

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA,
MOLECULAR E VIRULÊNCIA
DE ISOLADOS DE
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli*
E SUA VARIANTE *fuscans***

BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA

1999

BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, MOLECULAR
E VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* E SUA VARIANTE *fuscans***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Ricardo Magela de Souza

CDD-632.26332

MINA

- - BRASIL

1999

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

Halfeld Vieira, Bernardo de Almeida

Caracterização fisiológica, molecular e virulência de isolados de
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans* / Bernardo de
Almeida Halfeld Vieira. – Lavras : UFLA, 1999.

84 p. : il.

Orientador: Ricardo Magela de Souza.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Xanthomonas axonopodis*. 2. Feijão. 3. Virulência. 4. Característica
fisiológica. 5. Característica molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD-635.56232


BERNARDO DE ALMEIDA HALFELD VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, MOLECULAR
E VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* E SUA VARIANTE *fuscans***

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

APROVADA em 19 de março de 1999

Prof. ^a . Dr. ^a . Antônia dos Reis Figueira	UFLA
Prof. Dr. Vicente de Paulo Campos	UFLA
Dr. ^a . Alessandra de Jesus Boari	UFLA


Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
Departamento de Fitopatologia/UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, Bernardo e Maria Regina
que sempre me apoiaram, acreditando e incentivando meu progresso,**

A minha irmã Adriana, Pedro e meu sobrinho Miguel,

A Kátia, pelo companheirismo durante todo este tempo,

**A todos aqueles que, direta ou indiretamente,
sempre estiveram ao meu lado.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os colegas que passaram por minha vida acadêmica e pessoal, assim como a meus mestres, que conduziram minha carreira profissional durante meu aprendizado. Pelas oportunidades oferecidas por todos aqueles que acreditaram em meu trabalho e dedicação.

Ao professor Dr. Ricardo Magela de Souza, que acreditou e confiou em mim e na condução de meus trabalhos, sempre acessível a discutir e opinar sobre as mais diversas questões que, sem dúvida, enriqueceram e muito para ampliação de meus horizontes.

À professora Dr^a. Antônia dos Reis Figueira, pelo incansável apoio e sugestões, além de toda orientação, com papel de grande importância na realização deste trabalho.

Ao saudoso Professor Dr. Osamu Kimura que me iniciou na ciência da Fitopatologia, uma pessoa fabulosa que indubitavelmente deixou conosco preciosas contribuições principalmente na área da Bacteriologia de Plantas.

Ao pesquisador Dr. Wagner Bettiol, que incentivou a pesquisa no campo do controle biológico de doenças de plantas, transmitindo experiências e propondo trabalhos práticos que contribuíram para a formação de uma visão crítica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa, propiciando meu treinamento e aprendizado.

A Ana Maria dos S. Castro, sempre incentivando, opinando e apoiando minhas decisões.

A todos os professores do DFP/UFLA, pelos ensinamentos oferecidos.

Aos que gentilmente doaram os isolados para este trabalho.

Às técnicas de laboratório Eloisa G. Leite e Terezinha.

Ao pessoal de apoio Carlos e Sérgio, pelas ajudas e sugestões.

Ao professor de meteorologia Dimitrie Nechet (UFPA), pelo fornecimento dos dados climatológicos.

Aos colegas de laboratório Alexandre e Tiago pelo companheirismo.

Aos amigos: Alessandra K. Nakasone, Claudine M. Carvalho, Cleber Maximiano, Edwin C. Palomino, Eneida S. Ilarráz, Flávio H. R. Moraes, Frederico A. de Oliveira, João Luis Coimbra, Leimi Kobayasti, Mauro K. Kimura, Mirian F. Borges, Otniel Freitas Filho, Viviane Talamini, *Wirton* Coutinho.

A Di Lourdes, Patrícia e Leísa, pelo apoio prestado pela secretaria.

Muito Obrigado !

BIOGRAFIA

Bernardo de Almeida Halfeld Vieira, filho de Bernardo Halfeld Vieira e Maria Regina de Almeida Halfeld Vieira, nascido em Curitiba, no Estado do Paraná em 8 de março de 1972. Graduou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/UFRRJ, em 12 de outubro de 1996.

Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica sob orientação do Professor Dr. Osamu Kimura, estagiário na Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio de Janeiro/EMATER-Rio, Área de Extensão Rural/UFRRJ e Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro/PESAGRO-Rio.

No mesmo ano em que se graduou, iniciou o curso de mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Lavras/UFLA, sob orientação do Professor Dr. Ricardo Magela de Souza.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
CAPÍTULO 2: Virulência de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> e <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	14
1 RESUMO.....	15
2 ABSTRACT.....	16
3 INTRODUÇÃO	17
4 REFERENCIAL TEÓRICO	18
5 MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 Obtenção e conservação dos isolados	20
5.2 Preparo das mudas.....	21
5.3 Produção e preparo do inóculo.....	21
5.4 Inoculação das mudas.....	21
5.5 Delineamento experimental.....	22
5.6 Avaliação dos resultados.....	22

5.7 Teste de hipersensibilidade	22
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÕES	31
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO 3: Caracterização fisiológica de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> e <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	36
1 RESUMO.....	37
2 ABSTRACT.....	38
3 INTRODUÇÃO	39
4 REFERENCIAL TEÓRICO	40
5 MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1 Preparação dos isolados	43
5.2 Utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio.....	43
5.3 Relação com o oxigênio livre.....	43
5.4 Catalase.....	44
5.5 Crescimento mucóide em meio GYCA	44
5.6 Gram	45
5.7 Crescimento em meio de cultura contendo 0,02 e 0,1% de C.T.T.	45
5.8 Hidrólise do amido	45
5.9 Hidrólise da esculina.....	45
5.10 Hidrólise da gelatina	46
5.11 Oxidase	46

5.12 Produção de pigmento escuro em meio de cultura	46
5.13 Proteólise do leite	47
5.14 Temperatura máxima de crescimento	47
5.15 Capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono	47
5.16 Pigmento xanthomonadina	48
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	61
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
CAPÍTULO 4: Caracterização molecular de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> e <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	66
1 RESUMO	67
2 ABSTRACT	68
3 INTRODUÇÃO	69
4 REFERENCIAL TEÓRICO	70
5 MATERIAL E MÉTODOS	72
5.1 Preparação dos isolados	72
5.2 Preparo da reação de polimerase em cadeia	72
5.4 Eletroforese e fotodocumentação	73
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	79
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	82

1. ANEXO I. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 110

2. ANEXO II. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 115

3. ANEXO III. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 120

4. ANEXO IV. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 125

5. ANEXO V. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 130

6. ANEXO VI. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 135

7. ANEXO VII. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 140

8. ANEXO VIII. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 145

9. ANEXO IX. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 150

10. ANEXO X. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 155

11. ANEXO XI. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 160

12. ANEXO XII. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 165

13. ANEXO XIII. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 170

14. ANEXO XIV. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 175

15. ANEXO XV. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 180

16. ANEXO XVI. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 185

17. ANEXO XVII. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 190

18. ANEXO XVIII. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 195

19. ANEXO XIX. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 200

20. ANEXO XX. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 205

21. ANEXO XXI. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 210

22. ANEXO XXII. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 215

23. ANEXO XXIII. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 220

24. ANEXO XXIV. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 225

25. ANEXO XXV. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 230

26. ANEXO XXVI. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 235

27. ANEXO XXVII. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 240

28. ANEXO XXVIII. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 245

29. ANEXO XXIX. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 250

30. ANEXO XXX. PLAN DE MANEJO DEL RECURSO HÍDRICO DE LA CUENCA DEL RÍO TUMAYACOMA. 255

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A₆₀₀	Absorbância em comprimento de onda igual a 600 nm
AACPD	Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença
Crescim.	Crescimento
C.T.T.	Cloreto de Trifenil Tetrazólio
cv.	cultivar
Desenvolv.	Desenvolvimento
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Erw	<i>Erwinia sp.</i>
E.U.A.	Estados Unidos da América
GN	Gram Negative
GYCA	<i>Glucose, Yeast extract, CaCO₃, Agar</i>
HR	Hipersensibilidade
Máx.	Máxima
Pcic	<i>Pseudomonas cichorii</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRP	Precipitação (mm)
pv.	patovar
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
Rsol	<i>Ralstonia solanacearum</i>
S^a Clara	Santa Clara
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato EDTA
Temperat.	Temperatura
TMA	Temperatura Média Anual (°C)

TMAMa	Temperatura Média Anual Máxima (°C)
TMAMi	Temperatura Média Anual Mínima (°C)
TZCA	<i>Tetrazolium Chloride Agar</i>
u.f.c.	unidades formadoras de colônias
UR%	Umidade Relativa do ar (%)
var.	variante
<i>X. a.</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i>
<i>X. c.</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
Xap	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>
Xapf	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>
Xav	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Xavit	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vitians</i>
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
Xpass	<i>Xanthomonas</i> sp. pv. <i>passiflorae</i>
YNA	<i>Yeast Nutrient Agar</i>

RESUMO

HALFELD VIEIRA, B. de A. Caracterização fisiológica, molecular e virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. Lavras: UFLA, 1999. 84p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)*

Foram caracterizados 42 isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e de sua variante *fuscans*, baseando-se em suas virulências, características fisiológicas e moleculares, na busca de caracteres marcantes para identificação da bactéria. O estudo da virulência consistiu de inoculações em planta hospedeira suscetível (*Phaseolus vulgaris* cv. Carioca) podendo-se diferenciar nove grupos, e plantas não hospedeiras (*Capsicum annuum* cv. Agrônômico 10 G, *Lycopersicon esculentum* cv. S^a Clara e *Nicotiana tabacum* cv. Turkish NN), onde plantas de fumo e tomateiro foram mais adequadas para expressão da reação de hipersensibilidade, incitada pela bactéria. Investigou-se, também, possíveis relações entre virulência e origem dos isolados e capacidade de produzir melanina *in vitro*. Estudos fisiológicos, representados por provas bioquímicas, foram realizados a partir de uma bateria de 14 testes de rotina, além de um *screening* nutricional efetuado por 95 fontes exclusivas de carbono distintas, onde a combinação de resultados foi capaz de caracterizar com segurança os isolados de Xap e Xapf, com exceção de *X. sp. pv. passiflorae*, diferenciável somente pela virulência na planta hospedeira e pelo marcador molecular estudado. Foram eficientes, na caracterização dos isolados, a morfologia das colônias, de coloração amarelada, convexas ou lisas, Gram-negativas, aeróbias estritas, com padrão característico para pigmento xanthomonadina, o resultado positivo para proteólise do leite, hidrólise do amido, esculina e gelatina e negativo para oxidase, a capacidade de utilizar 19 açúcares como fontes únicas de Carbono e não utilização de asparagina, ácido fórmico, D-manitol, D-sorbitol, D-arabitol, D, L carnitina, L-arabinose, L-ramnose e m-inositol, além de outras. Ficou também constatada a ineficácia dos testes de tolerância ao C.T.T., tanto a 0,1 quanto 0,02%, assim como temperatura máxima de crescimento a 38 °C. Para caracterização molecular, foi utilizado um par de *primers* de comprovada eficiência na detecção de isolados virulentos de Xap e Xapf, requerendo adaptações no protocolo original, que além de otimizar o processo, permitiram uma maior agilidade, devido à possibilidade de supressão da etapa de extração de DNA. A técnica de PCR se mostrou eficiente, sendo que apenas dois isolados, um de Xap e outro de Xapf, não tiveram seu DNA amplificado, onde um deles foi o que apresentou menor

grau de virulência dentre os demais. A homologia desta região, com o isolado de *X. a. pv. vitians*, também foi observada pela fraca amplificação de um fragmento com o mesmo número de pares de bases. Os resultados demonstraram a necessidade de se adotar uma combinação de testes para que se tenha maior segurança no processo de identificação dos diferentes isolados de Xap e Xapf.

* Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Orientador) e Antônia dos Reis Figueira - UFLA.

