomas de encharcamento nos cotilédones (incidência), a altura das plantas (cm) e o peso. Para confirmação da etiologia bacteriana das lesões realizou-se o teste de exsudação em gota e o isolamento em meio de cultura 523. Após a pesagem, as plântulas foram colocadas em estufas com circulação de ar por três dias a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e em seguida realizou-se novamente a pesagem para determinação do peso da massa seca. O teste de germinação foi realizado, como descrito no item 4.2.

Para verificar a quantidade de UFC/semente, as sementes de cada tratamento foram desinfestadas superficialmente com NaOCl 2% por 2 minutos e lavadas com água destilada esterilizada por três vezes. A seguir as sementes foram secadas em câmara de fluxo laminar e colocadas individualmente em tubos eppendorfs (1,5 mL) contendo 1 mL de solução salina (0,85%). Foram utilizadas 20 sementes por tratamento. Os tubos foram mantidos em geladeira por 18 horas. Após este período, foi feita a diluição em série 10^{-1} a 10^{-3} . Alíquotas de 100 μL da diluição 10^{-3} foram espalhadas em placas de Petri contendo o meio semi-seletivo (Mehta, Bomfeti & Bolognini, 2005). A avaliação consistiu no número médio de colônias (UFC) em quatro placas. Para a análise da variável UFC foi realizada a análise exploratória dos dados, por meio do gráfico Boxplot.

2.8 Comparação de métodos de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão

Foram comparados três métodos de inoculação de Xam nas sementes de algodão: a) contato direto da semente com a colônia bacteriana em substrato osmoticamente modificado (RH); b) imersão das sementes em suspensão bacteriana enriquecida com leite desnatado (20% p/v) (Moffett & Wood, 1985)

(LE); c) imersão das sementes em suspensão bacteriana em água destilada esterilizada (Halfon-Meiri & Volani, 1977) (AG).

Para cada técnica estudada foram utilizadas 400 sementes de algodão. Após a inoculação, as sementes foram colocadas sobre papel de filtro e secadas em câmara de fluxo laminar por 18 horas. Em seguida as sementes permaneceram em sacos de papel, por uma semana, para posterior avaliação.

As avaliações consistiram na emergência de plântulas em substrato, semeio direto das sementes em meio de cultura semi-seletivo descrito por Mehta, Bomfeti & Bolognini (2005); plaqueamento da suspensão de sementes individuais em meio semi-seletivo Mehta, Bomfeti & Bolognini (2005) e germinação (%) (rolo de papel).

A emergência de plântulas foi realizada em substrato Plantimax®, sendo colocadas 25 sementes/vaso em 8 repetições. As plântulas permaneceram em câmara úmida por quatro dias. Foram avaliados: o índice de velocidade de emergência, o estande final de plântulas, peso úmido e seco de plântulas e a presença de plântulas com sintomas típicos da mancha angular.

Para verificar a presença de Xam nas sementes, foi realizado o semeio direto em meio de cultura semi-seletivo (Mehta, Bomfeti & Bolognini, 2005). Foram utilizadas 10 sementes por placa com 20 repetições.

Para verificar o número de UFC/semente foram utilizadas 50 sementes de cada tratamento. A técnica foi a mesma utilizada no item 2.7.

O teste de germinação foi feito no sistema de rolos de papel umedecidos com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco, em 4 repetições de 50 sementes, à temperatura de 25 °C. A avaliação expressa em porcentagem de germinação foi aos sete dias (Brasil, 1992). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância. Sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

2.9 Preparo das sementes inoculadas e observação em microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Cinco sementes submetidas aos diferentes períodos de inoculação (0, 24, 48, 72 e 96 horas) foram divididas em tegumento e eixo embrionário, imersas em solução fixativa, pH 7,2, armazenadas em geladeira e observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato (0,05 M) por três vezes durante 10 min. As secções obtidas foram transferidas para solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 2 h e subseqüentemente desidratadas em série de acetona (30, 50, 70, 90 e 100% por três vezes) e depois levadas para o aparelho de ponto crítico. Os espécimes obtidos foram montados com uma fita de carbono, sobre “stubs” revestidos por uma película de papel alumínio, cobertos com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40. Diversas imagens das amostras foram registradas digitalmente, em aumentos variáveis, e gravadas no Software Photopaint do pacote Corel Draw 9 (Alves, 2004).

3 RESULTADOS

3.1 Sanidade das sementes

No teste de sanidade inicial das sementes de algodão da cultivar Makina, constatou-se a presença dos seguintes gêneros de fungos: *Aspergillus* sp. (6,5%); *Fusarium* sp. (5%) e *Penicillium* sp. (1,25%). O índice de *C. gossypii* var. *cephalosporioides* foi abaixo de 1%. A germinação inicial das sementes em rolo de papel foi de 81,75%, não sendo verificada a presença de Xam no isolamento direto das sementes em meio de cultura semi-seletivo (Mehta, Bomfeti & Bolognini, 2005).

3.2 Pré-condicionamento de sementes de algodão em relação à condicionamento osmótico do substrato agarizado

Pela análise de variância, a interação potencial osmótico x soluto x tempo de incubação não foi significativo. A presença de sacarose ou manitol no meio 523 não diferiu estatisticamente quanto à porcentagem de germinação de sementes (Tabela 2) pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Não houve diferença significativa também entre os potenciais osmóticos estudados e a germinação de sementes em rolo de papel após 108 horas de incubação (dados não apresentados).

TABELA 2 Porcentagem de sementes germinadas em meio 523 suplementado com sacarose e manitol

Soluto	% sementes germinadas*
Sacarose	6,00 a
Manitol	7,00 a

*CV(%) = 24,34.

No entanto, os tratamentos mais eficientes quanto a inibição da germinação das sementes sobre o meio 523 alterado osmoticamente foram -0,85 e -1,0 MPa. A utilização do potencial osmótico -1,0 MPa foi utilizada por vários pesquisadores para a inoculação de fungos em sementes de algodão (Souza, 2006; Araújo et al., 2006a; Celano, 2004; Machado et al., 2004; Machado, 2002).

No potencial osmótico -0,65 MPa à medida que o tempo de exposição foi aumentada, de 36 horas a 108 horas, foi observado aumento também na porcentagem de germinação de sementes. A partir do potencial osmótico -0,85 MPa não houve diferença significativa entre os tempos de exposição (Tabela 3).

TABELA 3 Porcentagem de sementes germinadas em meio 523 com diferentes potenciais osmóticos e tempo de exposição.

		Potencial osmótico (MPa)*							
		Manitol				Sacarose			
Tempo (h)	0	-0,65	-0,85	-1,0	0	-0,65	-0,85	-1,0	
36	4,6 Ba	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	4,7 Ba	0,0 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	
72	29,7 Cb	4,0 Bb	0,0 Aa	0,0 Aa	29,7 Bb	0,7 Aa	0,0 Aa	0,0 Aa	
108	33,7 Cc	5,7 Bb	1,0Aa	0,0 Aa	33,7 Cc	6,0 Bb	0,0 Aa	0,0 Aa	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). CV (%) = 24,34.

Segundo Machado et al., 2004, o potencial hídrico até o nível de -1,0 MPa proporcionou mais elevados índices de infecção das sementes de algodão por fungos sem inviabiliza-las para usos posteriores. Para trabalhos em patologia de sementes, é essencial a disponibilidade de sementes contaminadas com patógenos alvos em quantidade e qualidade

adequadas para cada objetivo específico, como tratamento de sementes, estudos epidemiológicos, desenvolvimento de métodos de detecção, etc. (Machado, 2000; Carvalho, 1999).

3.3 Crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em meio 523 com diferentes níveis de restrição hídrica

Como não houve diferença estatística entre os solutos manitol e sacarose, optou-se inicialmente pela utilização da sacarose, por ser este açúcar mais acessível e menos oneroso que o manitol. No entanto, observou-se em experimentos em casa de vegetação, alta incidência de plântulas mortas (dados não apresentados). Como a sacarose é utilizada por muitos microrganismos, houve, provavelmente, um estímulo ao desenvolvimento de fungos internos às sementes e isso pode ter provocado a morte de plântulas. Portanto, optou-se pelo manitol, um açúcar mais seletivo, como soluto a ser utilizado nos experimento com condicionamento osmótico no presente trabalho.

Todos os cinco isolados de Xam apresentaram crescimento semelhante à testemunha em todos os potenciais osmóticos estudados. As colônias apresentaram crescimento abundante e coloração amarela, típica do gênero *Xanthomonas*, em todos os setores das placas analisadas. Observou-se, porém, que o diâmetro das colônias foi menor no meio 523 suplementado com manitol em todas as concentrações do soluto. Este fato também foi relatado por Kobayashi (2002), onde o aumento da concentração de manitol no meio 523 até -1,05 MPa não inibiu o crescimento, mas reduziu o diâmetro das colônias de quatro isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap). Halfeld-Vieira (2000) e Cia (1972) verificaram, respectivamente, que Xap e Xam não utilizam manitol como fonte de carbono.

O crescimento fúngico em meios de cultura com potenciais hídricos de – 0,4, -0,6, -0,8, -1,0 MPa, utilizando-se manitol, também não foi alterado (Machado et al., 2004).

3.4 Uso do condicionamento osmótico para inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão

De posse dos resultados anteriores, optou-se pelo manitol como soluto e -1,0 MPa como potencial osmótico para a inoculação de Xam em sementes de algodão.

Os resultados referentes à avaliação das sementes sem desinfestação superficial encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4 Características fisiológicas de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, por diferentes períodos exposição.

Tempo de inoculação	Emergência (%)	Plantas sobreviventes (%)*	IVE	Massa Úmida (g)	Massa seca (g)	Altura de plantas
24 horas	93 a	90,5 a	20,7 a	154,3 a	25,3 a	22,0 b
24 horas T ^a	93 a	93,0 a	21,2 a	160,8 a	41,8 a	23,3 a
48 horas	91,5 a	91,5 a	20,4 a	141,0 b	28,3 a	21,1 c
48 horas T	93,5 a	93,0 a	21,2 a	171,2 a	46,8 a	22,6 b
72 horas	86,0 a	86,0 a	19,6 a	160,3 a	32,3 a	23,0 a
72 horas T	90,5 a	89,0 a	20,5 a	173,5 a	35,5 a	23,4 a
96 horas	77 b	76,0 b	16,0 b	132,3 b	27,3 a	20,0 d
CV (%)	4,78	4,51	4,6	6,1	29,3	16,9

*Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$).

^a Tratamento com restrição hídrica, sementes não inoculadas.

No tratamento testemunha, as sementes permaneceram pelo mesmo período de tempo no meio com restrição, mas sem a bactéria. Porém, no tratamento com 96 horas, a testemunha não foi avaliada, devido à alta contaminação por fungos saprófitos. Araújo (2004) observou a ocorrência de *Colletotrichum gossypi* var. *cephalosporioides* e de fungos saprófitas em teste de sanidade após o condicionamento osmótico. Segundo Khan (1992), durante o tempo do condicionamento osmótico os fungos estão sob condições de umidade e temperatura favoráveis ao seu desenvolvimento.

A porcentagem de emergência de plântulas oriundas dos tratamentos com 24, 48 e 72 horas de tempo de exposição não diferiu estatisticamente das testemunhas não inoculadas. Verificou-se o menor valor de emergência no tempo de 96 horas. Para a variável IVE, o tempo de exposição de 96 horas também afetou o desenvolvimento das plântulas, provavelmente como consequência do maior potencial de inóculo determinado pelo maior tempo de exposição das sementes à bactéria. A pressão do inóculo pode ser observada pela menor porcentagem de plântulas sobreviventes no tempo de 96 horas (76%) (Tabela 4).

A emergência e o estande final de plântulas de algodão não diferiram significativamente quando as sementes foram inoculadas por condicionamento osmótico com diferentes níveis de *C. gloeosporioides* var. *cephalosporioides* (Araújo, 2004).

A germinação de sementes de feijão inoculadas com Xap foi afetada a partir de 36 h de contato com a bactéria (Valarini & Menten, 1991). Da mesma forma, a influência da inoculação de sementes de algodão, por restrição hídrica, com *C. gossypii*, *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* e *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* variou em função do período de exposição das sementes a estes fungos (Machado et al., 2004). Para infecção destas foi

necessário prolongar o tempo de exposição por mais de 48 horas o que provocou a morte de sementes devido, provavelmente, ao maior potencial de inóculo.

Quanto ao peso da massa úmida houve diferença significativa entre os tratamentos submetidos à inoculação e às testemunhas. Os tratamentos 48 horas e 96 horas foram os que apresentaram menores pesos de massa verde e menores alturas de plantas. Para o peso da massa seca, não houve diferença.

As sementes iniciaram a germinação aos 3-5 dias após a semeadura. Aos 15-21 dias já foram observados sintomas de encharcamento nos cotilédones. A presença de lesões típicas da mancha angular nos cotilédones comprovou a eficiência de todos os tempos de exposição na ocorrência de infecção. Foi realizado o teste de exsudação para comprovar a etiologia bacteriana dos sintomas e também o aspecto da colônia isolada em meio 523 . Não houve diferença significativa entre os tratamentos, quanto à incidência da mancha angular nos cotilédones e folhas primárias do algodoeiro. No entanto, maior incidência dos sintomas foi verificada no tratamento 24 horas de contato da bactéria com a semente.

Segundo Schaad (1989) bactérias em sementes normalmente apresentam baixas porcentagens de transmissão, sendo comuns porcentagens iguais ou inferiores a 0,1%. Moura & Romeiro (1993) verificaram variação de 1,0 a 2,5% na porcentagem de transmissão de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em sementes comerciais de pepino. Em sementes de melão, a transmissão de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* variou de 30 a 64%, sendo que 15 isolados apresentaram até 50% de transmissão (Silveira, Mariano & Michereff, 2003).

Brinkerhoff & Hunter (1963) relataram que 6 a 24% das sementes são infectadas por Xam a partir da maçã do algodoeiro, sendo a recuperação da bactéria maior no tegumento do que no eixo embrionário. Segundo estes autores, o processo de infecção da semente ocorre durante a maturação da maçã infectada. Porém muitas das sementes infectadas não germinam devido às

injúrias causadas pela bactéria assim como por fungos e bactérias oportunistas. Sementes maduras também podem ser infectadas no campo.

Os resultados referentes à avaliação das sementes inoculadas e tratadas com hipoclorito de sódio após o período de inoculação encontram-se na Tabela 5. Para a variável altura de plantas, houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

TABELA 5 Características fisiológicas de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvaceraum* por diferentes tempos de exposição, após desinfestação superficial

Tempo de inoculação	Emergência (%)	Plantas sobreviventes (%)*	IVE	Massa úmida (g)	Massa seca (g)	Altura de plantas (cm)
24 horas	63 a	65 a	7,80 b	138,25 a	25,25 a	22,22 b
24 horas T ^a	89 a	92,0 a	11,91 a	141,50 a	25,25 a	24,31 a
48 horas	86,5 a	89,0 a	13,66 a	144,25 a	23,25 a	19,73 c
48 horas T	85,5 a	87,5 a	12,82 a	149,00 a	25,0 a	24,52 a
72 horas	84 a	85,5 a	15,53 a	150,25 a	23,75 a	23,16 b
72 horas T	88 a	87,5 a	15,98 a	160,00 a	25,0 a	23,73 a
96 horas	55 a	63,5 a	8,94 b	104,50 b	20,50 b	19,62 c
CV (%)	21,23	20,78	21,80	10,96	4,99	23,31

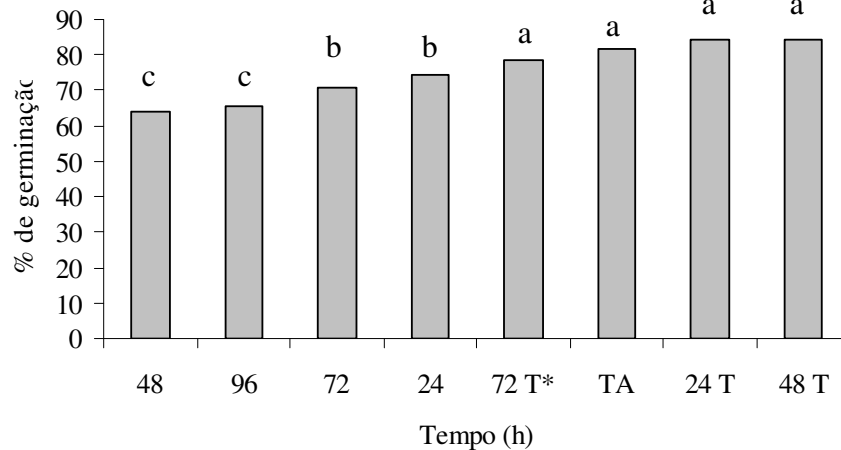
*Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$).

^a Tratamento com restrição hídrica, sementes não inoculadas.

As menores alturas foram observadas nos tratamentos com 48 e 96 horas de exposição. No tratamento com 96 horas foi observado o menor peso de massa úmida e seca das plântulas. Para o índice de velocidade de emergência os tratamentos que apresentaram os menores valores foram os de 24 e 96 horas, entretanto durante o experimento as plantas de um vaso do tratamento 24 horas

queimaram devido à insolação. Por isso, os baixos valores observados neste tratamento. A presença da bactéria não afetou a emergência das plântulas nem o número de plantas sobreviventes, uma vez que as médias não diferiram dos tratamentos testemunhas. Apesar dos menores valores apresentados no tratamento 96 horas, o tratamento não diferiu dos outros, contrário ao observado no experimento sem desinfestação superficial.