ABSTRACT

HALFELD VIEIRA, B. de A. **Physiological, molecular characterization and virulence of isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and its variant *fuscans*.** Lavras: UFLA, 1999. 84p. (Dissertation - Master Program in Phytopathology)*

Forty two isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and of its variant *fuscans* were characterized, by basing upon their virulences, physiological and molecular characteristics, in the search for outstanding characters for identifying bacteria. The study of virulence consisted of inoculations in a susceptible host plant (*Phaseolus vulgaris* cv. Carioca), nine groups being able to be distinguished and non-host plants (*Capsicum annuum* cv. Agrônômico 10 G, *Lycopersicon esculentum* cv. S^{ta} Clara and *Nicotiana tabacum* cv. Turkish NN) where tobacco and tomato plants were the most suitable for the expression of the reaction of hypersensitivity, instigated by the bacterium. Also, possible relationships between virulence and origin of the isolates and capacity of producing melanin *in vitro* were investigated. Physiological studies, stood for by biochemical assays, were performed from a bacterium of 14 routine tests besides a nutritional screening conducted by 95 unique distinguished carbon sources, where the combination of results was able to safely characterize the isolates of Xap and Xapf, except for *X. sp. pv. passiflorae*, distinguished only by virulence in the host plant and by the molecular marker studied. They were efficient in characterizing the isolates, colonies morphology, yellowish colored, convex or smooth, Gram-negative, restrict aerobic with characteristic patterns for the pigment xanthomonadin, the positive result for milk proteolysis, hydrolysis of starch, esculin and gelatin and negative for oxidase, the capacity of utilizing 19 sugars as single sources of carbon and non-utilization of asparagine; formic acid; D-mannitol; D-sorbitol; D-arabitol; D, L, carnitine; L-arabinose; L-rhamnose and m-inositol, besides others. The inefficacy of C.T.T tolerance tests also became apparent, both at 0.1 and 0,02% as well as maximum growth temperature at 38 C. For molecular characterization, a pair of primers of proved efficiency in detecting virulent isolates of Xap and Xapf was utilized, demanding adaptations in the original protocol that besides optimizing the process, allowed an increased agility due to the possibility of suppression of the DNA extracting step. PCR technique proved efficient, being that only two isolates, one of Xap and the other of Xapf, did not have its DNA amplified, where one of them was that which presented the lowest degree of virulence among the others. The homology of this region, with the isolate of *X. a. pv. vitians* also was observed by the poor amplification of a

fragment with the same number of pairs of bases. The results showed the need to adopt a combination of tests to have a greater safety in the process of identification of the different isolates of Xap and Xapf.

* Guidance Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Major Professor) and
Antônia dos Reis Figueira - UFLA.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Um dos grandes entraves para a cultura do feijoeiro, tanto no Brasil quanto nas demais regiões produtoras do mundo, é a ocorrência do crestamento bacteriano, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith 1897) Vauterin, Hoste, Kersters e Swings 1995 e sua variante *fuscans* que tem, como característica, produção de melanina difusível em meio de cultura (Bianchini, Menezes e Maringoni, 1989). Assim como outras bactérias fitopatogênicas, sua identificação apresenta certas dificuldades, demandando experiência na diagnose e conhecimento de suas características em testes rotineiros de laboratório, aliado a técnicas de simples interpretação com precisão satisfatória, dentre outros recursos.

Dentre as metodologias disponíveis na identificação destas bactérias, as provas bioquímicas e a especificidade a determinados hospedeiros (Bradbury, 1986; Holt *et al.* 1994) ainda são as ferreentas mais utilizadas entre os fitopatologistas, com capacidade de fornecer dados consistentes para assegurar um diagnóstico correto e confiável.

Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, a caracterização de diversos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), oriundos de regiões distintas, determinando suas características nos aspectos da virulência, comportamento fisiológico e a possibilidade da utilização de um marcador molecular específico, visando sua detecção pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O crestamento bacteriano é uma das principais doenças do feijoeiro no Brasil (Mohan e Mohan, 1983), podendo ser classificado como crestamento bacteriano comum, se causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) e crestamento bacteriano fosco, se causado pela sua variante *fuscans* (Xapf), diferenciável somente em laboratório devido a sua capacidade de produzir melanina *in vitro* (Bianchini, Menezes e Maringoni, 1989).

A doença foi descrita pela primeira vez em 1897 (Swings e Civerolo, 1993), sendo detectada, no Brasil, em 1938, no Estado do Pará, e caracterizada em 1954, por Robbs, no antigo Estado da Guanabara (Rava e Sartorato, 1994). Ao longo dos anos, a bacteriose se disseminou pelo país, sendo encontrada atualmente na maioria das regiões produtoras, destacando-se o norte do Estado do Paraná, Rio de Janeiro, região central do Brasil e regiões baixas e quentes na zona da mata em Minas Gerais.

No Paraná, constatações de infecção de 84% das amostras de sementes analisadas refletem o grau de expansão da doença (Maringoni e Komori, 1989), considerada de ocorrência generalizada no Estado.

Condições ótimas para a ocorrência de epidemias estão associadas a temperaturas elevadas, com um ótimo em torno de 28 °C, aliadas a alta umidade (Bianchini, Menezes e Maringoni, 1989; Maringoni e Komori, 1989; Balardin, 1992; Santana *et al.*, 1993), pois propiciam o aumento do potencial de inóculo.

Dentre as doenças bacterianas que afetam a cultura do feijoeiro, o crestamento é a que possui importância econômica no Brasil. Bactérias como *Pseudomonas cichorii*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Marques *et al.*, 1994), *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Maringoni e Rosa, 1997) e

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*, de ocorrência esporádica no país (Bradbury, 1986; Marques *et al.*, 1994; Oliveira e Souza, 1997; Yorinori *et al.*, 1998), são constatadas ocasionalmente, sem causarem danos significativos ao feijoeiro.

Quanto às perdas ocasionadas pela bactéria, poucos são os estudos disponíveis, sendo relatadas reduções na produtividade variando de 22 a 33,1% em condições de infecção natural e 45% em condições artificiais (Wallen e Galway, 1977; Yoshii, Gálvez e Alvarez, 1976). Apesar da escassez de informações no Brasil, têm sido observados campos de produção bastante comprometidos pela doença (Oliveira e Souza, 1997). Kobayasi (1998) estudando diferentes fontes de resistência, encontrou uma redução média de 25% da produção nas plantas inoculadas artificialmente no campo, o que significa um índice consideravelmente alto.

Um outro fator preocupante é que as sementes infectadas constituem a principal forma de disseminação do patógeno (Zapata, Freytag e Wilkinson, 1985), que transportadas pelo homem, podem atingir as mais diversas localidades, com eficiência e rapidez (Weller, e Saettler, 1980; Balardin, 1992), o que torna a fiscalização rotineira o principal meio de se evitar sua expansão. Neste aspecto, afirmações de que 0,5% de sementes infectadas (Wallen e Sutton, 1965), ou menos de 10^3 unidades formadoras de colônia (u.f.c.)/semente (Webster, Atkin e Cross, 1983) são suficientes para o desencadeamento de uma epidemia, tornam a tolerância ao patógeno em sementes, para muitos países, igual a zero.

Em Minas Gerais, existe uma tolerância para plantas sintomáticas no processo de inspeção de campo, admitindo-se porcentuais de infecção na ordem de 0,5% para sementes básicas, 1,0% para certificadas e 1,5% para fiscalizadas (Oliveira e Souza, 1997).

Maringoni, Kimati e Kurozawa (1995), verificaram que a utilização sucessiva de sementes infectadas, prática bastante comum entre produtores de baixa tecnologia, leva a um acúmulo progressivo da bactéria.

Embora este seja o principal meio de disseminação, a ocorrência de insetos como *Bemisia tabaci*, *Cerotoma ruficornia*, *Chalcoderma ebeninus*, *Diaprepes abbreviata*, *Empoasca* sp. e *Nezara viridula*, contaminados com a bactéria, condições de chuvas com vento e trânsito dentro da cultura nas primeiras horas do dia, quando as plantas ainda estão molhadas pelo orvalho, são fatores importantes na disseminação dentro de lavouras (Balardin, 1992; Rava e Sartorato, 1994, Bianchini, Maringoni e Carneiro, 1997).

O patógeno pode ainda sobreviver de forma latente por até 15 anos em sementes infectadas (Goto, 1990; Bianchini, Maringoni e Carneiro, 1997) ou epifiticamente, na fase residente sobre hospedeiros alternativos (Cafati e Saettler, 1980; Webster, Atkin e Cross, 1983), restos culturais ou no solo em estado hipobiótico, principalmente quando em profundidades menores que 10 a 20 cm (Schuster e Coyne, 1977; Balardin, 1992; Bianchini, Maringoni e Carneiro, 1997), recomendando-se portanto o uso de herbicidas, rotação de culturas, remoção de plantas atacadas e aração profunda em áreas afetadas.

A gama de hospedeiros é relativamente ampla, sendo conhecidas diversas plantas, principalmente dos gêneros *Phaseolus* e *Vigna*, causando infecção natural em *Calopogonium* sp., *Lablab purpureus* (sin. *Dolichos lablab*), *Macroptilium lathyroides* (sin. *Phaseolus lathyroides*), *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Pueraria* sp., *Vigna aconitifolia* (sin. *Phaseolus aconitifolius*), *Vigna angularis*, *Vigna mungo*, *Vigna radiata* (sin. *Phaseolus aureus*), *Vigna umbellata* (sin. *Phaseolus calcaratus*), e *Strophostyles helvola*, podendo, em condições de inoculação artificial, ter como hospedeiros *Helianthus annuus*, *Lupinus polyphyllus*, *Phaseolus acutifolius* var. *acutifolius* (feijão tepary), *Phaseolus acutifolius* var. *latifolius* e *Phaseolus coccineus*

(Bradbury, 1986; Swings e Civerolo, 1993). Rava e Sartorato (1994) ainda citam *Vigna unguiculata*, *Mucuna deeringiana* e *Glycine max* como plantas hospedeiras.

Em relação ao controle químico, Bianchini, Maringoni e Carneiro (1997) relatam a ineficácia de pulverizações de oxiclreto de cobre; sulfato de estreptomicina + oxitetraciclina; oxiclreto de cobre + maneb e oxiclreto de cobre + zineb, na tentativa de controlar a doença em folhas e vagens.

Maringoni (1990) observou que apesar das pulverizações com mistura cupro-carbamato terem propiciado aumento na produtividade, as experiências não têm apresentado resultados satisfatórios, pois resultam em infecção foliar severa, com alta percentagem de vagens doentes e elevada concentração de bactérias nas sementes, fator que propicia o início de um novo ciclo de infecção; além disso, pulverizações com antibióticos também não demonstram eficiência, provavelmente pela resistência da bactéria à estreptomicina, fato bastante comum até para bactérias da filosfera do feijoeiro (Weller e Saettler, 1978). Estes autores verificaram que a resistência a antibióticos parece ser bastante comum e provavelmente irreversível, como no caso do Rifampin[®], um antibiótico de amplo espectro, altamente tóxico, usado na seleção de mutantes para estudos de campo. Esta prática é desaconselhável, já que tanto utilizando antibióticos sozinhos como em mistura com cúpricos, pode provocar alta pressão de seleção para mutantes resistentes (Rava e Sartorato, 1994).

Nesse contexto, um dos grandes trunfos para o controle da bacteriose em localidades com risco de infecção é a seleção de materiais com alto grau de resistência. Enquanto estudos demonstraram que a resistência a Xap e Xapf tem aspecto quantitativo, condicionado por poucos genes, com dominância parcial, de alta herdabilidade (Coyne, Schuster e Harris, 1965; Coyne, Schuster e Shaughnessy, 1966; Rava, Zimmermann e Romeiro, 1987; Stall, 1997), Valladares-Sanchez, Coyne e Schuster (1979) constataram natureza poligênica

para este caráter, sendo *Phaseolus acutifolius* considerada a espécie com o mais alto grau de resistência, sem expressar sintomas da bacteriose (Coyne e Schuster, 1973). Além disso, a observação de segregação transgressiva demonstra que o nível de resistência a esta bactéria pode ser aumentado através de cruzamentos entre linhagens resistentes (Pompeu e Crowder, 1972) cabendo aos melhoristas incluírem em seus programas de seleção a identificação destes materiais.

Um fator freqüentemente observado é a reação diferencial à bacteriose em vagens e folhas, a qual é controlada por diferentes genes (Coyne e Schuster, 1974; Valladares-Sanchez, Coyne e Schuster, 1979; Ávila *et al.*, 1998; Kobayashi, 1998), fato de grande importância prática, já que a seleção deve avaliar estas duas variáveis em conjunto.

Os sintomas causados pela bactéria são diferenciados de acordo com o órgão da planta afetado e podem ser facilmente confundidos com os incitados por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. A doença evolui primeiramente apresentando manchas foliares do tipo anasarca, observadas de 4 a 10 dias após a infecção, que aumentam de tamanho coalescendo com lesões adjacentes. Freqüentemente podem ser observadas necroses, porém não obrigatoriamente acompanhadas de uma borda amarelada, fator que varia de acordo com o isolado, cultivar e condições de ambiente. As lesões podem ocorrer em qualquer área da folha, sendo mais comum a evolução a partir dos bordos foliares (Bradbury, 1986).