Houve diferença significativa entre os tratamentos quanto à porcentagem de germinação das sementes em rolo de papel (Figura 2). Maior porcentagem de germinação das sementes ocorreu nos tratamento com condicionamento osmótico sem a bactéria em relação às sementes que permaneceram em contato com bactéria (Figura 2), indicando que sementes de algodão contaminadas com Xam sofrem perda de sua capacidade germinativa.



* Tratamento com restrição hídrica, sem bactéria.

Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$).

CV(%)=5,67

FIGURA 2 Porcentagem (%) de germinação em rolo de papel de sementes de algodão inoculadas e não inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvaceraum*, após desinfestação com NaOCl 2%.

Este fato já foi descrito para sementes de outras culturas, como feijão e couve-flor (Valarini & Menten, 1991; Galli, Panizzi & Sader, 2001).

Houve diferença significativa quanto à porcentagem de germinação entre os tempos de inoculação, entretanto, não houve relação inversa entre tempo de inoculação e tendência decrescente na porcentagem de germinação. Galli, Panizzi & Sader (2001) verificaram que sementes de couve-flor perderam sua capacidade germinativa a partir de 20% de infecção, não diferindo estatisticamente dos tratamentos com 40 e 60% de sementes infectadas.

Verificou-se que as plântulas provenientes de sementes inoculadas apresentaram-se anormais em relação à testemunha (Figura 3), entretanto não foi verificada a presença da bactéria pelo teste de exsudação em gota.

A inoculação por condicionamento osmótico foi eficiente no tempo de exposição à bactéria por 24 horas (sementes tratadas com NaOCl, 2%), indicando que a semente não precisa de um tempo prolongado de contato com a bactéria para que ocorra a infecção. Observou-se maior incidência no tratamento submetido a 24 horas de exposição à bactéria, quando comparado com os tempos de 48 e 72 horas.

A partir de 48 horas de exposição, as sementes apresentaram contaminação com fungos e bactérias saprófitas e em contato com o meio semi-seletivo, ocorreu, então, o crescimento desses organismos oportunistas, o que dificultou a identificação de Xam.

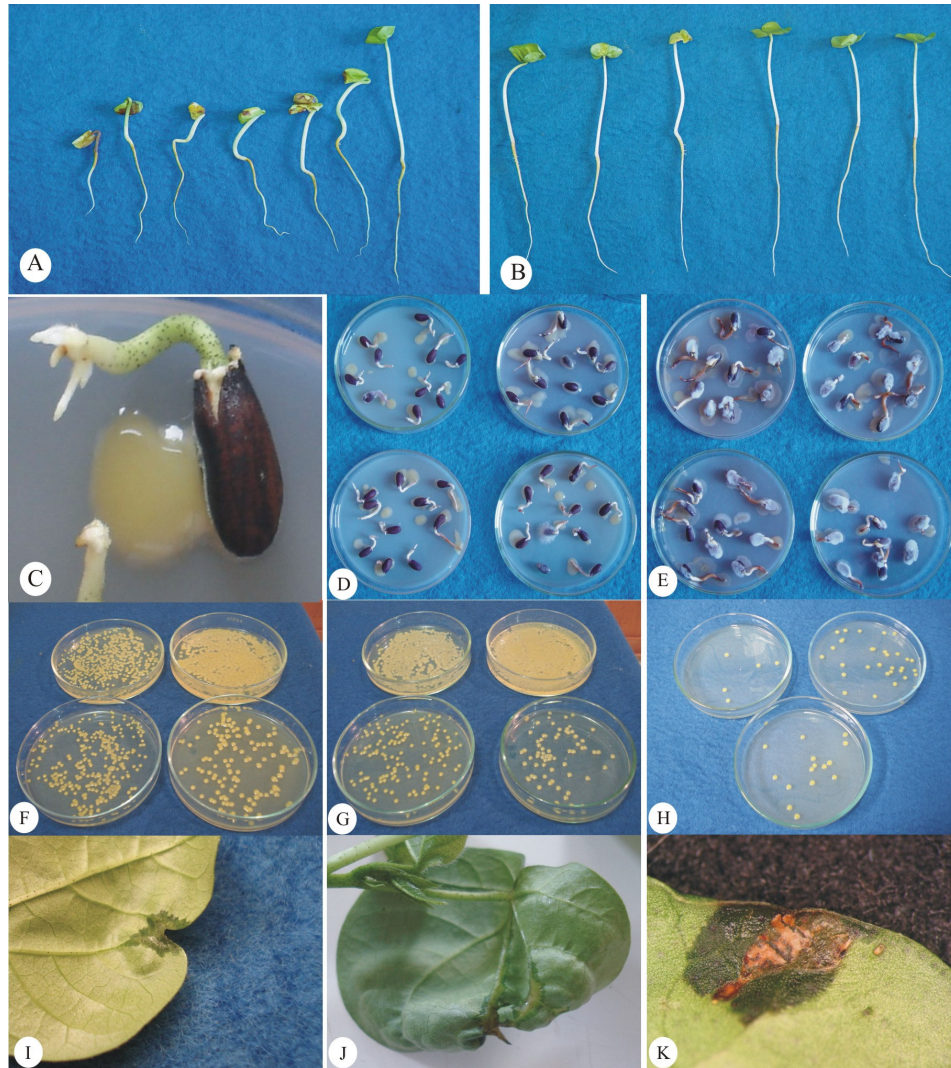


FIGURA 3 (A) Plântulas de algodão provenientes de sementes inoculadas por 24 horas de exposição à *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvaceraum* (Xam), após teste de germinação em rolo de papel; (B) Plântulas testemunhas provenientes de sementes não inoculadas; (C) Detalhe da colônia de Xam em semente em meio de cultura; (D) Isolamento direto de sementes inoculadas por 24 horas de exposição; (E) Isolamento direto de sementes inoculadas por 96 horas de exposição; (F-H) Plaqueamento de extrato de sementes dos tratamentos RH (restrição hídrica), LE (skim milk), AG (água), respectivamente; (I-J) Sintoma da mancha angular em folhas primárias; (K) Lesão encharcada em cotilédono de algodão.

No tempo de 24 horas é provável que a bactéria esteja mais associada às sementes externamente, pois quanto maior o tempo de exposição das sementes ao patógeno, maior será o nível de infecção. No entanto, talvez para a infecção bacteriana, esse não seja o caso, uma vez que as sementes foram desinfestadas superficialmente neste experimento.

O maior tempo de exposição das sementes às colônias fúngicas, dependendo da velocidade de crescimento destas colônias, normalmente proporciona maior infecção das mesmas (Souza, 2006; Costa et al., 2003; Tanaka, Menten & Marianno, 1989), uma vez que fungos de crescimento rápido não precisam de períodos prolongados de contato com a semente (Machado et al., 2004).

Na inoculação de sementes de feijão com Xap observou-se 100% de contaminação logo após o contato com o patógeno, porém a infecção de 100% destas só foi observada a partir de 36 horas de contato bactéria-semente (Valarini & Mentem, 1991). Ressalta-se que neste trabalho a condicionamento osmótico não foi utilizada. No entanto, Galli, Panizzi & Sader (2001), relataram que após a inoculação de sementes em meio de cultura sem restrição hídrica, decorridas 48 horas de contato, observou-se que algumas sementes germinaram, o que torna necessário a utilização das sementes logo após a sua retirada do meio de cultura, seja para a realização de testes de germinação, testes de sanidade ou para a semeadura no campo, descartando-se a possibilidade de armazenamento das sementes contaminadas para uso posterior.

O meio 523 suplementado com manitol a -1,05 MPa foi eficiente na inoculação de Xap em sementes de feijão. Neste experimento foi possível recuperar a bactéria tanto externa quanto internamente na semente, por meio do plaqueamento direto em meio de cultura. Porém, o maior tempo de exposição das sementes à bactéria não aumentou o índice de infecção, pois após 96 horas

de exposição a porcentagem de infecção foi de 77% e, após 36, horas 98% (Kobayasi, 2002).

Pelo modelo gráfico box plot verificou-se maior número de UFCs/semente recuperadas no tratamento com 72 horas de exposição e que o padrão de colonização interna das sementes foi variável em todos os tratamentos (Figura 5). Como em algumas placas não foi possível a contagem devido ao excesso de colônias, padronizou-se como 200 o número máximo de colônias observadas.

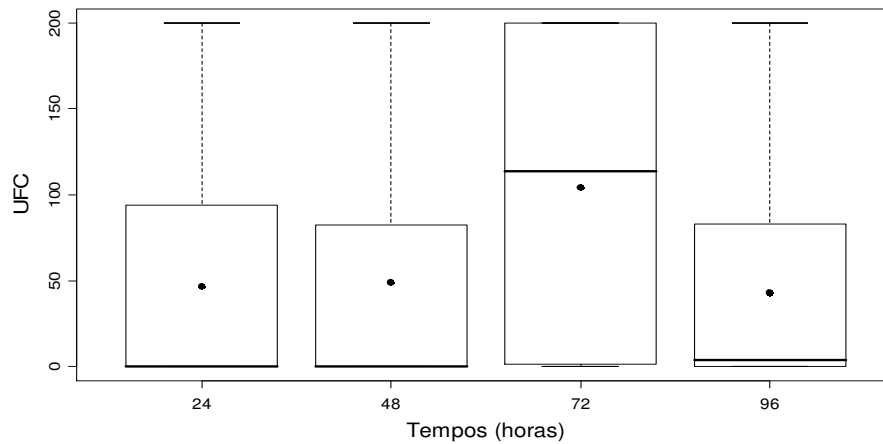


FIGURA 5 Box plot da variação no número de UFCs recuperadas de semente de algodão inoculadas artificialmente com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.

Em todos os tratamentos foram observadas placas sem nenhuma colônia de Xam, como pode ser observado pelo número de zeros presentes na análise descritiva (Tabela 6).

TABELA 6 Análise descritiva da variação no número de UFCs recuperadas de semente de algodão inoculadas artificialmente com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.

Estatística Descritiva	Tempos de exposição			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Média	46,85	49,10	104,30	42,85
Desvio padrão	73,78	80,76	92,88	63,99
Quantidade de zeros (%)	65,00	55,00	25,00	45,00

Como as sementes foram desinfestadas superficialmente é possível que o inóculo aderido à tegumento tenha sido eliminado e que o inóculo no interior da semente sendo menor, não recuperado devido à diluição e à repressividade do meio utilizado nesse estudo. Observou-se também que a média de UFCs/semente foi maior no tratamento com 72 horas de exposição, sendo que para os outros tratamentos, a média variou de 42,85 a 49,10.

Com base nestes resultados sugere-se que a bactéria associada internamente à semente de algodão, não afeta a qualidade fisiológica das mesmas. Desta forma, Xam permanece viável na semente e assim que condições favoráveis ao desenvolvimento da mancha angular ocorrerem inicia-se o desenvolvimento da doença. Segundo Hunter & Brinkerhoff (1964), Xam permanece viável na semente armazenada por dois anos. Tanaka & Machado (1985) ressaltaram que a quantidade de inóculo inicial, para patógenos associados às sementes, pode refletir em altos índices de doenças, dependendo de condições intrínsecas ao patógeno e ao hospedeiro, e causar grandes epidemias.

Segundo Galli, Panizzi & Sader (2001), a inoculação de *X. campestris* pv. *campestris* diminuiu a produção de sementes de couve-flor por planta, mas

não apresentou efeito deletério nas características físicas e fisiológicas das mesmas.

Bactérias fitopatogênicas estão associadas às sementes tanto externa como internamente. Além disso, a semente contaminada apresenta variação na severidade o que pode resultar em nenhum dano aparente ou destruir completamente a semente (Hunter & Brinkerhoff, 1964).

3.5 Comparação de métodos de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro

Diferentes métodos de inoculação artificial de bactérias já foram descritos, porém a maioria relacionada à imersão das sementes em suspensão bacteriana, os quais promovem a associação externa à semente (Valarini & Mentem, 1991). Sementes infectadas por bactérias e outros patógenos, são importantes veículos de transmissão de doenças e, por isso, essenciais para estudos epidemiológicos e sanidade de sementes (Machado, 1988).

A incidência de Xam nas sementes pelo plaqueamento direto em meio semi-seletivo foi maior no método de inoculação com condicionamento osmótico (88%) (Tabela 7).

TABELA 7 Incidência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* e média de UFC por sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*), em função do método de inoculação.

Método de inoculação	Incidência (%)*	UFC/semente**
RH ¹	88,0 a	189,90 a
LE ²	16,5 b	125,02 b
AG ³	1 c	1,10 c
CV (%)	32,74	29,37

*Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹ RH – sementes inoculadas por restrição hídrica

² LE – sementes inoculadas por imersão em suspensão bacteriana enriquecida com leite desnatado (20% p/v) (Moffett & Wood, 1985)

³ AG – sementes inoculadas por imersão em suspensão bacteriana em água destilada esterilizada (Halfon-Meiri & Volani, 1977).

A menor incidência foi observada no método de inoculação por imersão das sementes em suspensão bacteriana (1%). Como citado anteriormente, a

infecção de 100% de sementes de feijão foi observada a partir de 36 horas de contato bactéria-semente (Valarini & Mentem, 1991).

No entanto, não houve diferença significativa entre os métodos de inoculação utilizados neste estudo para a porcentagem de cotilédones com sintomas da mancha angular. Aos 21 dias após a semeadura, verificou-se a presença de cotilédones com lesões encharcadas típicas dos sintomas iniciais da mancha angular, causada por Xam (Tabela 7).

Em mudas de tomate originadas de sementes inoculadas com *X. vesicatoria*, observou-se aos 14 dias da semeadura 2,4% das mudas sintomáticas (Carmo et al., 2004). Aos 21 dias, por sua vez, foram constatados 8,6% de incidência da mancha bacteriana.

TABELA 8 Germinação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*) inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvaceraum*, plantas sobreviventes em função do método de inoculação das sementes.

Tratamento	Emergência (%)*	Plântulas sobreviventes (%)*	IVE
RH	83,5 a	89 a	17,3 a
LE	86 a	87 a	16,5 a
AG	83 a	90,5 a	16,5 a
Testemunha inoculada	não 86,5 a	92 a	17,9a
CV (%)	3,79	2,98	6,87

*Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Sabe-se que o nível de inóculo associado às sementes influencia a germinação e transmissão de patógenos. Estes, quando presentes nas sementes provocam a morte em pré e pós-emergência de plântulas, reduzindo, portanto, a

germinação (Tanaka, 1994). Os métodos de inoculação de bactérias em sementes descritos até o momento, não evidenciaram a manutenção da viabilidade das sementes após a sua inoculação. O uso da condicionamento osmótico neste trabalho vem justamente, aprimorar a metodologia de inoculação.

As plântulas emersas não sofreram com a pressão do inóculo, uma vez que não houve diferença no número de plântulas sobreviventes, em relação à testemunha com sementes não inoculadas (Tabela 8). Estes resultados são importantes e revelam que, em experimentos realizados com inoculação de sementes, qualquer método que seja empregado não implicará em redução significativa na emergência de plântulas e no índice de velocidade de germinação. Araújo et al. (2005) observaram que a maior incidência da mancha aquosa do melão, favorecida pela inoculação das sementes pelo método de infiltração a vácuo, não ocasionou tombamento na pré-emergência ou podridão de sementes. Dessa forma, plântulas sintomáticas emergidas de sementes contaminadas poderão servir, no campo, como fonte de inóculo, implicando em maior possibilidade de ocorrência de epidemias.

As plântulas emergidas à partir de sementes que não foram inoculadas (controle) permaneceram isentas do patógeno, diferenciando-se das inoculadas com a bactéria apenas com relação à incidência. Não houve diferença significativa entre altura e peso da massa fresca de plântulas provenientes de sementes submetidas aos três métodos de inoculação estudados (dados não apresentados).

O uso da infiltração a vácuo na inoculação de sementes de melão com *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* não afetou a porcentagem de emergência (99,2%), o índice de velocidade de germinação (10,8) e a duração do processo germinativo (4,5 dias) das plântulas (Araújo et al., 2005). Resultados semelhantes foram observados por Silveira, Mariano & Michereff (2003) para o mesmo patossistema. Esta mesma metodologia utilizada para inoculação de X.

vesicatoria em sementes de tomate, também não afetou a qualidade fisiológica das sementes (Carmo et al., 2004).

O uso da condicionamento osmótico foi evidenciado com elevada eficácia em vários estudos de inoculação de sementes com fungos. Machado et al. (2004) observaram que *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* inoculado em sementes de algodão, sob diferentes potenciais osmóticos (-0,4 a -1,0 MPa), provocou redução na germinação e conseqüente aumento no porcentual de sementes mortas. Neste caso houve maior período de exposição das sementes ao patógeno, com o potencial osmótico mais negativo, garantindo o processo de infecção das sementes.

No caso de inoculação de sementes com bactérias, o potencial osmótico -1,0 MPa foi eficiente para a manutenção da qualidade fisiológica das sementes e não interferiu no crescimento de Xam. No entanto, ao contrário dos testes com fungos, não é necessário um tempo prolongado de exposição da semente à bactéria.