Em casos de infecção severa, as folhas mortas podem continuar aderidas à planta ou ocorrer desfoliação, podendo ser observados exsudatos que servem como fonte de inóculo para infecções secundárias. No caule, pode ocorrer ocasionalmente o estrangulamento, que pode causar sua quebra, porém este tipo de ocorrência é menos comum. A infecção neste caso ocorre via estômatos do hipocótilo e epicótilo, elementos vasculares da folha e cotilédones infectados,

com sintomas similares causados às folhas, porém com lesões menores, sem ocorrência de clorose (Bradbury, 1986).

Nas vagens, observam-se lesões encharcadas ovais a oblongas, marrom escuras, e nas sementes podem ser observadas manchas irregulares, amareladas, restritas à região do hilo ou distribuídas pelo tegumento, principalmente quando as sementes têm coloração branca, pois são de difícil constatação em sementes pigmentadas. A infecção, neste caso, se processa a partir do pedicelo, sistema vascular da vagem, micrópila ou funículo (Bradbury, 1986).

A taxa de multiplicação do patógeno em folhas de feijoeiro se assemelha ao seu comportamento *in vitro*, chegando à fase logarítmica em um período de 19 horas e iniciando a fase estacionária quando a população atinge 10^7 a 10^8 células/20 cm² de folha, mantidos até a senescência da folha (Goto, 1990).

Em caso de chuvas, podem ser removidos aproximadamente 10% da população bacteriana, o suficiente para constituir novas fontes de inóculo (Goto, 1990). O crescimento ótimo *in vitro* é verificado em temperaturas na faixa entre 28 e 32 °C, declinando à medida que a temperatura é reduzida, cessando aos 16 °C (Rava e Sartorato, 1994).

Os agentes causais do crestamento bacteriano sofreram diversas modificações taxonômicas ao longo do tempo, sendo cronologicamente classificados como *Bacillus phaseoli* Smith 1897, *Bacterium phaseoli* (Smith) Smith 1905, *Phytomonas phaseoli* (Smith) Bergey 1923, *Pseudomonas phaseoli* (Smith) Smith 1931, *Xanthomonas phaseoli* (Smith) Dowson 1939 e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye 1978. Já a variante *fuscans*, como: *Phytomonas phaseoli* var. *fuscans* Burkholder 1930, *Bacterium phaseoli* var. *fuscans* (Burkholder) Okabe 1933, *Pseudomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkholder) Stapp 1935, *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkholder) Starr e Burkholder 1942, *Xanthomonas fuscans* (Burkholder) Burkholder 1959, posteriormente incluída em *X. c.* pv. *phaseoli* como uma variante, já que se

diferencia somente pela produção *in vitro* de pigmento escuro, fato que não justifica um *status* taxonômico diferenciado (Bradbury, 1986).

Recentemente foi sugerida uma nova classificação (Vauterin *et al.*, 1995), baseada em exigências nutricionais, similaridade protéica, perfil de ácidos graxos, além de homologia de DNA. Isso levou à modificação da espécie *Xanthomonas campestris* por *Xanthomonas axonopodis*, passando a constituir um grupo mais amplo, englobando a maioria dos patovares dentre as espécies do gênero. Apesar de ainda não ser totalmente empregado pelos bacteriologistas, este novo sistema apresenta uma maior consistência de dados pela quantidade de caracteres envolvidos, fator que oferece maior precisão segundo relações filogenéticas entre as espécies.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA, Z.R. de; SOUZA, R.M.; SANTOS, J.B. dos; SOUZA, P.E.; CASTRO, A.M.S. Reação de cultivares e linhagens de feijoeiro comum a diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v. 23, n. 1, p. 18-22, mar. 1998.
- BALARDIN, R.S. Doenças do feijoeiro. In: EPAGRI, (Florianópolis, SC) *A Cultura do Feijão no Estado de Santa Catarina*. Florianópolis: EPAGRI, p. 195-225, jan. 1992.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (eds.) *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1997. v. 2, p. 376-399.
- BIANCHINI, A.; MENEZES, J.R. de; MARINGONI, A.C. Doenças e seu controle. In: CARVALHO, S.M. (coord.) *O Feijão no Paraná*. Londrina: IAPAR, p. 189-216, 1989.
- BRADBURY, J.F. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Aberystwyth: CAB International, 1986, 332 p.
- CAFATI, C.R.; SAETTLER, A.W. Role of nonhost species as alternate inoculum sources of *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Disease*. Saint Paul, v. 64, n. 2, p. 194-196, Feb., 1980.
- COYNE D.P.; SCHUSTER, M.L. *Phaseolus* germplasm tolerant to common blight bacterium (*Xanthomonas phaseoli*). *Plant Disease Reporter*. Beltsville, v. 57, n. 2, p. 111-115, Feb. 1973.
- COYNE D.P.; SCHUSTER, M.L. Differential reaction of pods and foliage of beans (*Phaseolus vulgaris*) to *Xanthomonas phaseoli*. *Plant Disease Reporter*. Washington, v. 58, n. 3, p. 278-282, Mar. 1974.
- COYNE D.P.; SCHUSTER, M.L.; HARRIS, L. Inheritance heritability, and response to selection for common blight (*Xanthomonas phaseoli*) tolerance in

Phaseolus vulgaris field bean crosses. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**. Saint Paul, v. 86, p. 373-379, 1965.

COYNE D.P.; SCHUSTER, M.L.; SHAUGHNESSY, L. Inheritance of reaction to halo blight and common blight bacteria in a *Phaseolus vulgaris* variety cross. **Plant Disease Reporter**. Washington, v. 50, n. 1, p. 29-32, Jan. 1966.

GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1990. 342p.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. (eds.) **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Maryland: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

KOBAYASTI, L. Avaliação de genótipos de feijão quanto a reação foliar e de vagens a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, e transmissão da bactéria por sementes. Lavras: UFLA, 1998. 54 p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).

MARINGONI, A.C. Controle químico do crestamento bacteriano comum do feijoeiro e seu efeito na transmissão de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye pelas sementes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 25, n. 8, p. 1151-1156, ago. 1990.

MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Presença da *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e consequências epidemiológicas. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 20, n. 3, p. 449-457, set. 1995.

MARINGONI, A.C.; KOMORI, N. Levantamento das bacterioses do feijoeiro no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 14, n. 3/4, p. 241-244, out./dez. 1989.

MARINGONI, A.C.; ROSA, E.F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijão no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**. São Paulo, v. 23, n. 2, p. 160-162, abr./jun. 1997.

MARQUES, A.S. dos A.; ROBBS, C.F.; BOITEUX, L.S.; PARENTE, P.M. **Índice de Fitobacterioses Assinaladas no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 65p.

- MOHAN, S.T.; MOHAN, S.K. Novas linhagens do feijoeiro resistentes ao crestamento bacteriano comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 18, n. 10, p. 1117-1120, out. 1983.
- OLIVEIRA, J.R. de; SOUZA, R.M. de. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) controle de doenças causadas por bactérias. In: VALE, F.X.R. do; ZAMBOLIM, L. (eds.) **Controle de Doenças de Plantas de Grandes Culturas**. Viçosa: Ministério da Agricultura, 1997. Cap.7. p.423-435.
- POMPEU, A.S.; CROWDER, L.V. Inheritance of resistance of *Phaseolus vulgaris* L. (dry beans) to *Xanthomonas phaseoli* Dows. (common blight). **Ciência e Cultura**. São Paulo, v. 24, n. 11, p. 1055-1063, Nov. 1972.
- RAVA, C, A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. (eds.) **Principais Doenças do Feijoeiro e seu Controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 217-242, 1994.
- RAVA, C.A.; ZIMMERMANN, M.J. de O.; ROMEIRO, R.S. Inheritance of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye in *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Genética**. Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 709-727, Dec. 1987.
- SANTANA, E.A.; COYNE, D.P.; BEAVER, J.S.; ZAITER, H.Z. Effect of photoperiod and temperature on common blight disease of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Euphytica**. Wageningen, v. 66, n.3, p. 211-216, 1993.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P. Survival of plant parasitic bacteria of plants grown in tropics with emphasis on beans (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 2, p. 117-130, July 1977.
- STALL, R.E. Breeding for resistance to bacterial disease of plants. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. do (eds.). **Resistência de Plantas a Doenças**. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 30., 1997, Poços de Caldas Palestras... Brasília: SBF, 1997. p. 51-56.
- SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (eds.) *Xanthomonas*. London: Chapman e Hall, 1993. 399 p.
- VALLADARES-SANCHEZ, N.E.; COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L. Differential reaction of leaves and pods of *Phaseolus* germplasm to strains of *Xanthomonas phaseoli* and transgressive segregation for tolerance from

- crosses of susceptible germplasm. *Journal of American Society for Horticultural Science*. Saint Paul, v. 104, n. 5, p. 648-654, Sept./Oct., 1979.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. London, n. 3, v. 45, p. 472-489, July 1995.
- WALLEN, V.R.; GALWAY, D.A. Bacterial blight of field bean: disease progress, yield loss, and crop canopy development in principal cultivars in Ontario. *Canadian Plant Disease Survey*. Ottawa, v. 57, n. 3/4, p. 61-64, July/Dec. 1977.
- WALLEN, V.R.; SUTTON, M.D. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr e Burkh. on field in Ontario. *Canadian Journal of Botany*. Ottawa, v. 43, p. 437-446, 1965.
- WEBSTER, D.M.; ATKIN, J.D.; CROSS, J.E. Bacterial blights of snap beans and their control. *Plant Disease*. Saint Paul, v. 67, n.9, p. 935-940, Sept., 1983.
- WELLER, D.M.; SAETTLER, A.W. Rifampin-resistant *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* and *Xanthomonas phaseoli*: tools for field study of bean blight bacteria. *Phytopathology*. Saint Paul, v. 68, n. 5, p. 778-781, May 1978.
- WELLER, D.M.; SAETTLER, A.W. Evaluation of seedborne *Xanthomonas phaseoli* and seedborne *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. *Phytopathology*. Saint Paul, v. 70, n. 2, p. 148-152, Feb. 1980.
- YORINORI, M.A.; FUNADA, C.K.; RODRIGUES, R.; BIANCHINI, A.; LEITE JÚNIOR, R.P.; UENO, B. Ocorrência do cretamento bacteriano aureolado do feijoeiro causado por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* no Estado do Paraná. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 31, 1998, Fortaleza. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v. 23, ago. 1998. p. 218. Suplemento.
- YOSHII, K.; GÁLVEZ, G.E.; ALVAREZ, G. Estimation of yield losses in beans caused by common blight. *Proceedings of the American Phytopathological Society*. Saint Paul, v. 3, p. 298-299, 1976.
- ZAPATA, M.; FREYTAG, G.F.; WILKINSON, R.E. Evaluation for bacterial blight resistance in beans. *Phytopathology*. v. 75, n. 9, p. 1032-1039, 1985.

CAPÍTULO 2

**Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e
Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* var. *fuscans***

1 RESUMO

HALFELD VIEIRA, B. de A. Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. In: HALFELD VIEIRA, B. de A. Caracterização fisiológica, molecular e virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. Lavras: UFLA, 1999. p. 14-35. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia) *

Foram inoculados os isolados de Xap e Xapf em *Phaseolus vulgaris* cv. Carioca, e realizado o teste de hipersensibilidade (HR) em plantas de *Capsicum annuum*, *Nicotiana tabacum* e *Lycopersicon esculentum*, no intuito de avaliar diferenças quanto à virulência dos isolados e qual a melhor planta indicadora capaz de discriminar qualitativamente essa virulência. As inoculações com suspensões bacterianas ($A_{600} = 0,14$), pelo método de incisão com tesoura, foram feitas em plantas de feijoeiro, 13 dias após o plantio, observando-se a progressão dos sintomas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação, adotando-se, para o ensaio, o modelo inteiramente casualizado, avaliando-se 16 folhas por repetição, em um total de 3 repetições/tratamento. As médias de cada repetição foram utilizadas para o cálculo da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), procedendo-se a análise de variância e agrupamento univariado de médias Scott e Knott ao nível de 5%. Para o teste de hipersensibilidade, suspensões bacterianas foram inoculadas por infiltração nas folhas de pimentão, fumo e tomateiro, avaliando-se a resposta da planta para cada isolado, por um período de 48 horas. Diferenças de virulência em feijoeiro foram observadas, sendo constatados 9 grupos distintos entre si. Não se observou relação entre características de virulência e condições climáticas do local de origem dos isolados, assim como capacidade de produzir pigmento escuro em meio de cultura. Para a reação de HR, plantas de fumo e tomateiro foram as mais indicadas para a utilização na diferenciação dos isolados patogênicos de Xap e Xapf.

* Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Orientador) e Antônia dos Reis Figueira - UFLA.

2 ABSTRACT

HALFELD VIEIRA, B. de A. Virulence of isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. In: HALFELD VIEIRA, B. de A. Physiological, molecular characterization and virulence of isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and its variant *fuscans*. Lavras: UFLA, 1999. p. 14-35 (Dissertation - Master Program in Phytopathology)*

The isolates of Xap and Xapf were inoculated in *Phaseolus vulgaris* cv. Carioca and performed the hypersensitivity test (HR) in plants of *Capsicum annum*, *Nicotiana tabacum* and *Lycopersicon esculentum*, with a view to evaluating differences as to the virulence of the isolates and which is the best indicator plant capable of distinguishing that virulence qualitatively. The inoculations with bacterial suspensions ($A_{600} = 0.14$) by the method of incision with a pair of scissors, were done in bean plants, 13 days after planting, by observing the progress of the symptoms at 7, 14, 21 and 28 days after inoculation, adopting for the trial the completely randomized model, by evaluating 16 leaves per replication, in a total of 3 replications/treatment. The means of each replication were utilized for the calculation of the Area Under Disease Progress Curve (AUDPC), proceeding the analysis of variance and univariate clustering of Scott & Knott's means at the 5% level. For the hypersensitivity test, bacterial suspensions were inoculated by infiltration in the leaves of sweet pepper, tobacco and tomato plant, evaluating the response of the plant for each isolate for a period of 48 hours. Virulence differences in bean plant were observed, 9 distinguished groups being found different among one another. No relationship between virulence characteristics and climatic conditions, of the local of origin of the isolates as well as capacity of producing dark pigment in culture medium was found. For the HR reactions, tobacco and tomato plant were the most indicated for the utilization in the differentiation of the pathogenic isolates of Xap and Xapf.

* Guidance Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Major Professor) and Antônia dos Reis Figueira - UFLA.

3 INTRODUÇÃO

O conhecimento da variabilidade de um patógeno, de acordo com sua virulência, se constitui um fator de suma importância, devido às suas implicações práticas, no estudo do seu efeito em plantas hospedeiras e em não hospedeiras.

Neste contexto, uma propriedade muito utilizada por bacteriologistas de plantas é a reação de hipersensibilidade, que permite a verificação de virulência ou avirulência de isolados de forma rápida tendo como vantagem uma simples interpretação (Klement e Goodman, 1967).

Em plantas hospedeiras suscetíveis, a variabilidade pode ser mensurada a fim de se determinar variações no grau de virulência entre isolados. Em termos práticos, a variação de virulência de Xap dificulta o desenvolvimento de variedades resistentes de ampla adaptação, já que podem perder sua tolerância quando cultivadas em locais distintos de onde foram selecionadas (Navarrete-Maya, Acosta-Gallegos e Espinosa, 1996).

Objetivando estudar quais as plantas não hospedeiras mais apropriadas na indicação de virulência de Xap e Xapf, foram utilizadas plantas de *Nicotiana tabacum*, *Capsicum annum* e *Lycopersicon esculentum*, tradicionalmente recomendadas como indicadoras, na verificação da reação de hipersensibilidade (Klement e Goodman, 1967), uma vez que o patovar não tem especificidade para solanáceas. Para verificação da variabilidade da virulência de Xap e Xapf, foi feita a inoculação em plantas de feijoeiro cv. 'Carioca', que são as principais hospedeiras do patógeno, permitindo colonização e expressão de sintomas característicos.

A avaliação da severidade dos sintomas, dentro de uma escala de notas, discriminaram variações nos graus de virulência entre isolados.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Algumas diferenças têm sido relatadas entre isolados de Xap e Xapf com relação à virulência, inclusive com distinções entre Xap e a sua variante *fuscans*.

Ekpo e Saettler, em 1976, constataram que isolados de Xapf, em geral, apresentam-se mais virulentos que isolados de Xap, porém, Wallen e Sutton (1965); Basu e Wallen (1967); Schuster e Smith (1983) e Ávila *et al.* (1998) não encontraram correlação entre produção de pigmento difusível e esta característica.

A associação entre procedência dos isolados e virulência também é uma observação freqüentemente citada. Segundo Rava e Romeiro (1990), Rava (1984) e Bianchini, Maringoni e Carneiro (1997), isolados provenientes de regiões tropicais geralmente são mais patogênicos do que os provenientes de zonas temperadas.

Outro fato comum é a ocorrência de variabilidade entre isolados distintos provenientes de regiões diversas (Bianchini, Maringoni e Carneiro, 1997; Rava, 1984).

Rava e Romeiro (1990) e Ávila *et al.* (1998) observaram que a classe de reação de cultivares, em relação ao nível de virulência dos isolados, não se altera, permitindo a classificação de cultivares e linhagens sempre na mesma ordem, porém Rava, Sartorato e Romeiro (1990) concluíram que a utilização de um isolado altamente virulento é mais adequado para avaliação de cultivares no processo de seleção, pois isolados de menor grau de virulência induzem intensidade de sintomas semelhante tanto em cultivares resistentes como suscetíveis. Já Schuster e Smith (1983) recomendaram uma ampla gama de isolados devido a elevada interação encontrada entre isolados e cultivares, a

ponto de sugerir o termo raça para alguns deles, como observado também por Zapata (1996).

A característica da natureza quantitativa da resistência, citada por diversos autores, sustenta com maior consistência a ausência de interação (Coyne, Schuster e Harris, 1965; Coyne, Schuster e Shaughnessy, 1966; Rava, Zimmermann e Romeiro, 1987; Stall, 1997; Valladares-Sanchez, Coyne e Schuster, 1979).

Quanto à expressão de virulência, tanto para Xap como Xapf, os sintomas começam a se expressar a partir do 3^o ao 5^a dia após a inoculação, em plantas de feijoeiro (Klement e Goodman, 1967). Segundo Swings, Vauterin e Kersters (1993), todas as espécies e patovares de *Xanthomonas* que induzem lesões locais em seus hospedeiros, têm a capacidade de induzir resposta hipersensível em plantas não hospedeiras.

Esta reação, freqüentemente desencadeada devido à ativação da NADPH oxidase na membrana plasmática (De Wit, 1997), é comumente utilizada entre os fitobacteriologistas por ser capaz de indicar a característica fitopatogênica da bactéria de um modo rápido e simples, consistindo um método bastante usual para verificação de virulência.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção e conservação dos isolados

Os isolados foram obtidos de diversas procedências (Tabela 1), tanto em meio de cultura suspensa em água estéril quanto em material vegetal. O isolamento a partir de folhas de feijoeiro, com sintomas, seguiu a metodologia descrita por Rudolph *et al.* (1990). O material vegetal foi desinfestado por meio de uma seqüência de procedimentos, iniciando-se pela retirada de dois fragmentos quadrados com cerca de 5 mm de lado, da borda da lesão típica causada pela bactéria. Estes fragmentos foram depositados em uma placa de Petri contendo etanol a 70%, por 30 segundos, e transferidos para outra placa com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2%, por 2 minutos. Em seguida, foram lavados em água destilada esterilizada e macerados em quatro gotas de água estéril. Para o plaqueamento, a suspensão obtida na maceração foi coletada com o auxílio de uma alça de platina flambada, e espalhada sobre o meio 523 de Kado & Heskett (1970) em estrias paralelas. As placas foram mantidas em incubadora tipo B.O.D. a 28 °C, por aproximadamente 48 horas. Após a incubação, colônias típicas e isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura GYCA (Swings, Vauterin e Kersters, 1993) e acondicionados em geladeira a 4 °C, para conservação. Todos os isolados foram repicados periodicamente a cada 20 dias, permitindo a manutenção da sua viabilidade (Swings, Vauterin e Kersters, 1993).

Empregou-se também a técnica de conservação a -80 °C. Para isso, cada isolado foi transferido para meio peptona-glicerol e incubado em B.O.D. a 28 °C, por 24 horas. Após o crescimento bacteriano, o porcentual de glicerol foi ajustado a 15 % (Lazo e Gabriel, 1987), com posterior transferência de 1 ml do caldo para tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, e armazenamento a -80 °C.

5.2 Preparo das mudas

As sementes de *Phaseolus vulgaris* cv. Carioca foram semeadas em vasos plásticos, de 5 Kg de capacidade, contendo substrato composto por areia, argila e esterco, em proporções iguais, esterilizado por brometo de metila.

Após o desbaste, cada vaso permaneceu com quatro plantas de aparência saudável e nos padrões de uniformidade. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente até atingirem o estágio ideal para inoculação.

5.3 Produção e preparo do inóculo

Cada um dos 40 isolados preservados em GYCA (Swings, Vauterin e Kersters, 1993) foram espalhados em ziguezague sobre a superfície do meio 523 (Kado e Heskett, 1970) e mantidos por 24 horas em incubadora B.O.D. a 28 °C. A seguir, foi preparada a suspensão bacteriana em solução de NaCl a 0,85%, sendo ajustada para 5×10^7 u.f.c./ml ($A_{600} = 0,14$) (Ávila, 1995).

5.4 Inoculação das mudas

As suspensões preparadas conforme descrito acima foram imediatamente inoculadas em plantas mantidas em casa de vegetação, 13 dias após a semeadura, pelo processo de incisão das folhas primárias (Rava *et al.*, 1996). O procedimento consistiu em efetuar dois cortes paralelos em um dos lados do limbo foliar, de cada folha primária, com tesoura previamente mergulhada na suspensão do inóculo. Após a inoculação, os vasos com as plantas foram transportados para a câmara úmida, onde permaneceram por um período de 24 horas até retornarem à casa de vegetação. A testemunha foi inoculada somente com solução de NaCl a 0,85%.

Dados de temperatura e umidade foram monitorados com termohigrógrafo durante todo o período do experimento.

5.5 Delineamento experimental

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado com 40 tratamentos, mais a testemunha, e três repetições, onde dois vasos, com quatro plantas cada, constituíram uma repetição.

5.6 Avaliação dos resultados

As plantas foram avaliadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação, tomando-se como base a escala de notas definida por Fernández-Isaula (1982), variando de 1 a 5, onde 1= Ausência de sintomas; 2= Pouca clorose ou necrose ao longo dos cortes; 3= Clorose e/ou necrose ao longo dos dois cortes e nas margens das folhas; 4= Clorose e/ou necrose com murcha em até 50% da área compreendida entre os cortes; 5= Clorose e/ou necrose em mais de 50% da área compreendida entre os cortes. Para cada planta, foram observadas as duas folhas primárias.

Para análise estatística, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença para cada repetição, submetendo-se cada área à análise de variância e posteriormente as médias ao teste de agrupamento univariado Scott e Knott, ao nível de 5%.

5.7 Teste de hipersensibilidade

O preparo do inóculo seguiu a metodologia descrita no item 5.3.

As plantas utilizadas foram mudas de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. Turkish NN), pimentão (*Capsicum annuum* cv. Agrônômico 10 G) e tomateiro

(Lycopersicon esculentum cv. S^a Clara). Procedeu-se a infiltração da suspensão no mesófilo foliar, com o auxílio de uma seringa hipodérmica. Nas testemunhas procedeu-se a infiltração de solução de NaCl 0,85%.

A avaliação foi realizada 48 horas após a inoculação, considerando como resposta hipersensível uma necrose rápida e localizada, com características de dessecação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os isolados testados, foram obtidos nove grupos com diferentes graus de virulência (Tabela 1). Não foi observada nenhuma relação entre a capacidade de produzir melanina em meio de cultura e o grau de virulência. Nenhum isolado foi avirulento, visto que a testemunha foi classificada em um grupo à parte, não expressando sintomas da doença.

Grupos homogêneos em relação à virulência, entre isolados de uma mesma região, também não foram caracterizados, pois isolados de um mesmo Estado foram classificados em grupos diferentes.

Relação entre a virulência e características climáticas da região de origem (Tabela 2) também não foi observada, concordando com os dados observados por Rava (1984), que demonstrou que isolados brasileiros podem ser tão virulentos quanto isolados provenientes de outras regiões do mundo, como Colômbia, Porto Rico e Uganda; e discordando de Rava e Romeiro (1990) e Bianchini, Maringoni e Carneiro (1997), que observaram maior grau de virulência nos isolados provenientes de regiões tropicais quando comparados com os de zonas temperadas.