3.6 Observação de sementes de algodão inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Por meio de eletromicrografias realizadas no MEV foi observada a presença de Xam associada à casca das sementes em todos os tempos de inoculação (Figura 7). No tratamento com 96 horas de exposição foi possível verificar a presença de hifas nas sementes. Este fato comprova que após o condicionamento osmótico fungos internos às sementes se desenvolvem, isto porque, durante o tempo em que as sementes ficam incubadas sobre o meio de cultura com restrição, o ambiente se torna favorável ao desenvolvimento das mesmas (Khan, 1992). Araújo (2004) observou a ocorrência de *C. gossypii* var.

cephalosporioides e de outros fungos saprófitas em teste de sanidade após o condicionamento osmótico. Provavelmente, os piores resultados observados neste tratamento não possam ser atribuídos devidos à pressão de inóculo da bactéria, mas sim ao desenvolvimento dos fungos latentes.

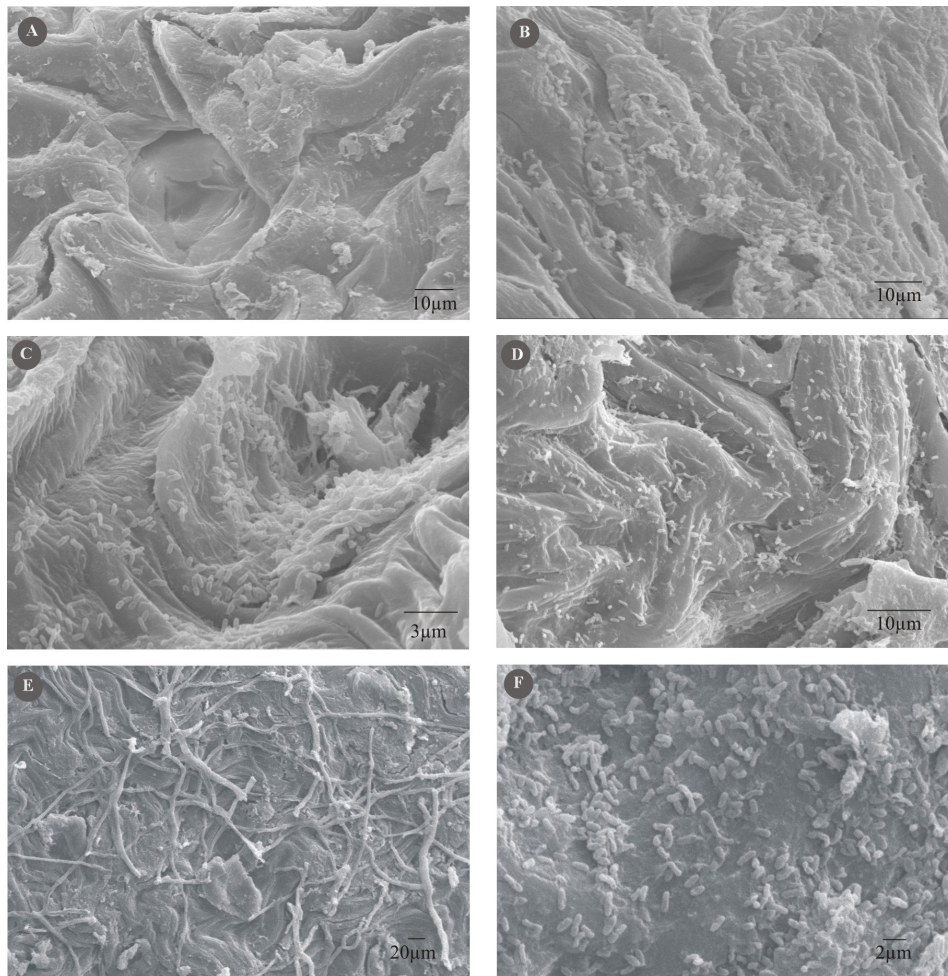


FIGURA 7 Eletromicrografias de varredura de sementes de algodão inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, por diferentes tempos de exposição à colônia bacteriana. (A) tecido sadio do tratamento testemunha, semente não inoculada; (B) tegumento de sementes com células bacterianas aderidas após 24 horas de exposição; (C) tegumento de sementes com células bacterianas aderidas após 48 horas de exposição; (D) tegumento de sementes com células bacterianas aderidas após 72 horas de exposição; (E) hifas colonizando o tegumento de semente de algodão e (F) células bacterianas aderidas ao tegumento de semente de algodão após 96 horas de exposição.

4 CONCLUSÕES

De acordo com as condições em que este trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

- A técnica de condicionamento osmótico com potencial hídrico de $-1,0$ MPa por meio do uso do manitol revelou-se eficaz para obter sementes infectadas com Xam.
- O prolongamento da incubação de sementes por períodos superiores a 96 horas em condição de condicionamento osmótico, promove o desenvolvimento fungos inicialmente presentes nas sementes.
- A inoculação pelo contato da semente com a colônia bacteriana em meio com restrição hídrica, por 24 horas, foi mais eficiente do que pela imersão em suspensão bacteriana.

5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: FAEPE, 2004. 43 p. Apostila.

ARAÚJO, D. V. **Níveis de inoculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes e sua influência na epidemia da ramulose do algodoeiro**. 2004. 87 p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CARVALHO, E. M.; CELANO, F. A. O. Relação entre níveis de inóculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes e o progresso da ramulose do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 147-151, mar./abr. 2006a.

ARAÚJO, D.V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J.C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CELANO, F. A. O.; CARVALHO, E. M.; CAMARGOS, V. N. Influência da temperatura e do tempo de inoculação das sementes de algodão na transmissibilidade de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 35-40, 2006b.

ARAÚJO, D. V.; MARIANO, R. de L. R.; MICHEREFF, S. J. Métodos de inoculação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em melão. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.31, n. 1, p. 69-73, jan./mar. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: LANARV/SNAD/MA, 1992.

BRINKERHOFF, L. A.; HUNTER, R. E. Internally infected seed as a source of inoculum for the primary cycle of bacterial blight of cotton. **Phytopathology**, St. Paul, v. 53, n. 12, p. 1397-1401, Dec. 1963.

CARMO, M. G. F.; CORREA, F. M.; CORDEIRO, E. S.; CARVALHO, A. O.; ROSSETTO, C. A.V. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.579-584, jul./set. 2004.

CARVALHO, J. C. B. de. **Uso da condicionamento osmótico na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).** 1999. 98 p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CELANO, F. A. O. **Desempenho de sementes de algodão durante o armazenamento, após inoculação com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* pela técnica de restrição hídrica.** 2004. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CIA, E. **Variabilidade de *Xanthomonas malvacearum* (E.F. Smith) Dowson, no Estado de São Paulo.** 1972. 57 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba.

COSTA, M. L. N.; MACHADO, J. C.; GUIMARAES, R. M.; POZZA, E. A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, set./out. 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000. **Resumos...** São Carlos, 2000. p. 235.

GALLI, J. A.; PANIZZI, R. C.; SADER, R. Efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nas qualidades físicas e fisiológicas de sementes de couve-flor. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 56-63, 2001.

HALFIELD VIEIRA, B. de A.; SOUZA, R. M. de. Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 94-102, dez. 2000. Edição Especial.

HALFON-MEIRI, A.; VOLCANI, Z. A combined method for detecting *Colletotrichum gossypii* and *Xanthomonas malvacearum* in cotton seed. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 5, n. 1, p. 129-139, 1977.

HUNTER, R. E., BRINKERHOFF, L. A. Longevity of *Xanthomonas malvacearum* on and in cotton seed. **Phytopathology**, St. Paul, v.54, n. 5, p. 617, May 1964.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.

KHAN, A. A. Preplant physiological seed conditioning. **Horticulture Review**, London, v.13, n. 25, p. 131-181, 1992.

KOBAYASTI, L. **Inoculação, transmissão e detecção por Bio-PCR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. 2002. 127 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MACHADO, A. Q. Uso da condicionamento osmótico em testes de sanidade de sementes de algodoeiro. 2002. 55 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Uso da condicionamento osmótico na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de sementes**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 62-67, 2004.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 1988. 107 p.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138 p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr., 1962.

MEHTA, Y. R., BOMFETI, C.; BOLOGNINI, V. A semi-selective agar 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, set./out. 2005.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 131-136, Jan./Feb. 1995.

MOFFETT, M. L.; WOOD, B. A. Resident population of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* on cotton leaves: a source of inoculum for bacterial blight. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 58, n. 6, p. 607-612, 1985.

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, n. 2, p. 183-186, 1993.

SCHAAD, N.W. Detection and identification of bacteria. In: SAETLLER, A.W.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. Minneapolis: APS Press, 1989. 122 p.

SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Variabilidade de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* provenientes de melão produzido no estado do Rio Grande do Norte. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 255-261, jul./set. 2003.

SOUZA, M.V. **Metodologias de inoculação e detecção de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. Disponível em: <<http://bibtede.ufla.br>>. Acesso em: 5 jun. 2007.

TANAKA, M. A. S. Patógenos causadores de tombamento do algodoeiro e seus efeitos sobre a germinação das sementes em diferentes temperaturas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 29-33, mar. 1994.

TANAKA, M. A. S.; MENTEN, J. O. M.; MARIANNO, M. I. A. Inoculação artificial de sementes de algodão com *Clletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e infecção das sementes em função do tempo de exposição ao patógeno. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 15, n. 3/4, p. 232-237, jul./dez. 1989.

TANAKA, M. A. S.; MACHADO, J. C. Patologia de sementes. **Informe Agropecuário**, v. 11, n. 122, p. 40-46, fev. 1985.

VALARINI, P. J.; MENTEN, J. O. M. Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e seu efeito sobre a qualidade sanitária e a germinação. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 17, n. 3/4, p. 227-231. jul./dez. 1991.

CAPÍTULO 3

DIVERSIDADE GENÉTICA E PATOGENICA DE ISOLADOS DE

Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum*

RESUMO

BARBOSA, Juliana Franco. **Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum***. 2007. p. 67 – 90. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. *

A alta variabilidade dentro de cada espécie de bactérias fitopatogênicas constitui importante fator no controle de bacterioses. No intuito de avaliar diferenças entre 20 isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) quanto a virulência, foram realizados testes de patogenicidade em plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*) e de hipersensibilidade (HR) em plantas de pimentão (*Capsicum annuum*), fumo (*Nicotiana tabacum*) e tomate (*Lycopersicon esculentum*). As inoculações foram realizadas por aspersão da suspensão bacteriana (10^8 UFC/mL), em plantas de algodão com o primeiro par de folhas verdadeiras e por infiltração nas folhas de pimentão, fumo e tomateiro, avaliando-se a resposta da planta para cada isolado, após 48 horas. Foram utilizados os primers 16S e 23S, ERIC e REP para a amplificação do DNA dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. Diferenças de virulência em algodoeiro foram observadas, sendo constatados quatro grupos distintos entre si. Para a reação de HR, plantas de tomateiro foram as mais indicadas para a utilização na identificação de isolados patogênicos de Xam. Os primers 16S e 23S permitiram obter fragmentos de aproximadamente 680 pb. A amplificação via PCR utilizando a unidade repetitiva REP, foi efetiva para todos os isolados de Xam, no entanto, o número de padrões de bandas em cada isolado de Xam foi significativamente menor quando comparado aos primers ERIC.

* Comitê orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Co-orientadora), José da Cruz Machado – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

BARBOSA, Juliana Franco. **Virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* strains**. 2007. p. 67 – 90. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant Pathology) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil.⁶

The high variability within each phytopathogenic bacteria species constitutes an important factor in the control of bacterial diseases. Pathogenicity tests were carried out in plants of *Gossypium hirsutum* and hypersensitivity (HR) in *Capsicum annuum*, *Nicotiana tabacum* and *Lycopersicon esculentum* plants aiming to assess the differences in virulence between *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) strains. The inoculations were performed by the spraying of bacterial suspension (10^8 CFU/mL) in cotton plants with the first pair of true leaves and by the infiltration of the bacterium suspension in to sweet pepper, tobacco and tomato leaves, with assessment of the plant response to each isolate, after 48 hours incubation. The primers 16S and 23S, ERIC and REP were used to amplify de DNA of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* strains. Differences in virulence to cotton plants were observed with recognition of four distinct groups of strains. For the HR reaction, the tomato plants were the most efficient host for the identification of pathogenic Xam strains. The primers 16S and 23S amplified fragments of approximately 680 bp. The amplification via PCR using the REP, repetitive unit, was effective for all Xam strains, however, the number of band patterns in each Xam strain was significantly lower when compared with those of the ERIC oligonucleotides.

⁶ Advising committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Adviser), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Co-adviser), José da Cruz Machado – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

A mancha angular do algodoeiro é uma das principais doenças da cultura, principalmente, porque as condições favoráveis à doença são as mesmas requeridas para o melhor desenvolvimento da cultura. A forma mais eficiente de controle da doença é a utilização de cultivares resistentes, entretanto, o produtor aposta no plantio de variedades suscetíveis devido ao rendimento e produtividade dessas variedades.

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith) (Vauterin, et al., 1995) (Xam), agente etiológico dessa enfermidade, apresenta 20 raças já descritas (Akello & Hillocks, 2002). No Brasil foram descritas três raças no estado de São Paulo (Cia, 1972). Todas as observações foram descritas baseadas na reação de vários isolados em diferentes hospedeiros. Ainda hoje, diferentes sintomatologias são observadas no campo. O conhecimento dessa variabilidade pode favorecer estudos de detecção, melhoramento e recomendação de variedades para cada região.

Nos últimos 20 anos tornou-se crescente o uso de métodos para a identificação de espécies de *Xanthomonas* bem como patovares de *X. campestris*. Vários artigos foram publicados avaliando-se a eficiência de anticorpos (Chittaranjan & De Boer, 1997; Vijayanand et al., 1999), análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (Lazo & Gabriel, 1987; Peters et al., 2004), análise de ácido graxos (Norman et al., 1997), DNA fingerprinting (Smith et al., 2001) e seqüências 16S rRNA (Deparasis & Roth, 1990), para caracterização de patovares de *X. campestris* ou grupos de isolados de vários patovares.

A caracterização do gene 16S rRNA está bem estabelecida como padrão para identificação de espécies, gêneros e famílias de bactérias (Gurtler & Stanisich, 1996). O fato de muitas bactérias terem cópias múltiplas (alelos) por

genoma do rRNA operon favorece a possibilidade de variações neste espaço entre isolados.

Sahin et al. (2003) sugeriram a construção de primers específicos para PCR da região espaçadora 16S-23S rDNA na detecção e identificação rápida de espécies de *Xanthomonas* e que rep-PCR pode ser um método prático para detecção e identificação destes patógenos

A análise de rep-PCR foi desenvolvida baseada na ocorrência de seqüências repetitivas conservadas (seqüências extragênicas palindrômicas repetitivas (REP), seqüências repetitivas intergênicas consenso de enterobactérias (ERIC) e elementos BOX) distribuídas dentro do genoma de diversas bactérias (Versalovic, Koenth & Lupski, 1991; Bruijn, 1992, Louws et al., 1994). Cada par de primers (REP, ERIC e BOX) é útil para o “fingerprinting” de diversas bactérias, incluindo, fitobactérias gram-negativas e gram-positivas, como também actinomicetes associados às plantas (Bruijn, 1992; Louws et al., 1994; Versalovic et al., 1991).

Segundo Swings, Vauterin & Kersters (1993), todas as espécies e patovares de *Xanthomonas* indutoras de lesões locais em seus hospedeiros têm a capacidade de induzir resposta hipersensível em plantas não hospedeiras, podendo servir como ferramenta útil na identificação de isolados fitopatogênicos.

Os objetivos deste trabalho foram selecionar plantas não-hospedeiras mais apropriadas para a identificação de isolados patogênicos de Xam; verificar a diversidade de Xam quanto à virulência e comparar os isolados utilizando primers 16S e 23S, REP e ERIC.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Os isolados de Xam utilizados neste estudo estão descritos na Tabela 1. Os isolados foram repicados e/ou isolados em meio de cultura 523 de Kado & Heskett (1970). Todos os isolados foram inoculados em plantas de algodão apresentando o segundo par de folhas verdadeiras. Suspensão bacteriana de cada isolado, na concentração de 10^8 UFC/mL, foi preparada a partir de colônias com 24 horas de crescimento em meio 523. As plantas foram colocadas em câmara úmida por 24 horas e a suspensão aspergida na superfície abaxial das folhas, com um atomizador manual. As plantas foram novamente colocadas em câmara úmida por 24 horas e depois levadas para casa de vegetação. As avaliações iniciaram-se uma semana após a inoculação, verificando-se a presença ou não dos sintomas característicos da mancha angular. Após o aparecimento dos sintomas, as folhas sintomáticas foram herborizadas para a preservação dos isolados. Todos os isolados foram reisolados em meio 523 e preservados em meio peptona glicerol a -80°C (Lazo & Gabriel, 1987).

2.2 Reação de Hipersensibilidade em plantas de fumo, tomate e pimentão

Os isolados foram inoculados em plantas de tomate, fumo e pimentão. As sementes de cada hospedeiro foram semeadas em bandejas contendo vermiculita estéril e as mudinhas transplantadas para vasos de 2 L contendo Plantimax®. Vinte dias após o transplântio foi realizada a inoculação.

Uma única colônia de cada isolado foi transferida para tubos de ensaio contendo meio 523. Os tubos foram incubados em BOD por 24 horas a 28°C. Após a incubação acrescentou-se água de torneira e o tubo foi agitado manualmente. A suspensão bacteriana foi inoculada em cada hospedeiro, por pressão, com uma seringa. Para as plantas de pimentão e fumo o experimento foi repetido duas vezes.

2.3 Virulência dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em plântulas de algodoeiro

Sementes de algodão da cultivar Makina foram semeadas em copos plásticos (500 mL) contendo substrato Plantimax[®]. Após o crescimento das plântulas até o primeiro par de folhas verdadeiras, realizou-se a inoculação dos isolados de Xam por aspersão de suspensão bacteriana na concentração de 10⁸ UFC/mL. As plantas foram submetidas à câmara úmida um dia antes e um após a inoculação e em seguida levadas à casa-de-vegetação. Com um atomizador manual a suspensão foi aspergida na superfície abaxial das folhas. Para o preparo da suspensão, cada isolado foi cultivado em meio 523 por 24 horas e, em seguida, preparou-se a suspensão com água de torneira. A testemunha consistiu na aspersão de água nas folhas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. Cada unidade experimental foi constituída por uma planta.

Foram realizadas quatro avaliações, sendo a primeira uma semana após a inoculação. Avaliou-se a severidade da mancha angular nas folhas utilizando a escala de Sidhu & Webster (1977) (adaptada), a qual é baseada em um critério de notas variando de 0 a 4, onde: 0 = folha sem sintoma, 1 = de 1 a 25% da folha lesionada, 2 = de 26 a 50% da folha lesionada, 3 = de 51 a 75% da folha lesionada, 4 = acima de 75% da folha lesionada. Determinaram-se os seguintes

componentes da doença: a) severidade por meio do índice de doença ponderado por McKinney (1923) e b) área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), calculada de acordo com Campbell & Madden (1990).

2.4 Amplificação dos genes da região ITS, ERIC e REP dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

2.4.1 Preparo do inóculo para extração do DNA

Os isolados de Xam utilizados neste estudo estão descritos na Tabela 1. Colônias individuais foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio 523 líquido e incubadas em BOD a 28°C por 24 horas.

2.4.2 Extração do DNA dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

A extração do DNA foi realizada de acordo com metodologia descrita por Ausubel et al. (1995). Alíquotas de 1,5 mL de suspensões bacterianas, cultivadas por 24h em meio líquido 523, de cada isolado foram centrifugadas a 11700 rpm por 2 minutos e os pellets ressuspensos em 567µL de TE (10mM Tris-HCl, pH 7,6, 1mM EDTA), 30µL de SDS (10% g/v) e 3 µL de proteinase K (20mg/mL). Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por 1 hora. Ao conteúdo dos tubos foram adicionados 100 µL de NaCl 5M, seguindo-se de agitação em vortex. Novamente, foram adicionados 80 µL de CTAB/NaCl (4,1g de NaCl e 10 g de CTAB, em 100 mL de água) seguindo-se de agitação em vortex. Os tubos foram então incubados em banho-maria a 65°C por 10 minutos e, a seguir, à temperatura ambiente, adicionaram-se 550 µL de clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1, seguindo-se de agitação manual por 10 minutos e centrifugação a 12000 rpm por 5 minutos. Após este processo, a fase superior foi transferida para novo tubo, medindo-se o volume. Nesta etapa adicionaram-se

0,6 volumes de álcool isopropílico e os tubos foram levados ao ultra freezer a -80°C, por 10 minutos. Novamente procedeu-se à centrifugação a 12000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet lavado com etanol 70%, seguindo-se de centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos. O pellet foi ressuspenso em 50 µL de TE e armazenado a 4°C.

2.4.3 Amplificação dos primers 16S e 23S

Os primers 16S uni 1330 (5'-GTTCCCGGGCCTTGTACACAC-3') e 23S uni 322 anti (5'-GGTCTTTTCACCTTTCCCTC-3') descritos por Honeycutt et al. (1995) foram utilizados para amplificar a região ITS dos isolados. A reação teve o volume total de 50 µL contendo 30-50ng de DNA, 1 unit Taq DNA polimerase (Pharmacia), 1µL de 100 µM dNTPs, 1µL de cada primer 10 µM, 3µL MgCl₂ 50µM e 5µL de Tampão PCR 10X. A reação foi conduzida em termociclador (PTC-100™ *Programmable Thermae Controller*, MJ Research, Inc.). As condições da reação foram: 1 ciclo de 94°C por 30 segundos e 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, segundo Honeycutt et al. (1995).

2.4.4 Condições da PCR para os primers ERIC e REP

Para a amplificação do DNA utilizou-se os primers ERIC (ERIC-1R 5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3'), ERIC-2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG3'), REP (REPIR-I 5' IICGICGICATCIGGC 3') e REP-2I (5' ICGICTTATGIGGCCTAC 3'), (Opgenorth et al., 1996) sintetizados por Invitrogen Brasil LTDA. A reação foi realizada em volume de 50 µL contendo 2 ng de DNA, 10 pmol de cada primer, 2 U de Taq DNA polimerase e 1,25 mM dNTP (Gibco BRL, Burlington, Ont). As etapas de amplificação foram as

descritas por Opgenorth (1996), incluindo desnaturação inicial a 95°C por 6 min; 35 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento por 1 min para os primers REP a 44°C e ERIC 52°C e extensão a 65°C por 8 min com um ciclo final de extensão a 68°C por 16 min. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5% e em seguida corado com brometo de etídeo. O marcador utilizado foi 1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL).

Os padrões de bandas dos fragmentos gerados pelos primers REP e ERIC foram comparados entre os isolados bacterianos. A presença ou ausência de cada banda foi transformada em dados binários, sendo '1' para presença e '0' para ausência de banda. As relações genéticas entre os isolados foram determinadas utilizando-se o coeficiente de DICE e o agrupamento feito pelo método UPGMA (média aritmética não ponderada) no programa SAS versão 8.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve variação no comportamento dos isolados quanto à reação de hipersensibilidade nas plantas de fumo, tomate e pimentão (Tabela 1). Todos os 20 isolados de Xam apresentaram reação de hipersensibilidade em plantas de tomate, 8 em plantas de pimentão e apenas 3 em plantas de fumo (Figura 1). Os isolados Xam 1719, Xam 2003 e Xam 13601 induziram HR nas três espécies testadas. Segundo Romeiro (2001) a reação de hipersensibilidade pode ser utilizada como um teste rápido de patogenicidade, entretanto muitas espécies de *Xanthomonas* não induzem HR em plantas não hospedeiras.

Desta forma, o tomateiro foi a melhor planta não-hospedeira para comprovação da patogenicidade dos isolados de Xam, embora segundo Romeiro (2001) seja necessário a utilização de mais de uma planta-teste nos ensaios de HR.

Halfeld-Vieira & Souza (2000) trabalhando com isolados patogênicos de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* verificaram que plantas de fumo e tomateiro foram as mais indicadas para a comprovação de patogenicidade por HR.

TABELA 1 Teste de hipersensibilidade e patogenicidade dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* utilizados neste estudo

Isolado	Hospedeiro	Ano	Patogenicidade em algodão	HR		
				Fumo	Tomate	Pimentão
IBSBF 555 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	1985	+	-	+	+
IBSBF 1038 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	1993	+	-	+	-
IBSBF 1153 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	1995	+	-	+	-
IBSBF 1562 ²	<i>Gossypium hirsutum</i>	2001	+	-	+	-
IBSBF 1733 ^{1*}	<i>Gossypium hirsutum</i>	1958	+	-	+	+
IBSBF 1779 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2002	+	+	+	+
IBSBF 1880 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2003	+	-	+	-
IBSBF 1913 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2003	+	-	+	+
IBSBF 1953 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2004	+	-	+	+
IBSBF 1954 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2004	+	-	+	-
IBSBF 2003 ¹	<i>Gossypium hirsutum</i>	2003	+	+	+	+
IAPAR 13601 ²	<i>Gossypium hirsutum</i>	2002	+	+	+	+
IAPAR 13858 ²	<i>Gossypium hirsutum</i>	2002	+	-	+	-
IAPAR 11999 ²	<i>Gossypium hirsutum</i>	1997	+	-	+	+
IAPAR 15219 ²	<i>Gossypium hirsutum</i>	2002	+	-	+	-
UFLA 5100	<i>Gossypium hirsutum</i>	2005	+	-	+	-
UFLA 6200	<i>Gossypium hirsutum</i>	2003	+	-	+	-
UFLA 1101	<i>Gossypium hirsutum</i>	2005	+	-	+	-
UFLA 1102	<i>Gossypium hirsutum</i>	2006	+	-	+	-
UFLA 6500	<i>Gossypium hirsutum</i>	2006	+	-	+	-

¹Isolados adquiridos junto ao Instituto Biológico, *Isolado Tipo

²Isolados doados pelo pesquisador Rui Pereira Leite Junior do IAPAR.

(+) = resultado positivo (-) = resultado negativo



FIGURA 1 HR incitada pelo isolado 2003 em plantas de A)Fumo, B) pimentão e C) Tomate

Os sintomas causados por Xam após inoculação por pulverização das folhas de algodoeiro (Figura 2) foram manchas pequenas, verdes, encharcadas e arredondadas (ou irregulares), que com o tempo tornaram-se marrons; na superfície abaxial aspecto translúcido contra luz; lesões pretas e compridas no hipocótilo; numerosas manchas, causando clorose, necrose e encarquilhamento e eventualmente desfolha; lesões ao longo das nervuras; lesões cinzentas a pretas fuliginosas nos pecíolos, hastes e ramos.

O isolado IAPAR 11999 diferenciou-se dos demais quanto à sintomatologia. Em todas as repetições as plantas apresentaram arroxamento ao longo das nervuras (Figura 2). Krug (1935) atribuiu ao fungo *Veticillium* o arroxamento das nervuras observado em plantas de algodão.

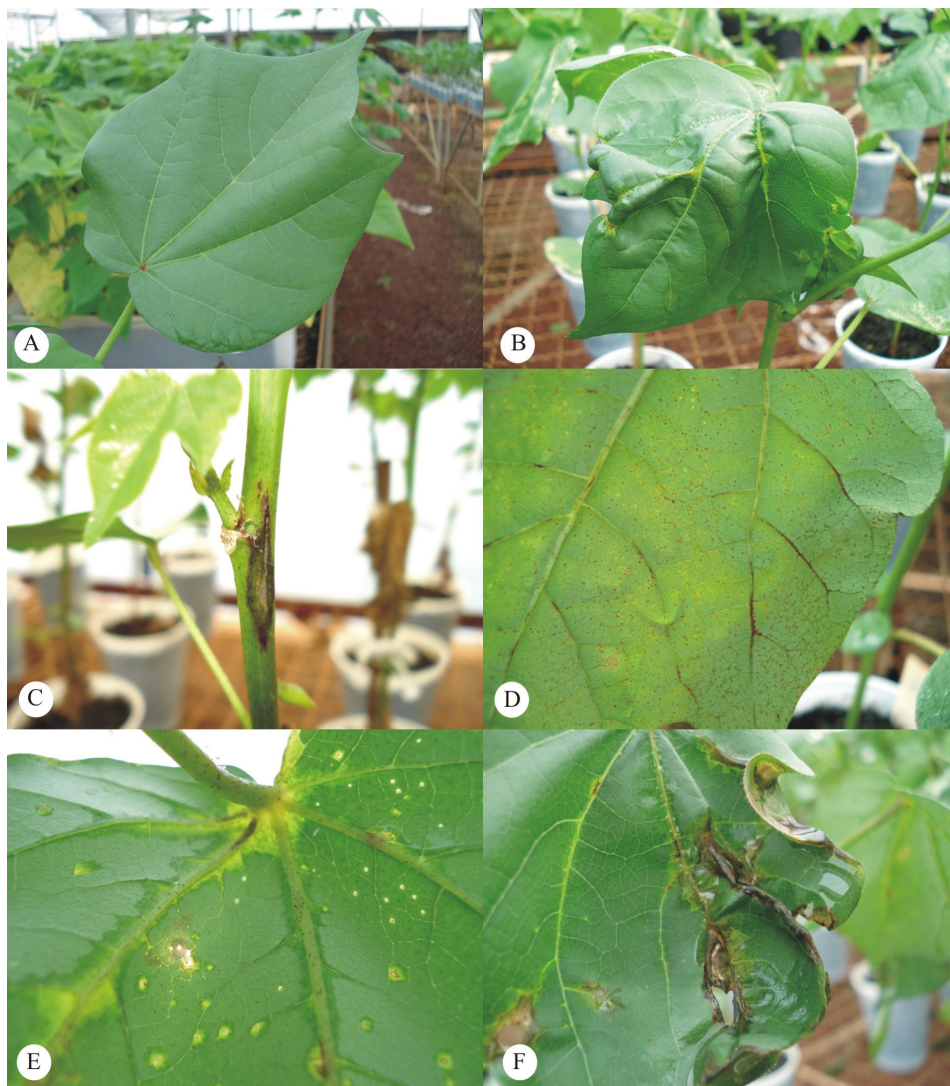


FIGURA 2 Sintomas causados por *Xathomonas axonopodis* pv. *malvacearum* após inoculação por pulverização das folhas de algodoeiro. A) folha sadia; B) encarquilhamento do limbo foliar; C) lesões cinzentas a pretas fuliginosas na haste; D) “queima das nervuras”; E) manchas pequenas, verdes, encharcadas e arredondadas (ou irregular); F) folhas deformadas (retorcidas) com infecção intensa.

Houve diferença significativa entre os isolados de Xam, permitindo a formação de três grupos quanto à severidade (AACPD) pelo teste de F (Figura 3). Os isolados mais agressivos foram: IB 1880, UFLA 1102, UFLA 5100, IB 1954, UFLA 6500, IB 1913, UFLA 1101, IB 2003, IB 1562 e IAPAR 15219.

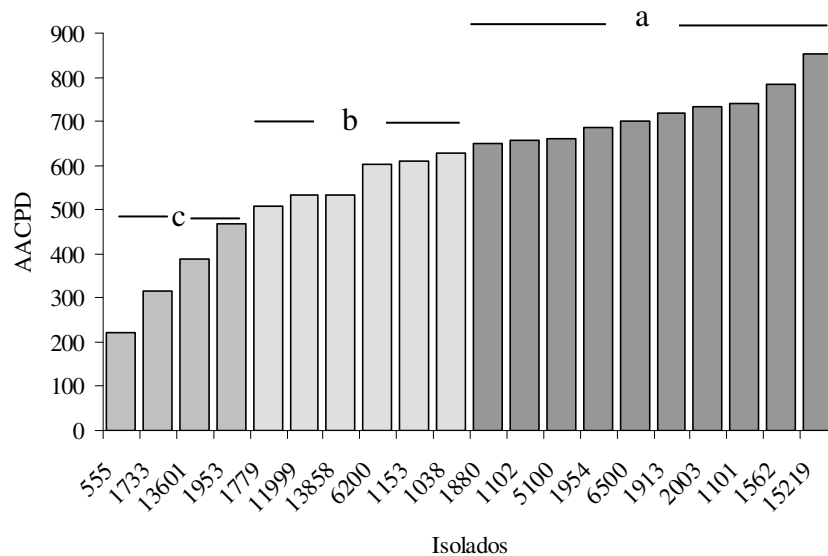


FIGURA 3 Área abaixo da curva de progresso da mancha angular do algodoeiro causada por diferentes isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *mavaearum*.

A diferença entre os valores do índice de doença indica a existência de variabilidade na virulência entre os isolados de Xam, como verificado em outras doenças incitadas por bactérias. Silveira, Mariano & Michereff (2003) também observaram diferença entre os índices de doença em vinte isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*.

Linhagens de *X.s axonopodis* pv. *aurantifolii* (Xaa) Tipo C, produtoras (PP) e não produtoras de pigmento escuro (NP) em meio de cultura, e *X. axonopodis* pv. *citri* (Xac) Tipo A diferiram entre si quanto ao período de

incubação, diâmetro e população bacteriana das lesões e, comparativamente, Xaa Tipo C NP foi mais agressiva do que Xaa Tipo C PP. Algumas linhagens induziram sintomas diferentes quanto à presença e extensão de anasarca, halo amarelo e saliência do tecido necrosado (Nociti et al., 2006).

A virulência de seis isolados de *X. campestris* em couve foi determinada pela porcentagem de área foliar afetada, permitindo a formação de dois grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Para os isolados B, UPF e C7 a porcentagem de área foliar afetada variou entre 52 e 69%, enquanto para os isolados CF e C e estirpe B-1459 entre 0-30% (Nitschke & Rodrigues, 2000).

Por meio dos primers 16S e 23S foram obtidos fragmentos de aproximadamente 680 pb, apresentando alta similaridade entre os isolados de Xam (Figura 5).

Segundo Sahin et al. (2003) a região 16S-23S rDNA pode ser utilizada para diagnose de rotina, desde que haja estudos adicionais para designação de primers específicos para PCR dessa região para detecção e identificação de espécies de *Xanthomonas*. As regiões amplificadas por rep-PCR parecem ser conservadas em estirpes estreitamente relacionadas e distintas nas diversas espécies do mesmo gênero.

Os padrões de amplificação dos fragmentos de DNA genômico gerados pelos elementos repetitivos amplificados pelos primers REP e ERIC estão representadas na Figura 6 A amplificação via PCR utilizando a unidade repetitiva REP, foi efetiva para todos os isolados de Xam e também para outras espécies analisadas. No entanto, o número de padrões de bandas em cada isolado de Xam foi significativamente menor quando comparado aos primers ERIC (Figura 6). A amplificação dos DNAs resultou em fragmentos com tamanhos menores que 5 kb para os isolados de Xam (Figura 6).