Os dados médios de temperatura e umidade relativa, monitorados por termo-higrógrafo durante a realização do experimento, variaram de 24,3 a 12,5 °C e 94 a 61%, respectivamente, fazendo com que fosse necessário avaliar o progresso da doença por um tempo mais prolongado, e não somente em um único momento definido, já que em condições de temperatura mais amenas, como neste caso, a doença progride mais lentamente (Bianchini, Maringoni e Carneiro, 1997; Kobayashi, 1998).

TABELA 1: Origem e classificação de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans* de acordo com o grau de virulência, segundo agrupamento de médias da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). UFLA, Lavras-MG, 1999.

Isolado	^a Médias (AACPD)	Grupos	Doado por	Procedência
Testemunha	21.00	1	---	---
Xap 1	41.71	2	UNB	Brasília/DF
Xapf 1	66.16	3	Leite Jr., R. P.	Ubiratã/PR
Xapf 2	68.98	3	Leite Jr., R. P.	Dourados/MS
Xapf 3	71.00	4	Rodrigues, R.	— / SP
Xap 2	73.16	4	Leite Jr., R. P.	Irati/PR
Xapf 4	83.38	5	UNB	Brasília/DF
Xap 3	84.42	5	Leite Jr., R. P.	Ponta Grossa/PR
Xap 4	88.54	6	Balardin, R. S.	Júlio de Castilhos/RS
Xapf 5	89.69	6	Leite Jr., R. P.	Lumardelli/PR
Xap 5	92.48	7	Leite Jr., R. P.	Irati/PR
Xap 6	93.27	7	Leite Jr., R. P.	— / PR
Xapf 6	93.63	7	Maringoni, A. C.	São Manuel/SP
Xapf 7	93.84	7	Mariano, R. L. R.	— / SP
Xapf 8	94.59	7	Leite Jr., R. P.	Francisco Beltrão/PR
Xapf 9	94.61	7	Oliveira, J. R.	— / ES
Xap 7	94.77	7	Leite Jr., R. P.	Wenceslau Braz/PR
Xap 8	94.85	7	Oliveira, J. R.	E.U.A.
Xap 9	95.96	8	Ávila, Z. R.	Curvelo/MG
Xap 10	96.25	8	Oliveira, J. R.	Tocantins/MG
Xap 11	96.59	8	Oliveira, J. R.	— / RS
Xapf 10	96.66	8	Arias, S.M.S.	Campo Grande/MS
Xapf 11	96.68	8	UNB	Brasília/DF
Xapf 12	96.96	8	Ávila, Z. R.	Lavras/MG
Xap 12	97.02	8	Ito, M. F.	Capão Bonito/SP
Xapf 13	97.07	8	Leite Jr., R. P.	Wenceslau Braz/PR
Xap 13	97.64	8	Ávila, Z. R.	Guaxupé/MG
Xapf 14	97.90	8	Maringoni, A. C.	Itai/SP
Xapf 15	97.96	8	Arias, S.M.S.	Bandeirantes/MS
Xap 14	98.07	8	Gianasi, L.	Pereiras/SP
Xap 15	98.10	8	Halfeld Vieira, B. A.	Lavras/MG
Xap 16	98.21	8	Halfeld Vieira, B. A.	Lavras/MG
Xapf 16	98.80	8	Oliveira, J. R.	— / RS
Xapf 17	99.13	8	Leite Jr., R. P.	Londrina/PR
Xapf 18	99.18	8	Arias, S.M.S.	Dourados/MS
Xapf 19	99.37	8	Oliveira, J. R.	Anápolis/GO
Xap 17	100.27	9	Leite Jr., R. P.	— / PR
Xap 18	101.01	9	Valarini, P. J.	IAC/SP
Xap 19	102.17	9	Maringoni, A. C.	Coronel Macedo/SP
Xap 20	103.92	10	Maringoni, A. C.	São Manuel/SP
Xap 21	104.00	10	Ito, M. F.	Votuporanga/SP

^a Médias classificadas dentro de um mesmo grupo não diferem entre si, pelo teste de Scott e Knott, ao nível de 5%.

C. V. = 2,09

TABELA 2: Dados climatológicos dos locais de procedência dos diferentes isolados de *Xanthomonas* (Xap e Xapf), classificados em ordem crescente de virulência (Grupos). UFLA, Lavras-MG, 1999.

Isolado	Grupos	TMA	TMAMi	TMAMa	PRP	UR%	Procedência
Testemunha	1	-	-	-	-	-	-
Xap 1	2	21,2	16,1	26,6	1552,1	67,0	Brasília/DF
Xapf 1	3	21,2	14,5	26,3	1740,9	73,1	Ubiratã/PR
Xapf 2	3	21,9	16,9	28,8	1406,1	75,4	Dourados/MS
Xapf 3	4	---	---	---	---	---	--- / SP
Xap 2	4	16,8	12,1	23,4	1580,4	80,8	Irati/PR
Xapf 4	5	21,2	16,1	26,6	1552,1	67,0	Brasília/DF
Xap 3	5	16,4	11,9	23,8	1610,6	81,8	Ponta Grossa/PR
Xap 4	6	24,2	12,8	24,2	1750,8	79,2	Júlio de Castilhos/RS
Xapf 5	6	21,2	14,4	25,2	1603,4	72,0	Lumardelli/PR
Xap 5	7	16,8	12,1	23,4	1580,4	80,8	Irati/PR
Xap 6	7	---	---	---	---	---	--- / PR
Xapf 6	7	17,6	15,2	25,2	1398,4	75,4	São Manuel/SP
Xapf 7	7	---	---	---	---	---	--- / SP
Xapf 8	7	19,4	14,6	26,8	1910,8	78,9	Francisco Beltrão/PR
Xapf 9	7	---	---	---	---	---	--- / ES
Xap 7	7	19,7	14,8	25,1	1497,6	73,7	Wenceslau Braz/PR
Xap 8	7	---	---	---	---	---	EUA
Xap 9	8	20,9	15,1	25,4	1380,9	73,8	Curvelo/MG
Xap 10	8	21,8	16,4	28,4	1232,1	75,5	Tocantins/MG
Xap 11	8	---	---	---	---	---	--- / RS
Xapf 10	8	22,7	17,8	29,8	1469,0	72,8	Campo Grande/MS
Xapf 11	8	21,2	16,1	26,6	1552,1	67,0	Brasília/DF
Xapf 12	8	19,4	14,8	26,1	1529,7	76,2	Lavras/MG
Xap 12	8	18,4	14,8	24,9	1380,7	74,9	Capão Bonito/SP
Xapf 13	8	19,7	14,8	25,1	1497,6	73,7	Wenceslau Braz/PR
Xap 13	8	17,6	15,8	23,1	1594,3	70,8	Guaxupé/MG
Xapf 14	8	17,8	15,4	25,1	1402,5	76,1	Itai/SP
Xapf 15	8	23,8	18,5	30,9	1484,8	72,6	Bandeirantes/MS
Xap 14	8	19,4	15,2	25,0	1482,8	74,8	Pereiras/SP
Xap 15	8	19,4	14,8	26,1	1529,7	76,2	Lavras/MG
Xap 16	8	19,4	14,8	26,1	1529,7	76,2	Lavras/MG
Xapf 16	8	---	---	---	---	---	--- / RS
Xapf 17	8	20,6	15,6	27,2	1622,8	71,0	Londrina/PR
Xapf 18	8	21,9	16,9	28,8	1406,1	75,4	Dourados/MS
Xapf 19	8	22,2	16,9	28,4	1564,8	66,5	Anápolis/GO
Xap 17	9	---	---	---	---	---	--- / PR
Xap 18	9	---	---	---	---	---	IAC/SP
Xap 19	9	18,1	15,1	25,0	1391,8	75,4	Coronel Macedo/SP
Xap 20	10	17,6	15,2	25,2	1398,4	75,4	São Manuel/SP
Xap 21	10	22,1	16,9	29,2	1595,2	76,4	Votuporanga/SP

Dados observados no período de 1961 a 1990 (INMET, 1992). TMA= temperatura média anual (°C), TMAMi= temperatura média anual mínima (°C), TMAMa= temperatura média anual máxima (°C), por análise de isotermas; PRP= precipitação média anual (mm), por análise de isoietas; UR%= Umidade relativa média anual, por análise de isoumidas.

--- Dados não fornecidos.

No presente trabalho, os isolados Xap 9, Xapf 12 e Xap 13 foram classificados em um mesmo grupo, diferindo dos resultados observados por Ávila *et al.* (1998), onde os isolados Xap 9 e Xapf 12 foram mais virulentos e Xap 13 menos virulento. Esta diferença pode ter ocorrido devido à menor quantidade de isolados testados em seu trabalho (seis isolados), em que a discriminação entre eles foi feita pelo teste de Tukey, baseado em uma única avaliação aos 10 dias após a inoculação, e não na observação do progresso da doença, o qual permite acompanhar o desenvolvimento do patógeno ao longo do processo infeccioso.

A não observação de avirulência demonstrou que para esta situação experimental, o feijoeiro da cv. 'Carioca' serviu como um hospedeiro suscetível para reação foliar, a todos os isolados testados, em concordância com Maringoni *et al.* (1993), Maringoni, Kimati e Kurozawa (1995) e Kobayasti (1998).

Embora uma única cultivar não seja suficiente para discriminar relações mais específicas a nível de raça, como proposto por Schuster e Smith (1983), a tendência na classificação de cultivares e linhagens não se altera (Rava e Romeiro, 1990; Ávila *et al.*; 1998), implicando que, da mesma forma, a ordem dos isolados quanto à virulência seja constante, característica de resistência horizontal do hospedeiro (Camargo e Bergamin Filho, 1995). Portanto, o ensaio mostrou-se eficiente, cumprindo tanto sua finalidade de demonstrar a variabilidade entre isolados quanto sua hierarquia no que diz respeito a graus de virulência.

Para os testes de hipersensibilidade, todos os isolados de Xap e Xapf induziram resposta hipersensível nos hospedeiros incompatíveis (Tabela 3).

TABELA 3: Reação de hipersensibilidade em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*), pimentão (*Capsicum annuum*) e tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), após infiltração de suspensão de Xap e Xapf. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Isolado	^a Fumo	^a Pimentão	^a Tomateiro	^b Pigmento escuro <i>in vitro</i>
Testemunha	-	-	-	-
Xap 1	+	+	+	-
Xapf 1	+	+	+	+
Xapf 2	+	+	+	+
Xapf 3	+	-	+	+
Xap 2	+	+	+	-
Xapf 4	+	-	-	+
Xap 3	+	+	+	-
Xap 4	-	+	+	-
Xapf 5	+	+	+	+
Xap 5	+	+	+	-
Xap 6	+	+	+	-
Xapf 6	+	-	+	+
Xapf 7	+	+	+	+
Xapf 8	+	+	+	+
Xapf 9	+	+	+	+
Xap 7	+	+	+	-
Xap 8	+	-	+	-
Xap 9	+	+	+	-
Xap 10	+	+	+	-
Xap 11	+	+	+	-
Xapf 10	+	-	+	+
Xapf 11	+	+	+	+
Xapf 12	+	+	+	+

...continua...

TABELA 3, Cont.

Isolado	^a Fumo	^a Pimentão	^a Tomateiro	^b Pigmento escuro <i>in vitro</i>
Xap 12	+	-	+	-
Xapf 13	+	+	+	+
Xap 13	+	+	-	-
Xapf 14	+	+	+	+
Xapf 15	+	+	-	+
Xap 14	+	+	+	-
Xap 15	+	+	+	-
Xap 16	+	+	+	-
Xapf 16	+	+	+	+
Xapf 17	+	+	+	+
Xapf 18	+	-	+	+
Xapf 19	-	-	+	+
Xap 17	+	+	+	-
Xap 18	+	+	+	-
Xap 19	+	+	+	-
Xap 20	+	+	+	-
Xap 21	+	+	+	-
Xapf 20	+	+	+	+
Xapf 21	+	-	+	+
Xcc	+	-	+	-
Xavit	+	-	-	-
Xpass	-	-	+	-
Xav 1	-	-	+	-
Xav 2	+	+	+	-
Xav 3	-	-	-	-
Erw	-	-	-	-
Pcic	+	-	+	-
Rsol	+	-	+	-

^a + Reação de hipersensibilidade; - Ausência de reação de hipersensibilidade. ^b Resultado positivo; - resultado negativo.

Porém, 95% dos isolados induziram reação no fumo, 79% em pimentão e 93% em tomateiro. Neste aspecto, não foi verificada também qualquer relação entre capacidade de produzir melanina *in vitro* e especificidade em induzir resposta hipersensível em plantas específicas.

Portanto, para as três plantas testadas, as que apresentaram maior capacidade de expressar resposta foram o fumo e o tomateiro, sendo que o pimentão foi o que apresentou menor porcentual de HR (79%). A partir destas observações, pode-se recomendar a utilização de plantas de fumo e de tomateiro na verificação desta propriedade para isolados de Xap e Xapf.

7 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

a) Não existiu relação entre a virulência de Xap e de sua variante *fuscans*;

b) A região de origem dos isolados, tanto pela sua natureza geográfica como por características climáticas, não influenciou no grau de virulência dos isolados testados;

c) A cultivar 'Carioca' pode ser utilizada como hospedeiro suscetível eficiente, na diferenciação dos graus de virulência entre os isolados, tanto de Xap como Xapf;

d) Existe grande variabilidade de virulência, tanto entre os isolados de Xap como entre os de Xapf;

e) Plantas de *Nicotiana tabacum* cv. Turkish NN e *Lycopersicon esculentum* cv. S^{ta} Clara foram eficientes na constatação da virulência de Xap e Xapf, por hipersensibilidade.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA, Z.R. Comportamento de cultivares e linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) à diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. Lavras: UFLA, 1995. 46p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- ÁVILA, Z.R.; SOUZA, R.M. de; SANTOS, J.B. dos; SOUZA, P.E. de; CASTRO, A.M.S. Reação de cultivares e linhagens de feijoeiro comum a diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v. 23, n. 1, p. 18-22, mar. 1998.
- BASU, P.K.; WALLEN, V.R. Factors affecting virulence and pigment production of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. *Canadian Journal of Botany*. Ottawa, v. 45, p. 2367-2374, 1967.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (eds.) *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1997. v. 2, p. 376-399.
- CAMARGO, L.E.A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed.) *Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos*. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 729-760, 1995.
- COYNE D.P.; SCHUSTER, M.L.; HARRIS, L. Inheritance herdability, and response to selection for common blight (*Xanthomonas phaseoli*) tolerance in *Phaseolus vulgaris* field bean crosses. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*. Saint Paul, v. 86, p. 373-379, Jan./Feb. 1965.
- COYNE D.P.; SCHUSTER, M.L.; SHAUGHNESSY, L. Inheritance of reaction to halo blight and common blight bacteria in a *Phaseolus vulgaris* variety cross. *Plant Disease Reporter*. Washington, v. 50, n. 1, p. 29-32, Jan. 1966.
- DE WIT, P.J.G.M. The molecular basis of gene-for-gene systems in plant-pathogen interactions. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. do (eds.).



Resistência de Plantas a Doenças. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 30., 1997, Poços de Caldas. Palestras... Brasília: SBF, 1997. p. 64-69.

- EKPO, E.J.A.; SAETTLER, A.W. Pathogenic variation in *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. *Plant Disease Reporter*. Washington, v. 60, n. 1, p. 80-83, Jan. 1976.
- FERNÁNDEZ-ISAULA, H. Reações de folhas e vagens de *Phaseolus vulgaris* a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (E.F.Smith) Dye e Wilkie. Viçosa: UFV, 1982. 41p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia).
- INMET (Brasília, DF). Normais climatológicas (1961-1990). Brasília, 1992. 84p.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. Worcester, v. 60, 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.
- KOBAYASTI, L. Avaliação de genótipos de feijão quanto a reação foliar e de vagens a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, e transmissão da bactéria por sementes. Lavras: UFLA, 1998. 54 p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- LAZO, G.R.; GABRIEL, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*. Saint Paul, v.77, n. 3, p. 448-453, Mar. 1987.
- MARINGONI, A.C.; FREGONESE, L.H.; TÓFOLI, J.G.; KUROZAWA, C. Reação foliar e da vagem de feijoeiro à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e transmissão da bactéria pelas sementes. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v. 18, n. 3, p. 412-415, set. 1993.
- MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Presença da *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e conseqüências epidemiológicas. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v. 20, n. 3, p. 449-457, set. 1995.

- NAVARRETE-MAYA, R.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; ESPINOSA, R.G. Pathogenic variability of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in different regions in Mexico. 1 er Taller Internacional Sobre Bacteriosis Comun Del Frijol. Puerto Rico, p. 39-44, feb. 1996.
- RAVA, C.A. Patogenicidade de isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, v. 19, n. 4, p. 445-448, abr. 1984.
- RAVA, C.A.; COSTA, J.G.C. da; SARTORATO, A.; ZIMMERMANN, M.J.de O. Obtenção de linhagens de feijoeiro resistentes ao crestamento bacteriano comum originadas do cruzamento entre *Phaseolus vulgaris* e *P. acutifolius*. Summa Phytopathologica. São Paulo, v. 22, n. 1, p. 33-36, jan./mar. 1996.
- RAVA, C.A.; ROMEIRO, R.S. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* quanto a patogenicidade em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. Summa Phytopathologica. São Paulo, v. 16, n. 3/4, p. 225-232, jul./dez. 1990.
- RAVA, C.A.; SARTORATO, A.; ROMEIRO, R.S. Avaliação de cultivares de feijoeiro quanto a resistência a de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em condições de campo e casa de vegetação. Summa Phytopathologica. São Paulo, v. 16, n. 2, p. 83-91, abr./jun. 1990.
- RAVA, C.A.; ZIMMERMANN, M.J. de O.; ROMEIRO, R.S. Inheritance of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye in *Phaseolus vulgaris* L. Revista Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 709-727, Apr./June 1987.
- RUDOLPH, K.; ROY, M.A.; SASSER, M.; STEAD, D.E.; DAVIS, M.; SWINGS, J.; GOSSELÉ, F. Isolation of bacteria. In: KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. (ed.) Methods in Phyto bacteriology. Budapest: Akadémiai Kiado, 1990, p. 43-94.
- SCHUSTER, M.L.; SMITH, C.C. Variability of *Xanthomonas phaseoli* from the Dominican Republic. Fitopatologia Brasileira. Brasília, v. 8, p. 409-414, Oct., 1983.
- STALL, R.E. Breeding for resistance to bacterial disease of plants. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. do (eds.). Resistência de Plantas a Doenças. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 30., 1997, Poços de Caldas Palestras... Brasília: SBF, 1997. p. 51-56.

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

VALLADARES-SANCHEZ, N.E.; COYNE, D.P.; SCHUSTER, M.L. Differential reaction of leaves and pods of *Phaseolus* germplasm to strains of *Xanthomonas phaseoli* and transgressive segregation for tolerance from crosses of susceptible germplasm. *Journal of American Society for Horticultural Science*. Saint Paul, v. 104, n. 5, p. 648-654, Sept./Oct., 1979.

WALLEN, V.R.; SUTTON, M.D. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr e Burkh. on field in Ontario. *Canadian Journal of Botany*. Ottawa, v.43, p. 437-446, 1965.

ZAPATA, M. Race identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* on *Phaseolus vulgaris* leaves. 1 er Taller Internacional Sobre Bacteriosis Comun Del Frijol. Puerto Rico, p. 53-68, feb. 1996.

CAPÍTULO 3

Caracterização fisiológica de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*

1 RESUMO

HALFELD VIEIRA, B. de A. Caracterização fisiológica de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. In: HALFELD VIEIRA, B. de A. Caracterização fisiológica, molecular e virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. Lavras: UFLA, 1999. p. 36-65. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia) *

Foram estudadas as características fisiológicas de 42 isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), com a finalidade de sugerir metodologias eficientes para a sua diagnose. Catorze provas bioquímicas: Gram, crescimento em meio de asparagina como única fonte de carbono, relação com oxigênio livre, hidrólise do amido, esculina e gelatina, proteólise do leite, catalase, oxidase, tolerância ao C.T.T. 0,1 e 0,02%, produção de pigmento escuro em meio de cultura, crescimento mucóide e temperatura máxima de crescimento, além de um *screening* da capacidade de crescimento em 95 diferentes fontes exclusivas de carbono determinaram similaridades e diferenças entre os isolados. Testes de tolerância ao C.T.T. 0,1 e 0,02 % foram constatados como impróprios, tanto na caracterização de Xap e Xapf como para outras espécies e patovares do gênero *Xanthomonas*, e a temperatura máxima de crescimento também variou numa faixa de 35 a 38 °C, não sendo fixa em 38 °C. Alguns isolados de Xapf apresentaram morfologia da colônia distinta, sem aspecto mucóide, sendo indicativo de variabilidade. Características como: colônias Gram-negativas, aeróbias estritas, com perfil particular para pigmento xanthomonadina, incapazes de utilizar asparagina como fonte única de carbono, com resultado positivo para proteólise do leite, hidrólise da esculina, gelatina e amido, negativo para oxidase, utilização de 19 açúcares como fontes únicas de carbono, e a não utilização de 31 fontes, foram eficientes para a caracterização de Xap e Xapf.

* Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Orientador) e Antônia dos Reis Figueira - UFLA.

2 ABSTRACT

HALFELD VIEIRA, B. de A. Physiological characterization of isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. In: HALFELD VIEIRA, B. de A. Physiological, molecular characterization and virulence of isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and its variant *fuscans*. Lavras: UFLA, 1999. p. 36-65 (Dissertation - Master Program in Phytopathology)*

The physiological characteristics of 42 isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) and *Xanthomonas axonopodis* pv. var. *fuscans* (Xapf) with a view to suggesting efficient methodologies for its diagnosis. Fourteen biochemical assays: Gram, growth in asparagine medium with a single carbon source, relationship with free nitrogen, hydrolysis of starch, esculin and gelatin, milk proteolysis, catalase, oxidase, tolerance to 0.1 and 0.02% C.T.T, dark pigment in culture medium, mucous growth and maximum temperature of growth, in addition a screening of the growth capacity in 95 different unique sources of carbon determined both similarities and differences among isolates. Tests of tolerance to 0.1 and 0.02% C.T.T were found to be unsuitable both for the characterization of Xap and Xapf and other species and pathovars of the genus *xanthomonas* and maximum temperature of growth also varied in the range of 35 to 38 C, it not being fixed at 38 C. Some isolates of Xapf presented morphology of the distinguished colony, without a mucous aspect, being indicative of variability. Characteristics such as: Gram negative, restrict aerobes with a profile particular to the pigment xanthomonadin, unable to utilize asparagine as a single source of carbon with a positive result for milk proteolysis, hydrolysis of esculin, gelatin and starch, negative for oxidase, utilization of 19 sugars as single sources of carbon and the non-utilization of 31 sources, were efficient for the characterization of Xapf and Xapf

* Guidance Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Major Professor) and Antônia dos Reis Figueira - UFLA.

3 INTRODUÇÃO

No processo de identificação de bactérias, um artifício, utilizado na diagnose, que se mostra essencial e conclusivo, são as provas bioquímicas que refletem propriedades fisiológicas de cada bactéria.

Embora estes testes se encontrem descritos, nos principais guias de identificação de bactérias fitopatogênicas (Holt *et al.*, 1994, Schaad, 1994), como técnicas clássicas no processo de identificação, a possibilidade de se encontrar variações fisiológicas e no aspecto das colônias em bactérias do gênero *Xanthomonas* (Poplawsky e Chun, 1995) pode ser um fator que induz a erros de diagnose, devendo-se, para isso, estudar até que ponto estas variações ocorrem e quais características se mantêm constantes para a maioria dos isolados da bactéria.

Uma outra dificuldade encontrada é a impossibilidade de identificar todas as espécies de *Xanthomonas* apenas por testes laboratoriais, já que muitas delas apresentam características culturais idênticas, diferenciadas somente pela planta hospedeira de onde foi isolada (Burkholder e Starr, 1948; Vidaver, 1996).

Portanto, o conjunto de informações disponíveis capazes de oferecer segurança na diagnose é que fornecem confiança neste processo, onde provas bioquímicas constituem uma ferramenta conclusiva e indispensável.