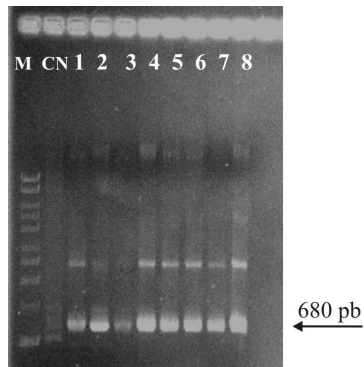
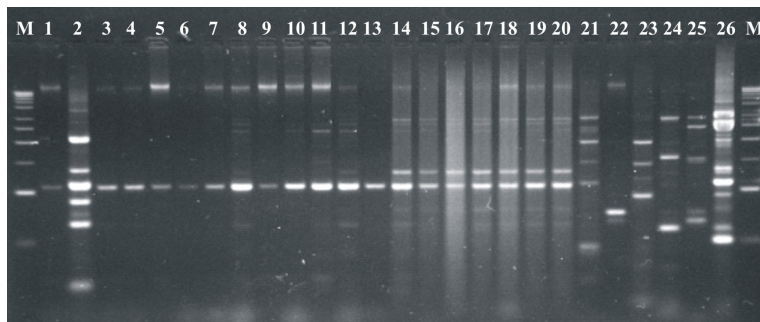


FIGURA 5 Produtos da PCR de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (1 a 8), obtido com os primers 16S e 23S. M: Marcador de peso molecular, CN: Controle Negativo.

REP



ERIC

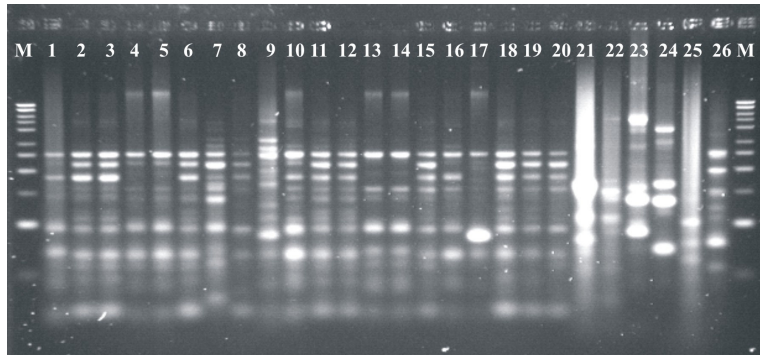


FIGURA 6 Perfil eletroforético de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (1 a 20) e *X. campestris* pv. *campestris* (21 e 22), *Xanthomonas begoniae* (23), *Dickeya chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* (24), *Erwinia carotovora* subs. *carotovora* (25), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (26), obtido com os primers REP e ERIC. M: Marcador de peso molecular.

Diferenças no polimorfismo gerado pelos primers de rep-PCR entre isolados de *Xanthomonas* spp. também foram observados em outros estudos (Trindade, Lima & Ferreira, 2005; Louws et al., 1994).

Rep-PCR fingerprinting e análise da região 16S-23S rDNA não são técnicas moleculares promissoras só para o cálculo de relações genômicas, mas também para detectar e identificar isolados bacterianos (Gurtler & Stanisich 1996; Louws et al., 1994; 1995; Opgenorth et al., 1996).

Tegli, Sereni & Surico (2002) desenharam um par de primers para a detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* a partir do fragmento amplificado via PCR da unidade repetitiva REP. Souza, Maringoni & Krause-Sakate (2006) compararam os primers desenhados por Tegli, Sereni & Surico (2003) com os desenhados por Guimarães et al. (2003) e observaram que os primeiros são mais indicados para a detecção de isolados da bactéria.

Para a diagnose de Xam, Chakrabarty et al. (2005) desenharam primers a partir do gene de patogenicidade pht N. No entanto, esses primers estão em processo de patente e, por isso, não disponíveis para a pesquisa e não testados para diagnose de Xam em sementes.

Dessa forma, pretende-se a partir dos padrões gerados das seqüências amplificadas da região 16S e 23S e das regiões repetitivas (REP e ERIC), desenhar primers para diagnose de Xam.

O polimorfismo observado entre os isolados de Xam permitiu a diferenciação de 2 subgrupos quando utilizado o primer REP e de 5 subgrupos quando utilizado o primer ERIC sem nenhuma relação com a origem dos isolados e nem com os grupos gerados a partir da virulência dos mesmos.

O dendrograma gerado a partir da junção dos produtos da PCR dos primers REP e ERIC permitiu a formação de um grupo com os isolados de Xam e *X. campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas begoniae*, *D. chrysanthemi* pv. *chrysanthemi* e *P. syringae* pv. *syringae* como grupos externos (Figura 7).

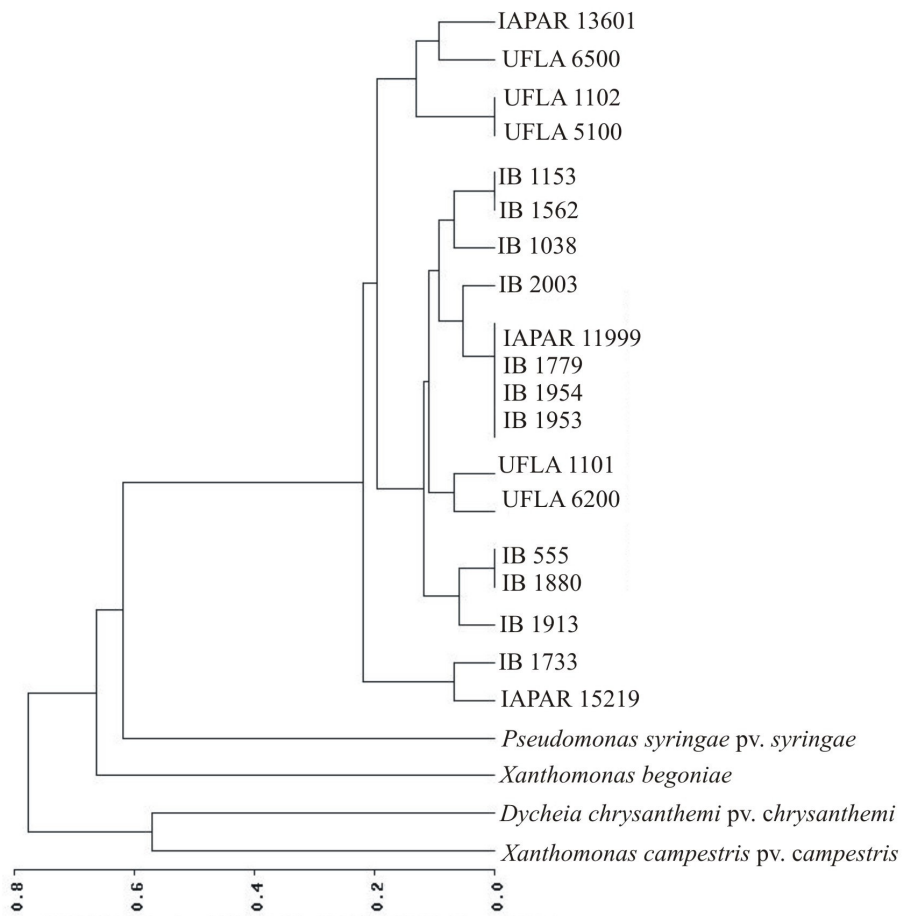


FIGURA 7 Dendrograma gerado pelo agrupamento UPGMA, construído com base no coeficiente de DICE, a partir da análise de bandas polimórficas geradas por rep-PCR de 20 isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas begoniae*, *Dickeya chrysanthemi* pv. *chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

4 CONCLUSÕES

- Existe variabilidade entre isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* quanto a virulência em plantas de algodão
- Plantas de tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Sta Clara foram mais eficientes na identificação de isolados patogênicos de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* por hipersensibilidade do que de fumo (*Nicotiana tabacum* L. cv. Turkish NN) e pimentão (*Capsicum annuum* L. cv. Agrônômico 10 G).
- Por meio dos primers ERIC foi possível diferenciar uma maior quantidade de bandas polimórficas comparados aos primers REP.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKELLO, B.; HILLOCKS, R. J.; Distribution and Races of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* on Cotton (*Gossypium hirsutum*) in Uganda. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 2, p. 65-69, Feb. 2002.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. 3rd ed. **Short Protocols in Molecular Biology**. New York: Greene Publishing and Wiley, 1992.
- BRUIJN, F. J. de. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprinting the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 7, p. 2180-2187, July 1992.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990. 532 p.
- CHAKRABARTY, P. K.; SABLE, S.; MONGA, D.; MAYEE, C. D. Polymerase chain reaction-based detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* and cotton leaf curl virus. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 75, n. 8, p. 524-527, Aug. 2005.
- CHITTARANJAN, S.; DE BOER, S. H. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* in geranium and greenhouse nutrient solution by serological and PCR techniques. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 6, p. 555-563, Aug. 1997.
- CIA, E. **Variabilidade de *Xanthomonas malvacearum* (E.F. Smith) Dowson, no Estado de São Paulo**. 1972. 57 p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- DEPARASIS, J.; ROTH, D. A. Nucleic acid probes for identification of phyto bacteria: Identification of genus specific 16S rRNA sequences. **Phytopathology**, St. Paul, v. 80, n. 7, p. 618-621, July 1990.
- GUIMARÃES, P. M.; SMITH, J. J.; PALMANO, S.; SADDLER, G. S. Characterisation of *Cutobacterium flaccumfaciens* pathovars by AFLP, rep-PCR and pulsed-field gel electrophoresis. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 8, p. 817-825, Oct. 2003.

GURTLER, V.; STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. **Microbiology, Readings**, v. 142, n. 1, p. 3–16, Jan. 1996.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; SOUZA, R. M. de. Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 94-102, dez. 2000.

HONEYCUTT, R. J., SOBRAL, B. W. S.; MCCLELLAND, M. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology, Readings**, v. 141, n. 12, p. 3229-3239, Dec. 1995.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. n. 6, p. 969-976, June 1970.

KLEMENT, Z.; GOODMAN, R. N. The hypersensitive reaction to injection by bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 5, p.17-44, 1967.

KRUG, H. P. Conhecimentos actuaes sobre a murcha do algodoeiro no Estado de São Paulo. In: CONFERENCIA NACIONAL ALGODOEIRA, 1935, São Paulo. **Annaes...** São Paulo: Braxil de Rothschild, 1935. p. 247-248.

LAZO, G. R.; GABRIEL, D. W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 77, n. 3, p.448-453, Mar. 1987.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; BRUJIN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, July 1994.

MCKINNEY, R.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 3, p. 195-218, 1923.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V. Effect of virulence and serial transfers of *Xanthomonas campestris* on xanthan gum production. **Brazilian Journal of Microbiology**, Passo Fundo, v. 31, n. 1, p. 58-60, Feb. 2000.

NOCITI, L. A. S.; CAMARGO, M.; RODRIGUES NETO, J.; FRANCISCHINI, F. J. B.; BELASQUE JÚNIOR, J. Agressividade de linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* Tipo C em lima ácida 'Galego'. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p.140-146, Mar. 2006.

NORMAN, D. J.; CHASE, A. R.; HODGE, N. C.; E STALL, R. E. Differentiation of three species of *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas maltophilia* using cellular fatty acid analyses **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, n. 8, p. 687–693, Nov. 1997.

OPGENORTH, D. C.; SMART, C. D.; LOUWS, F. J.; BRUIJIN, F. J. de.; KIRKPATRICK, B. C. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genimic fingerprintings. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 8, p. 868-873, Feb. 1996.

PETERS, B. J.; ASH, G. J.; COTHER, E. J.; HAILSTONES, D. L.; NOBLE, D. H.; URWIN, N. A. R. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Austrália: pathogenic, phenotypic and genetic diversity. **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 73-79, Feb. 2004.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2001.

SAHIN, F.; KOTAN, R.; ABBASI, P. A.; MILLER, S. A. Phenotypic and genotypic characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* strains. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 165–172, Feb. 2003.

SIDHU, G. S.; WEBSTER, J. M. The use of amino acid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, n. 2, p. 117-127, 1977.

SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Variabilidade de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* provenientes de melão produzido no estado do Rio Grande do Norte. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 255-261, jul./set. 2003.

SMITH, N.C.; HENNESSY, J.; E STEAD, D. E. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1R primer for rapid identification of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 7, p. 739–748, Sept. 2001.

SOUZA, V. L.; MARINGONI, A. C.; KRAUSE-SAKATE, R. Variabilidade genética em isolados de *Cutobacterium flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 170-176, abr./jun. 2006.

SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (Eds.). *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993. p. 121-156.

TEGLI, S.; SERENI, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Cutobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 331-337, 2002.

TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 46-54, jan./fev. 2005.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 5, p. 472-489, July 1995.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, Dec. 1991.

VIJAYANAND, G. K.; SHYLAJA, M. D.; KRISHNAPPA, M.; SHETTY, H. S. An approach to obtain specific polyclonal antisera to *Xanthomonas campestris* pv. *cyamopsidis* and its potential application in indexing of infected seeds of guar. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, p. 711-717, Nov. 1999.

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO DE MEIO SEMI-SELETIVO PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* EM SEMENTES DE ALGODÃO

RESUMO

BARBOSA, Juliana Franco. **Desenvolvimento de meio semi-seletivo para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão.** 2007. p. 91 - 113. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.⁷

O controle efetivo da mancha angular do algodoeiro, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), requer o uso de sementes sadias. O plaqueamento das sementes inteiras em meio de cultura semi-seletivo é um método de diagnose rápido e eficiente. Em geral, o patógeno cresce lentamente, pois há a inclusão de compostos antibacterianos e antifúngicos para suprimir o crescimento da microflora associada à semente. Desta forma, foi realizada a seleção de antibióticos e fungicidas para suprimir a microflora associada às sementes de algodão, porém que não interferissem no crescimento de Xam. O meio 523 de Kado & Heskett (1970) foi escolhido como meio básico por permitir um bom crescimento de Xam. Para retardar a protrusão radicular de sementes de algodão sem inibir o isolamento de Xam, a composição do meio 523 de Kado & Heskett (1970) foi alterada, substituindo-se a sacarose por manitol. A nova composição do meio 523 ficou assim definida: 30 g manitol, 4 g de extrato de levedura, 8 g de caseína hidrolizada, 2 g de K₂HPO₄, 0,3 g MgSO₄.7H₂O, 15 g agar, 1000 mL água destilada, com adição, após autoclavagem de, 50 mg de cefalexina, 25 mg de cefadroxil, 10 mg de clorotalonil e 150 µL de triadimenol. O meio 523 modificado foi eficiente para o crescimento in vitro de Xam.

⁷ Comitê orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Co-orientadora), José da Cruz Machado – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

BARBOSA, Juliana Franco. **Development of semi-selective medium for the detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in cotton seeds.** 2007. p. 91 - 113. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant Pathology) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil.⁸

The effective control of cotton bacterial blight, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), depends on the use of health seeds. The plating of seeds in semi-selective culture medium is a fast and efficient diagnostic method for that bacterium. In general, the pathogen grows slowly due to the use of antibacterial and antifungal compounds in the medium to suppress the growth of the microflora associated with the seed. Thus, the selection of antibiotics that suppress the microflora associated with the cotton seeds, without interfering with the Xam growth, was investigated. The 523 medium of Kado & Heskett (1970) was chosen as the basal medium for allowing a good Xam growth. In order to retard the root protrusion of the cotton seeds without inhibiting the Xam isolation, the composition of the 523 medium of Kado and Heskett (1970) was altered by the substitution of sucrose by mannitol. Thus, the new composition of the 523 medium was the following: 30 g of mannitol, 4 g of yeast extract, 8 g of hydrolyzed casein, 2 g of K₂HPO₄, 0.3 g of MgSO₄.7H₂O, 15 g of agar, 1000 mL of distilled water, with addition of 50 mg of cefalexin, 25 mg of cefadroxil, 10 mg of chlorathalonil and 150 µL of triadimenol after autoclaving. The 523 modified medium was efficient for the *in vitro* growth of Xam.

⁸ Advising committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Adviser), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Co-adviser), José da Cruz Machado – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

A mancha angular, cujo agente etiológico é *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, caracteriza-se como uma doença importante para a cultura do algodão. A bactéria é transmitida pela semente que também é a principal fonte de inóculo no campo. A utilização de sementes comprovadamente sadias é uma das principais formas de controle da doença, além de ser simples, econômica e segura.

Os métodos de detecção de fitobactérias em sementes devem ser eficientes e seguros, uma vez que o nível de infestação e/ou infecção é baixo. No entanto, a maioria dos métodos apresenta ampla variação quanto à especificidade e sensibilidade na relação bactéria-semente, o que dificulta a sua escolha (Schaad, 1989).

Os meios de cultura semi-seletivos, os quais suprimem a maioria dos organismos saprófitos e permitem a identificação direta e recuperação do patógeno representam um método de fácil execução e baixo custo, sendo muito utilizados na rotina de vários laboratórios.

Além disso, meios semi-seletivos são valiosos para o isolamento de bactérias fitopatogênicas de tecidos de plantas e solo e alguns podem ser tão sensíveis quanto à reação da polimerase em cadeia (PCR) (Wang et al., 1999) ou mais sensíveis que técnicas imunológicas (Alvarez & Lou, 1985; Wang et al., 1999), sendo fáceis de usar e menos dispendiosos.

Neste trabalho teve como objetivou-se o desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção de Xam em lotes de sementes de algodão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (DFP/UFLA).