Objetivou-se, neste trabalho, caracterizar isolados de Xap e Xapf, pela utilização das principais características fisiológicas capazes de identificar estas bactérias, a fim de verificar sua adequação nos sistemas de diagnose.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Observando as metodologias disponíveis na diagnose de fitobactérias, percebemos que o gênero *Xanthomonas* é um dos mais problemáticos quanto à classificação, devido à divisão de quase todas as espécies em patovares. Esta característica, considerada indesejável pelos taxonomistas, tem sua razão por ser regida pela especialização da bactéria em causar enfermidade em hospedeiros específicos e não por suas qualidades intrínsecas isoladamente (Robbs e Rodrigues Neto, 1993). Logo ao ser realizado um processo de diagnose, chega-se a um ponto onde tanto a espécie hospedeira quanto sua gama de hospedeiros se tornam mecanismos de identificação (Burkholder e Starr, 1948, Vauterin *et al.* 1995). Porém, podemos encontrar suporte em algumas características fisiológicas complementares que indicam a identidade de determinado patovar.

Quanto à espécie, Schaad (1994) recomenda cerca de nove testes capazes de distinguir cinco espécies de *Xanthomonas*, o que aparenta simplicidade e facilidade de interpretação. Recomendações para diferenciação de alguns patovares com uso de meios de cultura semi-seletivos também são apresentadas, incluindo *X. a. pv. phaseoli*.

O que podemos observar é que muitos dos meios recomendados são variáveis para diferentes isolados, fato que permite dúvida na avaliação.

Outros pesquisadores também apresentam meios desta natureza como sendo eficientes na identificação do patovar (Clafin, Vidaver e Sasser, 1987; Mabgala e Saettler, 1992).

Outras metodologias no processo de diagnose como imunodifusão em agar combinado a meio semi-seletivo (Velásquez e Trujillo, 1984a; Velásquez e Trujillo, 1984b), dupla difusão em gel de agar (Maringoni, Kimati e Kurozawa,

1994), ELISA e imunofluorescência indireta (Malin, Roth e Belden, 1983; Wong, 1991) também vêm sendo desenvolvidas objetivando detectar o patógeno em lotes de sementes, porém ainda sem aplicação rotineira.

Holt *et al.* (1994), na 9ª edição do manual de Bergey, descreveram o gênero *Xanthomonas*, além de outras características, como produtor de xanthomonadinas, um pigmento carotenóide, arilpolieno brominado, situado na membrana citoplasmática e insolúvel em água (Stephens e Starr, 1963; Robbs e Rodrigues Neto, 1993; Rava e Sartorato, 1994); oxidase negativo ou fracamente positivo; catalase positivo; não utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio; inibição do crescimento em 0,1% de cloreto de trifenil tetrazólio e ocasionalmente a 0,02%.

Em particular Xap, com capacidade para hidrolisar amido, proteólise do leite, com temperatura máxima de crescimento de 38 °C (Holt *et al.*, 1994). Bianchini, Maringoni e Carneiro (1997) citam também a capacidade em hidrolisar esculina, gelatina e Tween 80.

Quanto à inibição do crescimento a 0,1 e 0,02% de cloreto de trifenil tetrazólio, Robbs, Rodrigues Neto e Malavolta (1988) observaram que esta característica para fins descritivos do gênero é imprópria, recomendando a exclusão desta na descrição de *Xanthomonas*. Este fato é controverso em relação a importantes guias de identificação, como Holt (1994); Klement, Rudolph e Sands (1990) que, apesar de não incluírem o teste nas recomendações, citam como propriedade do gênero a inibição de seu crescimento. Lelliott e Stead (1987) afirmam que todas as espécies pertencentes ao gênero são inibidas por este sal a concentração de 0,1%.

Existem poucos estudos envolvendo a utilização de fontes exclusivas de carbono. Neste contexto, uma ferramenta bastante útil no processo de caracterização é o sistema Biolog GN™, constituído de uma microplaca, semelhante à utilizada para o teste ELISA, porém com 95 fontes únicas de

carbono distribuídas em cada cavidade. Este sistema tem como fundamento a redução do tetrazólio quando ocorre a oxidação da fonte de carbono, durante o desenvolvimento da bactéria (Jones, Chase e Harris, 1993).

Vauterin *et al.* (1995) utilizaram este sistema como suporte na reclassificação do gênero *Xanthomonas*, já que a grande quantidade de combinações permite diferenciar grupos genômicos, auxiliando assim na classificação de espécies de *Xanthomonas* ainda não reclassificadas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Preparação dos isolados

Todos os testes envolvendo as propriedades bioquímicas, foram realizados utilizando-se os isolados com 24 horas de crescimento a 28 °C, em meio 523 de Kado & Heskett (1970).

5.2 Utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio


Para o teste de utilização de asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, cada isolado foi transferido para o meio descrito por Starr e Weiss (1943) contido em tubo de ensaio e incubado a 28 °C.

As observações do meio foram realizadas até o 14º dia após a repicagem, sendo a sua turbidez considerada como resultado positivo. Os resultados de crescimento em asparagina foram reconfirmados por meio de nova repicagem para o mesmo meio, com a finalidade de se evitar suspeitas de contaminação com nutrientes do meio original. Os resultados foram comparados também com os do sistema Biolog GNTM, que contém a mesma fonte de carbono.

5.3 Relação com o oxigênio livre

Foram efetuados dois testes para verificação de metabolismo oxidativo ou fermentativo, utilizando o sistema de anaerobiose pelo uso de uma lamínula e o meio de Hugh & Leifson (Fahy e Hayward, 1983).

Para o teste com a lamínula, procedeu-se o espalhamento de cada isolado sobre o meio 523 de Kado & Heskett (1970), com o auxílio de uma alça de Drigalski, depositando-se, a seguir, quatro lamínulas previamente flambadas,



aleatoriamente, sobre o meio inoculado, de forma a criar uma região desprovida de ar entre eles.

No meio de Hugh & Leifson (Fahy e Hayward, 1983), cada isolado foi inoculado em dois tubos de ensaio contendo o meio, sendo que em um deles adicionou-se uma sobre-camada com cerca de 4 cm de óleo mineral esterilizado, visando propiciar um ambiente anaeróbio. A mudança de coloração de verde para amarela caracterizou, em condições anaeróbias, metabolismo fermentativo da bactéria e, em condições aeróbias, o metabolismo oxidativo.

Já no sistema onde foi utilizada a lamínula, o metabolismo fermentativo se caracterizou pelo crescimento bacteriano sob a lamínula, e o metabolismo oxidativo, apenas pelo crescimento sobre o meio exposto ao ar.

5.4 Catalase

O teste foi efetuado depositando-se, sobre uma gota de água oxigenada (H_2O_2), uma porção da colônia bacteriana espalhada em uma lâmina de microscopia limpa utilizada como suporte. A imediata liberação de bolhas indicou o resultado positivo para catalase (Fahy e Hayward, 1983).

5.5 Crescimento mucóide em meio GYCA

Esta característica foi observada transferindo cada isolado para o meio GYCA (Swings, Vauterin e Kersters, 1993), pelo método de estrias, incubando-se a 28 °C, por 48 horas. A observação de colônias convexas, elevadas e brilhantes caracterizou o crescimento mucóide (Fahy e Hayward, 1983).

5.6 Gram

Foi utilizado o teste de solubilidade em KOH (Fahy e Hayward, 1983), em que foi coletada uma pequena porção da colônia bacteriana, com auxílio alça de platina, a qual foi misturada a duas gotas de KOH 3%, sobre uma lâmina de microscopia. As bactérias Gram-negativas foram caracterizadas pelo aumento da viscosidade do KOH.

5.7 Crescimento em meio de cultura contendo 0,02 e 0,1% de C.T.T.

Os isolados foram repicados para meio TZCA, contendo cloreto de trifetil tetrazólio, nas concentrações 0,1 e 0,02 % (Fahy e Hayward, 1983) e incubados a 28 °C.

A capacidade de se desenvolver sob estas condições foi observada por até 48 horas após a repicagem, caracterizando o resultado positivo (Lelliott e Stead, 1987).

5.8 Hidrólise do amido

Foi verificada a capacidade de hidrólise do amido em meio YNA, suplementado com 0,2% de amido (Fahy e Hayward, 1983). Cada isolado foi semeado pelo método de estrias paralelas e incubado por 48 horas, a 28 °C. Após o período de incubação, adicionou-se lugol até cobrir a superfície do meio. A presença de um halo incolor em torno das colônias indicou a capacidade de hidrolisar o amido (Fahy e Hayward, 1983).

5.9 Hidrólise da esculina

Os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio de esculina descrito por Schaad (1994) e incubados em B.O.D. a 28 °C, sendo

observados por até 28 dias. O escurecimento do meio com perda de fluorescência caracterizou a capacidade em hidrolisar esculina, com resultado positivo.

5.10 Hidrólise da gelatina

Para liquefação da gelatina, procedeu-se a repicagem dos isolados para o meio contido em tubo de ensaio, fazendo-se uma perfuração com a alça de platina contaminada pelos isolados. Os tubos foram levados para incubação, a 28 °C, e observados por um período de 14 dias.

A hidrólise da gelatina foi caracterizada pela perda da capacidade de solidificação do meio a 4 °C, por um período mínimo de 30 minutos (Fahy e Hayward, 1983; Schaad, 1994).

5.11 Oxidase

Para realização deste teste, as colônias foram coletadas com um bastão de vidro, friccionadas levemente sobre papel de filtro embebido em solução de dihidroclorato de N, N, N', N' tetrametil-1,4-fenilenodiamina.

O surgimento de uma coloração lilás em um período de 10 a 60 segundos caracterizou a reação positiva para o teste (Schaad, 1994).

5.12 Produção de pigmento escuro em meio de cultura

Para a produção de pigmentos difusíveis em meio de cultura, característica da variante *fuscans*, foi feita a repicagem dos isolados em meio 523 de Kado & Heskett (1970). Os diferentes isolados foram semeados no meio pelo processo de estrias e incubados a 28 °C, por 72 horas. O escurecimento do

meio em torno das colônias caracterizou a produção do pigmento (Basu e Wallen, 1966; Basu e Wallen, 1967; Basu, 1974).

5.13 Proteólise do leite

Culturas bacterianas com 24 horas de cultivo foram repicadas para tubo de ensaio contendo leite em pó desnatado reconstituído a 10%. Os tubos foram incubados em B.O.D. a 28 °C e observados por um período de 7 dias.

A observação de uma fase translúcida, principalmente na região superior, caracterizou a capacidade do isolado em hidrolisar a caseína do leite (Schaad, 1994).

5.14 Temperatura máxima de crescimento

Tubos de ensaio contendo meio 523 de Kado & Heskett (1970) na forma líquida, foram pré-incubados em banho-maria em diversas temperaturas, por pelo menos 30 minutos antes da repicagem. Após a repicagem com diferentes isolados, os tubos retornaram ao banho-maria, sendo incubados por 7 dias.

Temperaturas variando em 1 °C, em um intervalo de 33 a 43 °C, foram testadas. A máxima temperatura que apresentou turvação do meio foi considerada temperatura máxima de crescimento (Fahy e Hayward, 1983).

5.15 Capacidade de crescimento em diferentes fontes de carbono

Para o preparo da suspensão bacteriana, as colônias de cada isolado, foram coletadas com alça de platina e suspensas em solução de NaCl 0,85% estéril, contida em Erlenmeyer. Após a homogeneização em condições assépticas, foram retiradas alíquotas de 3 ml para calibração da suspensão em espectrofotômetro, adotando-se, como padrão, leituras variando no intervalo de $A_{590nm} = 0,190$ a $0,210$ (Vauterin *et al.*, 1995).

A suspensão preparada foi vertida em placa de Petri estéril, dentro da câmara de fluxo laminar. Em seguida, com auxílio de uma pipeta multicanal, colocaram-se 150 µl desta suspensão em cada cavidade da microplaca Biolog GN™, pré incubadas a 28 °C (Biolog, 1993; Vauterin *et al.*, 1995). Com todas as cavidades completas, as microplacas foram recolocadas em sua embalagem opaca, retornando à incubadora a 28 °C, em ambiente escuro, sendo avaliadas com 24, 48 e 72 horas após a repicagem com a suspensão bacteriana. A utilização das fontes únicas de carbono por cada isolado foi caracterizada pelo desenvolvimento de uma coloração roxa, devido à redução do tetrazólio, em cada cavidade onde a bactéria foi capaz de se desenvolver (Biolog, 1993; Vauterin *et al.*, 1995).

5.16 Pigmento xanthomonadina

O pigmento foi extraído das bactérias cultivadas por 48 horas, em meio 523 de Kado & Heskett (1970), a 28 °C. A extração constituiu da coleta de uma porção abundante das colônias bacterianas utilizando uma alça de platina, procedendo-se, a seguir, a deposição deste material em 5 ml de metanol contido em tubo de ensaio.