2.1 Origem, obtenção e preservação dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam)

Os isolados de Xam utilizados neste estudo estão descritos na Tabela 3. A bactéria foi isolada de folhas de algodão herborizado, utilizando-se placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 20 mL do meio 523 (Kado & Heskett, 1970) pelo método de estrias paralelas e levadas para incubação por 48 h a 28°C.

2.2 Utilização de manitol em meio de cultura para o isolamento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a partir de sementes de algodão

No desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção de Xam em sementes de algodão, utilizou-se como meio básico o 523 de Kado & Heskett (1970). Conforme verificado previamente, o manitol não alterou o crescimento dos isolados de Xam e foi eficiente no controle da protrusão radicular das sementes de algodão durante o período de incubação em meio de cultura. Assim, foi verificada sua eficiência no isolamento de Xam a partir de sementes contaminadas, substituindo a sacarose por 30g de manitol/L de meio. A quantidade dos demais reagentes do meio 523 não foi alterada.

2.3 Antibióticos na inibição do crescimento *in vitro* de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

A sensibilidade de quatro isolados de Xam a antibióticos foi determinada por meio de análises qualitativas. As substâncias testadas contidas em discos de papel de filtro (**CERCON[®]**) foram as seguintes: estreptomicina (10 µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), penicilina (10 un), cloranfenicol (30 µg), cefadroxil (30 mcg), cefalotina (30 mcg), cefotaxima (30 mcg), cefoxitina (30 mcg), ceftriaxona (30 mcg), ampicilina (10 mcg), amoxicilina (10 mcg), amicacina (30 mcg), ácido pipemídico (20 mcg), ácido nalidíxico (30 mcg), fosfomicina (200 mcg), kanamicina (30 mcg), lincomycina (2 mcg), netilmicina (30 mcg), norfloxacin (10 mcg), oxacilina (1 mcg), novobiocina (5 mcg), rifampicina (5 mcg), sulfonamidas (300 mcg), sulfazotrim (25 mcg).

Preparou-se uma camada básica do meio 523 em placas de Petri. Após a solidificação verteu-se uma sobrecamada de 5 mL de meio 523 fundente, ao qual se incorporou 0,1 mL de suspensão bacteriana de cada isolado (cultura 24 horas). Solidificada a sobrecamada, foram distribuídos dois discos equidistantes de cada antibiótico por placa.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 4 repetições (dois discos de cada antibiótico por repetição). As avaliações foram realizadas medindo-se o halo de inibição do crescimento bacteriano promovido pelos produtos (Romeiro, 2001). A medição dos halos foi realizada com uma régua, incluindo os 0,6 cm do disco de antibiótico.

Após esta primeira seleção, seis antibióticos foram selecionados para uma nova análise qualitativa com onze isolados de Xam. Os procedimentos foram os mesmos utilizados anteriormente.

2.3.1 Antibiograma quantitativo

Os produtos aos quais todos os isolados de Xam mostraram-se insensíveis, nas condições do ensaio, foram submetidos ao antibiograma quantitativo para determinação das concentrações a serem adicionadas ao meio básico.

Alíquotas das soluções estoque de cada antibiótico utilizado foram adicionadas ao meio de cultura 523 fundente, após a autoclavagem e resfriado, à temperatura de 50°C, nas concentrações 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 100 µg/mL.

Foram utilizados para este teste cinco isolados. Quatro gotas (2 µL) da suspensão de Xam foram semeadas em pontos equidistantes sobre o meio 523 suplementado com cada concentração de antibiótico. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas. Considerou-se na avaliação apenas o crescimento ou a inibição dos isolados no meio de cultura.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições.

2.4 Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a fungicidas recomendados para a cultura do algodão

Para avaliar a sensibilidade dos isolados de Xam a fungicidas utilizados na cultura do algodão, utilizou-se o meio 523 (Kado & Heskett, 1970) contendo os produtos na concentração desejada do ingrediente ativo. Após a solidificação do meio, às placas foram semeadas com 100 µL da suspensão de Xam, seguida de homogeneização com alça de Drigalski e incubadas por 48 horas a 28 °C. Os produtos com suas respectivas dosagens estão descritos na Tabela 1. As avaliações foram realizadas observando-se o crescimento bacteriano do isolado de Xam.

TABELA 1 Diferentes doses de fungicidas testados sobre o crescimento bacteriano de isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.

Produto comercial (ingrediente ativo)	Dose 1	Dose 2	Dose 3	Dose recomendada¹	Dose 5
Derosal 500 SC (carbendazim)	50	100	200	400 ppm	800
Monceren PM (pencicuron)	93,75	187,5	375	750 ppm	1500
Euparen M 500 PM (tolifluanida)	93,75	187,5	375	750 ppm	1500
Baytan 150 SC (triadimenol)	37,5	75	150	300 ppm	600

¹ Dose recomendada para cada produto na cultura do algodão (Agrofit, 2007)

2.5 Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* à exposição simultânea a antibióticos e fungicidas

Avaliou-se a sensibilidade de seis isolados de Xam aos antibióticos cefadroxil e cefalexina e aos fungicidas clorotalonil e triadimenol. Os tratamentos foram: cefalexina e cefadroxil (25, 50 e 100 µg/mL) combinados com clorotalonil (10 µg/mL) e triadimenol (75, 150 e 300 µg/mL). Foram preparadas soluções estoque de cada antibiótico e do fungicida clorotalonil. Após a autoclavagem e resfriamento à temperatura de 50°C foram adicionadas ao meio de cultura 523 alíquotas de cada solução para se obter a concentração final desejada. O tratamento testemunha foi o meio 523 sem a adição dos produtos.

Gotas (2 µL) da suspensão bacteriana de Xam foram semeadas em pontos equidistantes sobre o meio 523 suplementado com cada concentração de

antibiótico e fungicida. Cada placa foi dividida em seis setores, de forma que, os seis isolados fossem avaliados numa mesma placa. Foram utilizadas 4 placas por tratamento, totalizando de 9 tratamentos. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas. Considerou-se na avaliação apenas o crescimento dos isolados ou a inibição destes no meio de cultura.

2.6 Determinação do índice de repressão

Para a determinação do índice de repressão (IR) foram utilizados seis isolados de Xam. Após 48 horas de crescimento em meio 523 a 28°C, cada isolado foi resuspendido em solução salina (0,85%). Alíquotas de 100µL das diluições 10^{-5} e 10^{-6} de cada isolado foram plaqueadas em meio de cultura 523 e em 523 modificado. Foram utilizadas três placas por diluição.

A composição do meio 523 constitui-se em 30 g de manitol, 4 g de extrato de levedura, 8 g de caseína hidrolisada, 2 g de fosfato de potássio bibásico, 0,3 g de sulfato de magnésio, 20 g de agar para 1000 mL de água destilada. Após a autoclavagem foram acrescentados, cefalexina 50µg/ml; cefadroxil 50 µg/mL; clorotalonil 10 µg/ml e triadimenol 75 µg/ml.

As placas foram incubadas a 28°C e, após 48 horas, procedeu-se a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de Xam em cada meio. O IR foi determinado pela fórmula: (média de UFC do meio semi-seletivo/ média de UFC do meio basal) x 100, de acordo com Oliveira (1995).

2.7 Determinação do índice de supressão (IS)

Para avaliar a inibição do crescimento de organismos contaminantes no meio semi-seletivo proposto foram utilizadas amostras de 1000 sementes do lote de sementes descrito no item 3.1. As sementes foram depositadas em erlenmeyer

(500 mL) com 240 mL de água esterilizada. O frasco foi incubado em geladeira por 18 horas. Após o período de incubação o frasco foi agitado manualmente e alíquotas de 100 µL do extrato puro e das diluições 10^{-1} e 10^{-2} foram semeadas em placas de Petri contendo o meio 523 modificado e o meio 523. Foram utilizadas três placas por diluição.

A avaliação consistiu na contagem do número de colônias fúngicas e bacterianas em cada meio. O IS foi calculado seguindo a fórmula: (média de UFC/mL do meio 523 - média de UFC/mL do meio 523 modificado/ média de UFC/mL do meio 523) * 100, de acordo com Silva (2002).

3 RESULTADOS

3.1 Antibióticos na inibição do crescimento *in vitro* de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Neste primeiro experimento foram utilizados apenas quatro isolados de Xam para uma pré-seleção dos antibióticos aos quais Xam foi insensível.

Não houve diferença entre os isolados de Xam quanto à sensibilidade aos antibióticos testados. As médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento do Xam estão apresentadas na Tabela 2. Os antibióticos que mais inibiram os isolados foram: ceftriaxona, fosfomicina, kanamicina, netilmicina, norfloxacin, rifampicina, sulfonamidas, cloranfenicol e tetraciclina. Na presença de cefoxitina, ampicilina, amicacina, ácido pipemídico, ácido nalidíxico, estreptomicina, eritromicina, cefotaxima, sulfazotrim, foram produzidos halos intermediários de inibição do crescimento. Os menores halos de inibição foram observados quando da utilização dos antibióticos: penicilina, cefalotina, amoxicilina. Não apresentaram halos de inibição ou halos muito pequenos: lincomicina, oxacilina, novobiocina, cefadroxil (Figura 1).

Dezordi (2006) observou variabilidade entre os isolados de Xam, quanto à sensibilidade a produtos antimicrobianos. Romeiro et al. (1998) observaram que entre isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ocorre resistência múltipla constitutiva para alguns antibióticos.

TABELA 2 Antibióticos e diâmetro do halo de inibição do crescimento *in vitro* de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Antibióticos	Segmento do diâmetro dos halos de inibição de cada isolado (cm)			
	UFLA 6200	UFLA 1101	UFLA 5100	UFLA 6500
Ácido nalidíxico (30 mcg)	2,5	2,1	2,2	2,8
Ácido pipemídico (20 mcg)	1,7	2,1	2,2	2,3
Amicacina (30 mcg)	2,3	2,2	3,2	3,6
Amoxicilina (10 mcg)	1,0	1,0	2,2	2,3
Ampicilina (10 mcg)	1,0	1,9	2,5	3,6
Cefadroxil (30 mcg)	1,0	1,0	0,6	0,6
Cefalotina (30 mcg)	1,1	1,0	1,0	1,3
Cefotaxima (30 mcg)	2,6	1,6	1,2	2,8
Cefoxitina (30 mcg)	1,1	1,0	2,7	3,8
Ceftriaxona (30 mcg)	3,9	3,4	3	2,5
Cloranfenicol (30 mcg)	2,6	4,3	3,7	4,2
Eritromicina (15 mcg)	3,9	1,0	2,6	3,6
Estreptomicina (10 mcg)	2,5	2,6	2,2	2,8
Fosfomicina (200 mcg)	3,5	3,8	3,5	3,9
Kanamicina (30 mcg)	2,8	3,5	3,1	3,7
Lincomicina (2 mcg)	0,6	0,6	0,6	0,6
Netilmicina (30 mcg)	3,4	3,7	2,9	3,2
Norfloxacina (10 mcg)	3,1	3,6	3,4	2,2
Novobiocina (5 mcg)	0,6	0,6	0,6	1,0
Oxacilina (1 mcg)	1,0	0,6	0,6	0,6
Penicilina (10 UI)	1,3	1,4	1,0	2,4
Rifampicina (5 mcg)	3,1	3,9	3,7	3,4
Sulfazotrim (25 mcg)	1,9	1,7	2,1	1,9
Sulfonamida (300 mcg)	3,4	3,5	4,1	3,1
Tetraciclina (30 mcg)	4,5	3,5	4,1	3,1

Os antibióticos penicilina, cefalotina, lincomycina, oxacilina, cefadroxil e novobiocina, por proporcionarem os menores halos de inibição, foram selecionados para a segunda fase dos trabalhos sendo testados contra onze isolados de Xam. Acrescentou-se também aos ensaios o antibiótico cefalexina não disponível na primeira fase dos ensaios. Nesta segunda fase foram selecionados os antibióticos lincomycina, oxacilina, cefadroxil e cefalexina, os quais não formaram halo de inibição.

Dezordi (2006) também verificou a resistência de cinco isolados de Xam aos antibióticos lincomycina, oxacilina, cefadroxil e cefalexina, além de, nitrofurantoin, cefazolin, tripetoprim, sulfanamida, mupirocin e novobiocin. Os isolados avaliados no presente estudo foram sensíveis ao antibiótico sulfanamida contrário ao observado por Dezordi (2006), assim como ao novobiocin no último experimento.

Mehta, Bomfeti & Bolognini (2005) também selecionaram os antibióticos cefalexina e cefadroxil para a composição de um meio semi-seletivo para Xam.

3.2 Antibiograma quantitativo

Dos 26 antibióticos testados, foram escolhidos 4 para a avaliação quantitativa. Como não se encontrou no comércio local os antibióticos oxacilina e lincomycina, foram selecionados, então, cefadroxil e cefalexina.

O crescimento de todos os isolados de Xam avaliados foi semelhante à testemunha em todas as concentrações testadas, tanto para o antibiótico cefalexina quanto para o cefadroxil.

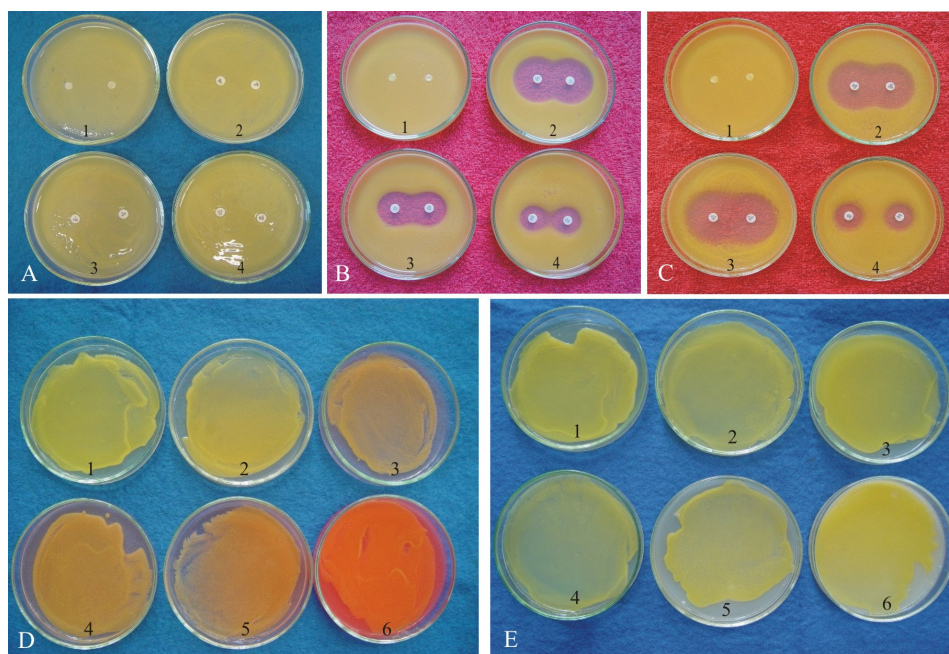


FIGURA 1 Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a antibióticos e fungicidas. (A) Isolado 555 e (1 a 4) testemunha, oxacelina, ácido nalidíxo e penicilina, respectivamente; B) Isolado UFLA 6200 e (1 a 4) testemunha, ácido nalidíxo, amicacina e ácido pipemídico, respectivamente; C) Isolado UFLA 1101 e (1 a 4) testemunha, kanamicina norfloxacina e ácido pipemídico respectivamente; D) Triadimenol com o isolado UFLA 6200 (1-6: doses de 37,5 a 600 ppm); E) Pencycuron e isolado UFLA 6200 (1-6: doses de 93,75 a 1500 ppm).

3.3 Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a fungicidas recomendados para a cultura do algodão

Os 10 isolados de Xam expostos aos fungicidas triadimenol e pencycuron apresentaram crescimento semelhante à testemunha, sendo considerados, portanto insensíveis a eles (Figura 1). Mehta, Bomfeti &

Bolognini (2005) também observaram que estes fungicidas não inibiram o crescimento de Xam. Entretanto, Dezordi (2006), verificou alteração no crescimento de Xam quando expostos ao fungicida pencycuron a partir de 50 µg/mL. Frare (2005) selecionou os fungicidas benomil e triadimenol como constituintes do meio semi-seletivo para o isolamento direto de *Acidovorax avenae* subs. *citrulli* de sementes de melão.

Os fungicidas carbendazin e tolifluanida inibiram o crescimento de Xam nas dosagens utilizadas no presente estudo (Tabela 3), sendo a inibição por tolifluanida observada a partir de 50 µg/mL. Portanto, esses fungicidas não podem ser usados na confecção de meios semi-seletivos para Xam.

3.4 Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* à exposição simultânea a antibióticos e fungicidas

O crescimento *in vitro* dos diferentes isolados de Xam na presença de diferentes combinações e dosagens de antibióticos e fungicidas se encontram na Tabela 4. Apenas o isolado IAPAR 11999 não se desenvolveu normalmente nas concentrações avaliadas, principalmente nas maiores dosagens do fungicida triadimenol e do antibiótico cefadroxil (Tabela 4).

Os antibióticos cefalexina e cefadroxil estão presentes na composição de vários meios de cultura semi-seletivos utilizados na detecção de fitobactérias (Soares, Valarini & Menten, 2001; Roumagnac, Gagnevin & Pruvost, 2000). O fungicida clorotalonil apresenta amplo espectro de ação sobre fungos associados às sementes (Machado, 2000), sendo inclusive indicado por Maringoni & Kurosawa (1987) para substituir a cicloexamida, em meios semi-seletivos. A ciclohexamida, embora frequentemente recomendada para confecção de meios semi-seletivos, não é encontrada facilmente no mercado nacional e quando disponível é de custo elevado. O fungicida triadimenol, além de ser eficiente no

tratamento de sementes de algodão, foi eficiente no controle dos fungos saprófitas associados às sementes de algodão nos testes *in vitro* (Mehta et al., 2005; Dezordi, 2006).

TABELA 3 Fungicidas recomendados para a cultura do algodão sobre o crescimento *in vitro* de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.

Isolados	Fungicida*s																			
	Derosal 500 SC (carbendazim)					Monceren PM (pencicuron)					Euparen M 500 PM (tolifluanida)					Baytan FS (triadimenol)				
	20	50	100	200	400	93,75	187,5	375	750	1500	93,75	187,5	375	750	1500	37,5	75	150	300	600
IBSBF 1562	20	50	100	200	400	93,75	187,5	375	750	1500	93,75	187,5	375	750	1500	37,5	75	150	300	600
IBSBF 1038	+	-	-	-	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
IBSBF 1153	+	-	-	-	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
IBSBF 1913	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
IBSBF 1733	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
IBSBF 1779	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
IBSBF 1953	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
UFLA 1102	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
UFLA 6500	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++
IBSBF 555	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++

*Concentrações referentes à dose aproximada do ingrediente ativo recomendado para uso agrícola (Agrofit, 2007).

+ pouco crescimento; ++ crescimento abundante; - nenhum crescimento.

TABELA 4 Inibição do crescimento *in vitro* de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* por diferentes combinações e concentrações de antibióticos e fungicidas adicionados ao meio 523.

Tratamentos	Isolados					
	UFLA 1101	IAPAR 13858	IB 1733	IB 1038	IB 1779	IAPAR 11999
CL+CD(25)+Cl(10)+TR(75)	+	+	+	+	+	+
CL+CD(25)+Cl(10)+TR(150)	+	+	+	+	+	+
CL+CD(25)+Cl(10)+TR(300)	+	+	+	+	+	±
CL+CD(50)+Cl(10)+TR(75)	+	+	+	+	+	+
CL+CD(50)+Cl(10)+TR(150)	+	+	+	+	+	±
CL+CD(50)+Cl(10)+TR(300)	+	+	+	+	+	±
CL+CD(100)+Cl(10)+TR(75)	+	+	+	+	+	-
CL+CD(100)+Cl(10)+TR(150)	+	+	+	+	+	±
CL+CD(100)+Cl(10)+TR(300)	+	+	+	+	+	±
Testemunha	+	+	+	+	+	+

CL = cefalexina; CD = cefadroxil; Cl = clorotalonil; TR = triadimenol; (10, 25, 50, 75, 150, 300 = µg/mL); IS = isolados; (+) crescimento de Xam semelhante a testemunha; (±) pouco crescimento; (-) ausência de crescimento.

3.5 Índice de repressão do crescimento *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* pelo meio 523 modificado

O meio semi-seletivo proposto neste trabalho não só permitiu o crescimento de Xam, como também favoreceu o maior desenvolvimento em relação ao meio 523, como observado nos valores negativos de IR (Tabela 5). No meio 523 modificado foi observado menor índice de repressão quando

comparado aos meios NSA modificado (Dezordi, 2006) e PSA modificado (Mehta, Bomfeti & Bolognini, 2005). O tamanho das colônias foi ligeiramente reduzido no meio 523 modificado com relação ao meio 523, provavelmente porque Xam não utiliza manitol como fonte de carbono (Cia, 1972).

TABELA 5 Número de unidades formadoras de colônia (UFC) e repressão do crescimento *in vitro* de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* nos meios 523 e 523 modificado.

Isolados	Meios de cultura		Repressão (%)
	523 modificado	523	
IB 1880	1 x 10 ^{8*}	8 x 10 ⁷	125
UFLA 6200	5 x 10 ⁷	1,7 x 10 ⁸	29
IB 1733	1,1 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸	100
IB 1913	1,9 x 10 ⁸	2,1 x 10 ⁸	90
IB 1954	1,5 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	150
IB 1562	1,6 x 10 ⁸	1,3 x 10 ⁸	123

* Unidades formadoras de colônia/ mL.

3.6 Índice de supressão à microbiota associada às sementes de algodão pelo meio 523 modificado

O meio semi-seletivo proposto neste trabalho não inibiu totalmente a microbiota associada às sementes de algodão presente no lote analisado. Houve crescimento fúngico e bacteriano apenas no extrato e na diluição 10⁻¹. O meio

523 modificado suprimiu satisfatoriamente o número de organismos contaminantes na amostra (Tabela 6).

TABELA 6 Índice de supressão de contaminantes em amostra de sementes de algodão em meio 523 modificado e no meio 523.

Diluições	Meio		
	523	PSA	NSA
Extrato puro	95*	96	96
10 ⁻¹	98	99	99
10 ⁻²	100	100	100

4 CONCLUSÃO

- O meio 523 de Kado & Heskett (1970) modificado, 30 g manitol, 4 g de extrato de levedura, 8 g de caseína hidrolizada, 2 g de K_2HPO_4 , 0,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g agar, 1000 mL água destilada, com adição, após autoclavagem de, 50 mg de cefalexina, 25 mg de cefadroxil, 10 mg de clorotalonil e 150 μL de triadimenol, permite o isolamento e a detecção de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. **Consulta de Praga**.

Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em: 20 mar. 2007.

ALVAREZ, A. M.; LOU, K. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 12, p. 1082-1086, Dec. 1985.

DEZORDI, C. **Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2006. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

FRARE, V. C. **Desenvolvimento de um meio semi-seletivo para a detecção de *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli* em sementes de melão (*Cucumis melo* L.)**. 2005. 67 p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

KADO C. I.; HESKETT, MG. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 5, p. 969–976, June 1970.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138 p.

MARINGONI, A. C.; KUROZAWA, C. Efeito de captan, chlorothalonil, ciclohexanida e thiram em isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye de tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.14, n. 1/2, p. 107-16, jan.jun. 1987.

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

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

ROMEIRO, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa, MG: UFV, 2001.

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

ROUMAGNAC, P.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Detection of *Xanthomonas* sp. the causal agent of onion bacterial blight, in onion seeds using a newly developed semi-selective isolation medium. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, n. 9, nov. 2000.

SCHAAD, N.W. Detection and identification of bacteria. In: SAETLLER, A. W.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. Minneapolis: APS Press, 1989. 122 p.

SILVA, M.R. **Comparação da eficiência de meios semi-seletivos para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro**. Viçosa. 2002. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) –Universidade Federal de Viçosa, MG.

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.

WANG, Z. K.; COMSTOCK, J. C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N. W. Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA, and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 245–52, Apr. 1999.

CAPÍTULO 5

DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* EM SEMENTES DE ALGODÃO

RESUMO

BARBOSA, Juliana Franco. **Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão.** 2007. p. 114-133. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de Concentração Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.*

A mancha angular é umas das principais doenças do algodão. A semente é o principal veículo de introdução da doença na lavoura. A bactéria, *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), está associada à semente tanto interna quanto externamente. Desta forma, há a necessidade de métodos sensíveis de detecção da bactéria na semente. O método de detecção deve ser eficiente quanto à recuperação do patógeno alvo, reproduzível e de baixo custo. Neste estudo, sementes de algodão artificialmente inoculadas foram utilizadas para comparar a eficiência de meios de cultura semi-seletivos na detecção de Xam. Foram utilizados os meios de cultura descritos por Metha et al., (2005), Dezordi (2006) e o meio 523 modificado, na detecção de uma única semente contaminada por Xam em amostras de sementes de algodão (1000 sementes). Foi testada também a eficiência da técnica de imunofluorescência indireta. Foram utilizados 3 tipos de extrato de sementes, o extrato bruto, o extrato centrifugado e o extrato filtrado em membrana Millipore®. Todos os meios utilizados neste estudo foram eficientes na recuperação de Xam em sementes. A incidência foi maior nas sementes com desinfestação superficial. Foi possível verificar a presença de Xam em todos os extratos avaliados pela técnica de imunofluorescência.

* Comitê orientador: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Orientador), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Co-orientadora), José da Cruz Machado – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

BARBOSA, Juliana Franco. **Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in cotton seeds.** 2007. p. 114 - 133. Thesis (Doctorate in Agronomy/Plant Pathology) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The bacterial blight is one of the most important cotton diseases. The seed is the main vehicle of disease introduction in the crop. The bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) is associated with the seed both internally and externally. Thus, the development of sensible methods for the detection of the bacterium in the seed is an important issue. The detection method should be efficient as to the recovering of the target pathogen, reproducible and of low cost. In this study, artificially inoculated cotton seeds were used to compare the efficiency of semi-selective culture media on the detection of Xam. The culture media described by Metha et al., (2005), Dezordi (2006) and the 523 modified medium, were able to detect only one Xam contaminated seed in samples of 1000 seeds. The efficiency of the indirect immunofluorescence technique was also tested. Three types of seed extracts: crude, centrifuged and filtered in Millipore® membrane ones were tested. All media used in this study were efficient in recovering of Xam from the seeds. A higher Xam incidence was observed in superficially disinfested seeds. Xam was found in all extracts analyzed through the immunofluorescence technique.

* Advising committee: Ricardo Magela de Souza – UFLA (Adviser), Antonia dos Reis Figueira – UFLA (Co-adviser), José da Cruz Machado – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

A mancha angular está amplamente distribuída em todas as regiões onde se cultiva o algodão. Os sintomas da doença estão distribuídos por toda a planta, exceto nas raízes. As maçãs podem ser severamente atacadas e também cair, ou moderadamente atacadas, apresentando pequenas manchas deprimidas e encharcadas que resultaram na infecção das sementes. A bactéria, *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), permanece na semente por vários anos (Brinkerhoff & Hunter, 1963). Vários métodos já foram utilizados para a eliminação da bactéria das sementes, entretanto, nenhum apresentou controle satisfatório, assim a semente ainda é a principal fonte primária de inóculo no campo

Atualmente, a mancha angular do algodão, é controlada com o uso de cultivares resistentes. No entanto, os produtores ainda utilizam materiais suscetíveis devido à alta produtividade (Morello et al., 2006). Dessa forma, como a bactéria é veiculada pela semente e também sobrevive em restos culturais (Drumond, 1957), há a necessidade de métodos sensíveis de detecção nas sementes.

O método de detecção deve ser eficiente quanto à recuperação do patógeno alvo, reproduzível e de baixo custo. Duas metodologias básicas de detecção são descritas por Schaad (1989). A direta, onde o patógeno alvo é detectado sem o processo de extração, como descrito por Halfon-Meiri & Volcani, (1977) para detecção de *Colletotrichum* e Xam em sementes de algodão e, a indireta em que se faz a extração da bactéria para posterior detecção. Para esse tipo de metodologia as células bacterianas podem estar viáveis ou não. No processo de extração em que as células bacterianas estão viáveis a detecção é feita por inoculação do extrato das sementes em plantas indicadoras (Oliveira,

1995) ou pelo plaqueamento em meios seletivos e semi-seletivos (Schaad, 1988). No processo indireto em que a bactéria não precisa estar viva, pode ser por meio de técnicas moleculares e sorologia (Wang et al., 1999).

Vários métodos sorológicos já foram descritos para a identificação e detecção de fitobactérias, como ELISA, teste de aglutinação em lâminas e imunofluorescência (Chitarra, 2006). A técnica de imunofluorescência permite a ligação de um composto fluorescente ao anticorpo. Quando submetido à luz ultravioleta torna-se fluorescente, permitindo assim a visualização do anticorpo homólogo (Almeida & Lima, 2001). Esta técnica é utilizada para a identificação de isolados bacterianos, na diagnose de doenças de etiologia bacteriana, bem como na detecção de bactérias em sementes e materiais propagativos (De Boer, 1990).

Para a detecção de Xam em sementes de algodão foram descritos dois meios semi-seletivos: o de Mehta, Bomfeti & Bolognini (2005), utilizado para o isolamento de Xam por meio do plaqueamento direto da semente no meio semi-seletivo e o de Dezordi (2006), cuja detecção é a partir do extrato da semente.

Deste modo, o objetivo neste trabalho foi estabelecer uma metodologia adequada para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia e de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

2.1 Origem e perfil do lote de sementes

Foram utilizadas sementes de algodão da cultivar Makina, safra 2004/2005, fornecidas pela empresa Syngenta Seeds Ltda (Matão / SP) e sementes artificialmente inoculadas com Xam por restrição hídrica, como descrito no capítulo 2. As sementes foram armazenadas em câmara fria até o início dos experimentos.

2.2 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes

Para a detecção de Xam, sementes inteiras desinfestadas ou não com hipoclorito de sódio, foram colocadas sobre os meios de cultura semi-seletivos: 523 de Kado & Heskett (1970) e 523 modificado, meio de Mehta, Bomfeti & Bolognini (2005) e meio de Dezordi (2006).

- **Mehta et al. (2005):** 0.35 g Ca (NO₃), 0.35 g FeSO₄, 1.4 g Na₂HPO₄, 3.5 g peptona, 14.0 g sacarose, 10.5 g bacto-agar, 700 ml água destilada, pH 6.8, após a autoclavagem adicionar cicloeximida (Sigma) 100 mg (2 ml solução estoque 500 mg em 10 ml de ácool 75%); cefalexina (Sigma) 10 mg (1 ml solução estoque 100 mg in 10 ml de ácool 75%); pencycuron 0.05 g (Monceren PM, Bayer S.A.); triadimenol 1 ml (Baytan SC, Bayer S.A.); tolylfluanid

(Euparen 500PM, Bayer S.A.) (1 ml solução estoque 0.125 g em 10 ml água destilada).

- **Dezordi (2006):** 3 g extrato de carne, 5 g de peptone, 15 g agar, 1000 mL de água destilada; 0,25 g CaCl₂, 10 g de amido solúvel, 10 µL de Tween 80, 150 µL de solução cristal violeta (1%), 50 mg de cefalexina, 10 mg clorotalonil, 10 mg tiofanato metílico.

- **Meio 523 modificado:** 30 g de manitol, 4 g de extrato de levedura, 8 g de caseína hidrolizada, 2 g de K₂HPO₄, 0,15 g MgSO₄, 15 g agar, 1000 mL água destilada, após autoclavagem adicionar, 50 mg de cefalexina, 50 mg de cefadroxil, 10 mg de clorotalonil e 300 µL de triadimenol.

Foram colocadas 10 sementes artificialmente inoculadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 20 µL de cada um dos meios descritos acima, em cinco repetições. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado e os dados analisados em esquema fatorial 4x3 (4 meios x 2 métodos). Para a análise estatística, os dados, obtidos em porcentagem de incidência de sementes contaminadas com Xam, foram transformados em $(x+0,5)^{1/2}$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

2.3 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em extrato de sementes

Para a detecção de uma única semente contaminada por Xam em amostras de sementes de algodão, foram utilizadas quatro repetições de mil sementes. As sementes foram pesadas e foi retirada uma única semente, sendo esta substituída por uma semente artificialmente contaminada com Xam, pela técnica de restrição hídrica. Para o tratamento testemunha foram utilizadas quatro repetições de mil sementes sadias. As sementes foram colocadas em erlenmyers (500 mL) contendo 240 mL de água esterilizada. A quantidade de

água foi calculada baseada na fórmula, $mL=(1,9 \times \text{peso de } 1000 \text{ sementes em g}) + 50$ (Van Vuurde & Van den Bovenkamp, 1989). Os erlenmeyers contendo as sementes foram mantidos em geladeira por 18 horas.

Após o período de incubação, o extrato foi diluído em série, 10^{-1} e 10^{-2} e plaqueado no meio de cultura 523 modificado, 523 (Kado & Heskett, 1970), PSA (Mehta, Bomfeti & Bolognini, 2005), e NSA (Dezordi, 2006). Foram utilizadas duas placas por diluição. A avaliação consistiu na contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por placa, em esquema fatorial 4x2 (4 meios x 2 diluições).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso e para a análise estatística as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

2.4 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* por imunofluorescência

Para a detecção de Xam em sementes de algodão foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta. Foram utilizados 2 tipos de extrato de sementes além do extrato bruto obtido no item anterior. Foram retirados de cada repetição, 12 mL para obtenção do extrato centrifugado e 10 mL para serem filtrados em membrana Millipore®:

Para a obtenção do centrifugado, os extratos foram colocados em tubos de ensaio e centrifugados a 7000 rpm à temperatura ambiente. O pellet foi ressuspenso em 2 mL de água ultra-pura e armazenados em tubos eppendorfs e para o filtrado, os extratos foram filtrados em membrana Millipore® 0,22 μ M de poro. Após a filtração a membrana foi lavada por pipetagem de 2 mL de água ultra-pura e a suspensão armazenada em tubos eppendorfs.

Para a detecção de Xam nos três tipos de extratos citados, foi utilizado antissoro policlonal obtido a partir da imunização de coelho com um isolado de Xam. O soro de Xam foi cedido pelo Dr. Luís Otávio S. Beriam do Instituto Biológico de Campinas. O soro de Xam foi ligado ao anti-rabbit IgG conjugado com FITC (Sigma, F 6005). Após a ligação do soro com o conjugado fluorescente, a lâmina pôde ser visualizada ao microscópio de fluorescência devidamente equipado e apropriado. O protocolo de montagem das lâminas foi segundo Vuurde & Bovenkamp (1989):

- 1 Foi utilizado um isolado de Xam (controle positivo) e um isolado de *X. campestris* pv. *campestris* (controle negativo); os isolados foram cultivados em meio 523 em placas de Petri em BOD a 28°C por 24 horas.
- 2 Após o período de incubação preparou-se suspensão bacteriana na concentração de 10⁷ UFC/mL de cada isolado.
- 3 Em uma lâmina de imunofluorescência com 24 alvéolos (Nutacon 30-342), colocou-se 30 µL tanto da suspensão bacteriana, quanto dos três tipos de extrato descritos anteriormente. Para cada tipo de extrato e controle, foram utilizadas duas repetições, sendo representados por dois alvéolos da lâmina de imunifluorescência.
- 4 As lâminas foram colocadas em contato com o ar quente de um secador de cabelo, para a fixação das células bacterianas.
- 5 As lâminas foram lavadas em etanol 96% por 10 minutos.
- 6 Após a lavagem com etanol, seguiu-se novamente com a lavagem em água destilada esterilizada por três vezes de 1 minuto.
- 7 O excesso de água foi retirado com o auxílio do secador de cabelo.
- 8 Colocou-se 30 µL /alvéolo do antissoro de Xam (título 1:32) previamente diluído em 0,01 M PBS, pH, 7,2.
- 9 As lâminas foram colocadas dentro de uma placa de Petri contendo um pedaço de algodão umedecido (câmara úmida) por 30 minutos.

- 10 Após o período em câmara úmida as lâminas foram lavadas por três vezes em tampão de lavagem (PBS 0,001M).
 - 11 As lâminas foram secas com o ar quente de um secador de cabelo.
 - 12 Adicionou-se o IgG anti-rabbit conjugado com FITC (Sigma, F 6005), previamente diluído (título 1:200).
 - 13 As lâminas foram incubadas em câmara úmida no escuro, por 30 minutos à temperatura ambiente.
 - 14 Seguiu-se de lavagem das lâminas duas vezes em tampão PBS 0,001M, por 5 minutos cada vez.
 - 15 As lâminas foram lavadas em água destilada, por um minuto e secas com o ar quente de um secador de cabelo.
 - 16 Colocou-se uma gota do tampão PBS com glicerina no centro da lâmina e cobriu-se com uma lamínula apropriada.
 - 17 As lâminas foram seladas com esmalte e examinadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 60. As imagens foram capturadas pelo programa Pro-Plus versão 4.5 (Media Cybernetics).
- A avaliação consistiu na presença de células de Xam fluorescentes em cada extrato, comparadas aos controles positivos e negativos.

3 RESULTADOS

3.1 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes inteiras de algodão

Na detecção de Xam utilizando sementes inteiras em meios de cultura semi-seletivos, a interação entre meios e sementes desinfestadas, ou não, foi significativa (Tabela 1). A incidência foi maior nas sementes com desinfestação superficial. A desinfestação reduz o número de microrganismos saprófitas, facilitando a detecção de Xam. Tebaldi (2007) não observou diferença entre sementes de feijão desinfestadas ou não, no isolamento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

TABELA 1 Detecção de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (%), em sementes inteiras de algodão, com e sem desinfestação.

Desinfestação de sementes	Detecção (%)*
Com	58,5 a
Sem	39,5 b

*Dados transformados em $(x+0,5)^{1/2}$

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). CV (%) = 20,69.

Todos os meios utilizados foram eficientes na detecção de Xam tanto em sementes desinfestadas quanto não desinfestadas (Tabela 2). Mehta, Bomfeti & Bolognini (2005) detectaram baixa porcentagem de infecção (0,05%) em lotes comerciais de sementes de algodão, após desinfestação superficial e plaqueamento das sementes inteiras em meio de cultura semi-seletivo.

A desinfestação superficial das sementes favoreceu o isolamento de Xam, até mesmo no meio 523 sem a adição de antibióticos e antifúngicos. Vilas Boas, Sbalchero & Denardin (2006) detectaram Xam em sementes de algodão com línter, armazenadas por dois anos, utilizando o meio 523. No entanto, não foi possível recuperar Xam de sementes sem desinfestação superficial no referido meio. Para a detecção de Xam em macerado de sementes, Dezordi (2006) não fez a desinfestação das sementes. Segundo Schaad & Kendrick, (1975) a desinfestação superficial além de eliminar a microflora associada à semente, também pode eliminar o patógeno alvo. O meio 523 modificado foi eficiente na recuperação de Xam de sementes, não diferindo dos demais meios semi-seletivos, tanto para sementes desinfestadas, quanto não desinfestadas.

TABELA 2 Detecção de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes inteiras de algodão, com e sem desinfestação superficial, em 4 meios de cultura, em porcentagem de incidência.

Meios	Desinfestação de sementes*	
	Com	Sem
Mehta et al. (2005)	72 ¹ a	36 a
Dezordi (2006)	48 a	56 a
523 modificado	66 a	66 a
523	48 a	0 b

*Dados transformados em $(x+0,5)^{1/2}$

¹Porcentagem de infecção

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). CV (%) = 20,69.

A escolha de um método de detecção depende da eficiência e sensibilidade na recuperação do patógeno alvo, da reprodutibilidade e da disponibilidade do material necessário para cumprir as etapas relacionadas

(Oliveira, 1995). Da mesma forma, a escolha de um meio de cultura depende além desses requisitos, ser de baixo custo e de fácil preparo. Normalmente, o preparo de meios semi-seletivos é mais laborioso do que os meios de cultura utilizados na rotina dos laboratórios para o isolamento e preservação de bactérias. Para tanto, são necessárias etapas de preparo de soluções estoque, filtragem e esterilização de antibióticos e compostos antifúngicos a serem incluídos ao meio.

Todos os meios utilizados neste estudo foram eficientes na recuperação de Xam em sementes. No entanto, o meio descrito por Metha, Bomfeti & Bolognini (2005) utiliza cicloeximida que é um composto de custo elevado para ser utilizado na rotina de um laboratório. O meio descrito por Dezordi (2006) foi o que apresentou a menor porcentagem de detecção de Xam em sementes desinfestadas, neste trabalho. Vale a pena ressaltar que o meio não foi descrito para a detecção de sementes inteiras em meio de cultura.

O meio 523 modificado neste trabalho, não diferiu estatisticamente dos demais. É um meio comumente utilizado na rotina de vários laboratórios para isolamento não só de espécies do gênero *Xanthomonas*, mas também de outros gêneros de fitobactérias (Kado & Heskett, 1970). A adição do manitol retardou a protrusão radicular das sementes, sem alterar a eficiência na recuperação de Xam, facilitando a sua detecção em sementes.

3.2 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em extratos de sementes

Para a metodologia utilizada neste estudo, a recuperação de Xam nos meios avaliados não foi satisfatória. Novos testes deverão ser realizados quanto

ao tamanho da amostra, o plaqueamento do extrato sem diluições e a utilização de lotes naturalmente infectados.

3.3 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* por imunofluorescência

Foi possível verificar a presença de Xam em todos os extratos avaliados (Figura 1), entretanto nos extratos bruto e centrifugado foram observados os maiores números de impurezas na amostra, o que dificultou a contagem das células. Tebaldi (2005) utilizou as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) em extrato de sementes de feijão. Neste trabalho a autora verificou nas diluições de 10^{-2} e 10^{-3} que as impurezas do extrato foram eliminadas, facilitando a contagem das células de Xap.

O extrato filtrado em membrana de Millipore® foi o que proporcionou os melhores resultados, no presente estudo. No entanto há a necessidade de estudos para estabelecer a melhor diluição para contagem das células.

Não foi verificada a presença de células bacterianas fluorescentes em sementes sadias, bem como, nos alvéolos com suspensão de *X. campestris* pv. *campestris*.

O sucesso da técnica de imunofluorescência, assim como em ELISA, depende da especificidade dos anticorpos os quais devem ser testados antes de serem usados e que, preferencialmente, não ocorram reações cruzadas com outras bactérias presentes na amostra (Chitarra, 2006).

A técnica de imunofluorescência indireta foi eficiente para a detecção de Xam em extrato de sementes. Esta metodologia é rápida, sendo necessário um dia para preparo das amostras e um dia para leitura das lâminas. É necessário, no entanto, verificar a eficiência da técnica em lotes comerciais de sementes. Não foi possível neste teste quantificar o número de células de Xam por amostra. De

Boer (1990) relata que a sensibilidade da técnica de imunofluorescência é de 10^3 células/mL.

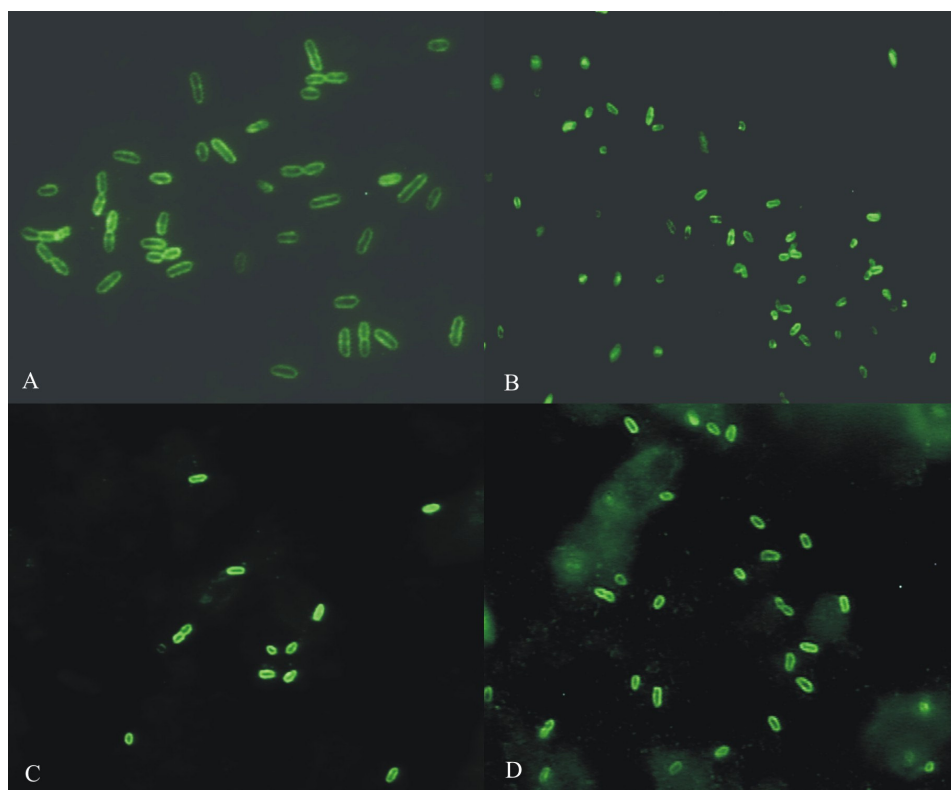


FIGURA 1 Células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) por imunofluorescência. A) Células de Xam em suspensão bacteriana, B) Células de Xam em extrato centrifugado de sementes; C) Células de Xam em extrato bruto de sementes; D) Células de Xam em extrato filtrado de sementes.

A presença de *X. fastidiosa* foi detectada em diferentes espécies de *Coffea* e híbridos de *C. arabica* pelo teste de imunofluorescência (Yorinori et al., 2003). Neste trabalho os autores verificaram que a técnica de

imunofluorescência foi mais eficiente que o teste de DAS-ELISA. A imunofluorescência está entre as técnicas mais sensíveis para detecção de bactérias, com nível de sensibilidade até 1.000 vezes superior ao teste de DAS-ELISA (Saettler et al., 1989). No entanto, essa técnica tem algumas limitações: 1) não fornece informações sobre a patogenicidade dos isolados; 2) depende da qualidade do anticorpo; 3) não discrimina entre células viáveis e não-viáveis; 4) o exame das lâminas deve ser feito por técnicos especializados (Chitarra, 2006).

4 CONCLUSÕES

- Os meios semi-seletivos de Mehta, Bomfeti & Bolognini (2005), Dezordi (2006) e o meio 523 modificado foram eficientes na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes artificialmente inoculadas;
- A desinfestação superficial facilita a detecção da bactéria quando as sementes são colocadas diretamente sobre o meio de cultura.
- A técnica de imunofluorescência indireta foi eficiente na detecção de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* em extratos de sementes.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.M. R.; LIMA, J. A. A. Técnicas sorológicas aplicadas a fitovirologia. In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja/Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2001. 186 p.

BRINKERHOFF, L. A.; HUNTER, R. E. Internally infected seed as a source of inoculum for the primary cycle of bacterial blight of cotton. **Phytopathology**, St. Paul, v. 53, n. 12, p. 1397-1401, Dec. 1963.

CHITARRA, L. G. Métodos para detecção e avaliação da viabilidade de bactérias em sementes: vantagens e desvantagens. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 9., 2006, Passo Fundo. **Resumos...** Passo Fundo: UPF, 2006. v. 1.

DE BOER, S. H. Immunofluorescence for bacteria. In: HAMPTON, R. O., BALL, E. M.; DE BOER, S. H. (Eds.). **Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens**. St. Paul: MN. APS Press, 1990. p.2 95-298.

DEZORDI, C. **Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)**, 2006. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

DRUMOND, O. A. Doenças do algodoeiro. In: CONGRESSO ESTADUAL DE ALGODÃO, 1., 1957, Montes Claros. **Anais...** Montes Claros, 1957. 348 p.

HALFON-MEIRI, A.; VOLCANI, Z. A combined method for detecting *Colletotrichum gossypii* and *Xanthomonas malvacearum* in cotton seed. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 5, n. 1, p. 129-139, 1977.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-76, June 1970.

MEHTA, Y. R.; BOMFETI, C.; BOLOGNINI, V. A semi-selective agar 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, set./out. 2005.

MORELLO, C. L.; FARIAS, F. J. C.; SILVA FILHO, J. L. da; FREIRE, E. C. **Cultivares do Algodoeiro para o Cerrado**. Campina Grande: CNPA/EMBRAPA, 2006. 8 p. (Circular Técnica, 93). Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/publicacoes/2006/CIRTEC93.pdf>>.

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

SAETTLER, A.W. The need for detection assays. In: SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N. W. E.; ROTH, D. A. (Eds.). **Detection of Bacteria in Seed**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1989. p. 1–2.

SCHAAD, N. W. Detection and identification of bacteria. In: SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D. A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. Minneapolis: APS Press, 1989. 122p.

SCHAAD, N. W. Inoculum thresholds of seedborne pathogens. **Bacteria. Phytopathology**, v. 78, p. 872-875, June 1988.

SCHAAD, N. W.; KENDRICK, R. A quantitative method for detecting *Xanthomonas campestris* in crucifer seed. **Phytopathology**, St. Paul, v. 65, n. 9, p. 1034-1036, Sept. 1975.

TEBALDI, N. D. **Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão e aspectos epidemiológicos do cretamento bacteriano comum**. 2005. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TEBALDI, N. D.; SOUZA, R. M.; MACHADO, J. C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi seletivo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 56-58, jan./fev. 2007.

VUURDE, J. W. L. van; BOVENKAMP, G. W. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean. In: SAETTLER, A. W.; SCHAAD, N. W.; ROTH, D. A. (Eds.). **Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material**. St. Paul, 1989. p.30-40.

VILAS BÔAS, F. S.; SBALCHEIRO, C. C.; DENARDIN, N. D. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro com línter e sem línter armazenadas por dois anos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 9., 2006, Passo Fundo. **Resumos...** Passo Fundo: UPF, 2006. v. 1.

WANG, Z. K.; COMSTOCK, J. C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N. W. Comparison of PCR, Bio-PCR, DIA, ELISA, and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, Brasília, v. 48, n. 4, p. 245–52, Feb. 1999.

YORINORI, M. A.; RIBAS, A. F.; UENO, B.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; LEITE JÚNIOR, R. P. Detecção de *Xylella fastidiosa* em germoplasma de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 427-430, July 2003.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu o desenvolvimento de técnicas de inoculação e detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) em sementes de algodão. Comprovou-se que sacarose e manitol podem ser utilizados como solutos na inoculação da bactéria pela técnica de restrição hídrica. Observou-se que o meio de cultura contendo sacarose, estimula o desenvolvimento de fungos internos às sementes provocando a morte de plântulas. Este fato foi comprovado por eletromicrografias realizadas no MEV, as quais revelaram a presença de hifas fúngicas bem como de Xam associada à tegumento das sementes. Portanto, optou-se pelo manitol, um açúcar mais seletivo, como soluto a ser utilizado nos experimento com condicionamento osmótico no presente trabalho.

A inoculação por condicionamento osmótico foi eficiente e o tempo de 24 horas de exposição à bactéria permitiu obter sementes com alta incidência, sendo esta metodologia mais eficiente do que o contato das sementes com suspensão bacteriana.

Variabilidade entre isolados quanto aos sintomas em plantas de algodão inoculadas foram observadas, permitindo a separação em três grupos distintos. Para a reação de HR, plantas de tomateiro foram as mais indicadas para a utilização na identificação de isolados patogênicos de Xam.

Os primers REP e ERIC diferenciaram Xam de outras espécies bacterianas. As técnicas moleculares são amplamente utilizadas por causa de sua eficiência e rapidez nos resultados. Deve-se continuar a busca por primers específicos que detectem Xam de extrato de semente.

Outras técnicas de detecção verificadas neste estudo foram o plaqueamento em meio semi-seletivo e a imunofluorescência. Os meios já descritos para a detecção de Xam em sementes foram eficientes, assim como o meio 523 modificado. A imunofluorescência é uma técnica rápida e sensível na

detecção da bactéria em extrato de sementes, sendo necessário, no entanto, o uso de microscópio de fluorescência e um profissional especializado.