A seguir, os tubos foram tampados por uma bola de vidro para diminuir a evaporação do metanol e levados ao aquecimento em banho-maria a 90 °C, até ser observada uma coloração amarela mais intensa. Para se obter o extrato livre de impurezas, foi realizada uma centrifugação, procedendo-se, a seguir, a leitura em espectrofotômetro, na faixa variando de 350 a 530 nm (Lelliott e Stead, 1987).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características mais marcantes, capazes de identificar o patovar, foram o padrão do pigmento xanthomonadina, a não utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio, a proteólise do leite, hidrólise da esculina, gelatina e amido, concordando com Basu e Wallen (1966); Bradbury, (1986); Bianchini, Maringoni e Carneiro (1997), e oxidase negativa, Gram-negativas e aeróbias estritas (Tabela 4). O teste da hidrólise do amido demonstrou ser muito eficiente na caracterização de Xap e Xapf, já que se mostrou positivo para todos os isolados e negativo para alguns patovares do gênero *Xanthomonas* aqui testados.

O padrão de xanthomonadina, encontrado para os isolados de Xap, e Xapf diferenciou do perfil característico para o gênero *Xanthomonas*, que apresenta um pico em 445 nm e dois ombros a 467 e 420 nm (Lellicot e Stead, 1987), o qual foi observado para isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* provenientes de pimentão (Figura 1). O perfil observado na Figura 1 se repetiu para todos os isolados de Xap e Xapf, sendo, portanto, característico para o patovar, com uma curva decrescente apresentando três ombros suaves em aproximadamente 418, 441 e 463 nm (Figura 1), a qual foi bastante próximo dos resultados encontrados por Stephens e Starr (1963) e particularmente por Rava e Sartorato (1994), que relatam absorvância máxima a 418, 437 e 463 nm para o pigmento extraído com éter de petróleo, sem especificar a localização do pico.

TABELA 4: Características fisiológicas dos isolados submetidos a diferentes condições de cultivo e provas bioquímicas.
UFPA, Lavras-MG, 1999.

Isolado	Asparagina como fonte única de C e N	Crescimento em anaerobiose	Crescimento em aerobiose	Catalase	Crescim. mucóide	Gram	Crescim. em 0,02% C.T.T.	Crescim. em 0,1% C.T.T.	Hidrólise do Amido	Hidrólise da Esculina	Hidrólise da Gelatina	Oxidase	Pigmento escuro <i>in vitro</i>	Proteólise do leite	Temperat. máx. de desenvolv. (°C)
Xap 1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xap 2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xap 3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	38
Xap 4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xap 5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xap 6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	35
Xap 7	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xap 8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	35
Xap 9	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	35
Xap 10	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xap 11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	35
Xap 12	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	35
Xap 13	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xap 14	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	35
Xap 15	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xap 16	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	35
Xap 17	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	35
Xap 18	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xap 19	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xap 20	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	35
Xap 21	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xapf 1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xapf 2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36
Xapf 3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	37
Xapf 4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	36

...continua...

TABELA 4, Cont.

Isolado	C e N	Asparagina como fonte tónica de C e N	Crescimento em amarelosose	Crescimento em aerobiose	Catalase	Cresc. mucóide	Gram	Cresc. em 0,02% C.T.T.	Cresc. em 0,1% C.T.T.	Hidrólise do Amido	Hidrólise da Esculina	Hidrólise da Gelatina	Oxidase	Pigmento escuro in vitro	Proteólise do leite	Temperat. máx. de desconv. (°C)
Xapf 5	.	.	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xapf 6	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xapf 7	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	35
Xapf 8	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xapf 9	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	37
Xapf 10	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xapf 11	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xapf 12	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xapf 13	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xapf 14	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	35
Xapf 15	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xapf 16	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	35
Xapf 17	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	37
Xapf 18	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xapf 19	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xapf 20	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	35
Xapf 21	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xcc	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	35
Xavit	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xpass	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	36
Xav 1	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	38
Xav 2	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	35
Xav 3	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	34
Erw	+	+	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	.	+	+	42
Pcic	+	.	+	+	+	.	.	+	+	+	+	+	.	+	+	35
Rsol	+	.	+	+	+	.	.	+	+	+	+	+	.	+	+	35

+ Resultado positivo para o teste; - resultado negativo para o teste.

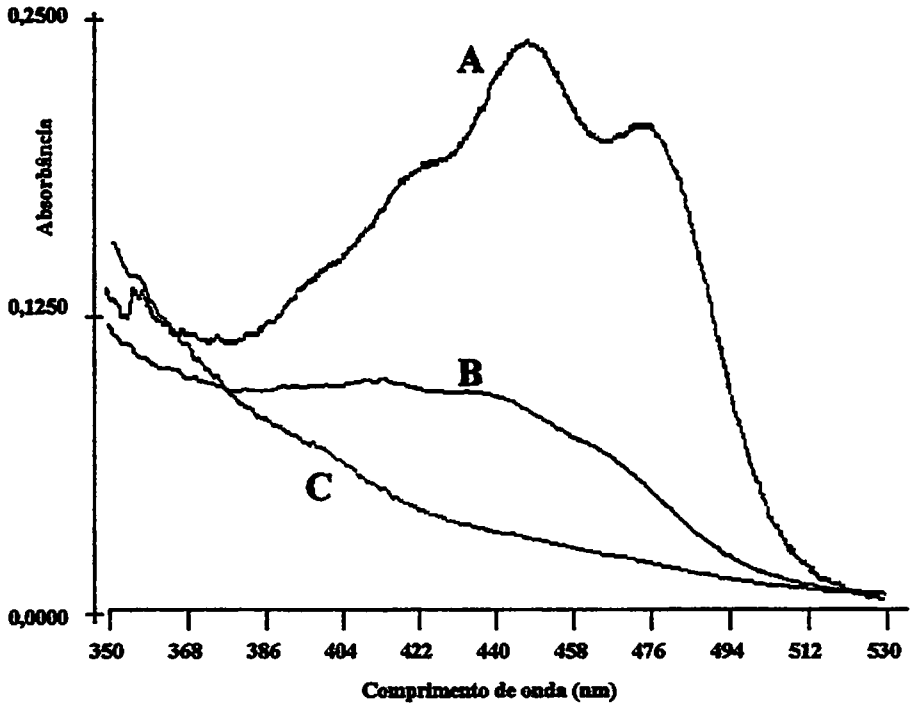


FIGURA 1- Espectro de absorção do pigmento extraído em metanol, produzido por: A= *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; B= *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (isolado Xap 14); C= *Erwinia* sp. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Estes resultados podem ser esperados, já que os perfis de absorbância não são considerados ainda totalmente característicos para o gênero, encontrando-se relatos da ocorrência de picos máximos no intervalo entre 420 a 450 nm, ou perfis apresentando pico máximo em 443 nm, com ombros ao redor de 420 e 467 nm (Klement, Rudolph e Sands, 1990, Robbs e Rodrigues Neto, 1993). Os isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* apresentaram o padrão característico para o pigmento, enquanto que os demais gêneros apresentaram perfis após a extração completamente diferentes do esperado,

conforme pode ser observado para *Erwinia* sp. (Figura 1). Diferenças quanto à intensidade do pigmento foram bastante marcantes, já que valores de absorbância entre Xap e Xav apresentaram um contraste altamente significativo.

Quanto à diversidade morfológica das colônias, foram observados dois tipos distintos característicos para a variante *fuscans* de acordo com os padrões morfológicos para colônias, citados por Klement, Rudolph e Sands (1990) (Figura 2): colônias circulares, convexas, com borda completa ou circulares, planas, com borda levemente ondulada. Colônias de Xap apresentaram um único padrão que foram colônias circulares, convexas, com borda completa. Segundo Bradbury (1984), Swings e Civerolo (1993) e Vauterin *et al.* (1995), o aspecto mucóide é condicionado pela produção da goma *xanthana*, um polissacarídeo capsular de alto peso molecular, hidrofílico e coloidal, com função na proteção de efeitos injuriosos causados pela radiação ultravioleta (Leach *et al.*, 1957), normalmente produzido em meio contendo carboidrato assimilável.



FIGURA 2- Morfologia das colônias e produção de pigmento difusível em meio de cultura. A= colônias circulares, planas, com borda levemente ondulada; B e C= colônias circulares, convexas, com borda completa; B= *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*; C= *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Para algumas bactérias, como a espécie *Ralstonia solanacearum*, a produção de cápsula é um fator relacionado com patogenicidade, característica que parece não ser observada para Xapf, já que alguns isolados, que aparentemente não o produzem com abundância, foram patogênicos a plantas de feijoeiro. O fato de serem encontradas colônias planas, atípicas, sem textura cremosa, como a maioria das *Xanthomonas*, reforça ainda mais a necessidade de serem realizados testes complementares de laboratório, não bastando a análise visual das colônias, que até para um laboratorista treinado certamente levaria a uma confusão na diagnose, possibilitando a ocorrência de erros de análise.

Os testes de tolerância ao cloreto de trifetil tetrazólio 0,1 e 0,02% também demonstraram a ineficácia da característica no processo de diagnose como observado por Robbs, Rodrigues Neto e Malavolta (1988), uma vez que

90% dos isolados se desenvolveram em meio contendo 0,02% de C.T.T. e 71% em meio com 0,1% (Tabela 4).

A temperatura máxima de crescimento foi diferente e característica para cada isolado, variando de 35 a 38 °C, sendo que, para 59%, esta temperatura foi de 36 °C. Este caráter também se demonstrou impróprio na caracterização de Xap e Xapf, pois além de ser variável entre os isolados deste patovar, não diferiu de outras espécies e patovares do gênero *Xanthomonas* (Tabela 4). Assim, os dados obtidos no presente trabalho discordam de Holt *et al.* (1994), que adotaram a temperatura máxima de 38 °C como fixa e não variável dentro de um intervalo.

Para o teste de catalase, apesar de ter apresentado resultado positivo para todos os isolados, não é uma ferramenta útil para fins de diagnose, já que o resultado positivo é comum para outras espécies de *Xanthomonas* e gêneros fitopatogênicos (Tabela 4), servindo, portanto, apenas para verificar a viabilidade da cultura bacteriana (Klement, Rudolph e Sands, 1990).

De acordo com os dados da Tabela 5, verifica-se que 100% dos isolados de Xap e de Xapf, utilizaram dezenove açúcares como fontes únicas de carbono, ou seja: α -D-glucose, ácido bromosuccínico, ácido succinâmico, ácido succínico, alaninamida, celobiose, D-alanina, D-frutose, D-galactose, D-manose, D-trealose, gentiobiose, L-alanina, L-alanilglicina, L-fucose, monometilsuccinato, sacarose, tween 40 e tween 80, e somente isolados de Xapf utilizaram em sua totalidade: dextrina, glicogênio, e, em especial, a *N*-acetil-D-glucosamina, já que este açúcar foi metabolizado por somente seis isolados de Xap (28,6% do total) contra 21 de Xapf (100%) (Tabela 5). Embora outras fontes de carbono tenham apresentado valores de utilização inferiores a 100%, usualmente são considerados como positivos percentuais na faixa de 80 a 100%, variáveis de 20 a 80%, e negativos, de 0 a 20%.

TABELA 5: Perfil de utilização de fontes únicas de carbono para diferentes bactérias. UFLA, Lavras-MG, 1999.

Fonte de Carbono	Xap (%)	Xapf (%)	Xcc	Xavt	Xpass	Xav 1	Xav 2	Pcic	Erw	Rsol
α-D-Glucose	100	100	+	+	+	+	+	+	+	-
Ácido bromosuccínico	100	100	+	-	+	-	+	+	+	-
Ácido succinâmico	100	100	+	+	+	-	-	-	+	-
Ácido succínico	100	100	+	-	+	+	-	+	+	+
Alaninamida	100	100	+	-	+	-	-	-	+	-
Celobiose	100	100	+	-	+	+	+	-	+	-
D-Alanina	100	100	-	-	+	-	-	+	+	+
D-Frutose	100	100	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Galactose	100	100	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Manose	100	100	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Trealose	100	100	+	-	+	+	-	-	+	-
Gentiobiose	100	100	+	-	+	-	-	-	+	-
L-Alanina	100	100	+	-	+	+	-	+	+	+
L-Alanilglicina	100	100	+	-	+	-	-	+	+	-
L-Fucose	100	100	+	+	+	-	-	-	+	-
Monometilsuccinato	100	100	+	-	+	+	-	-	+	-
Sacarose	100	100	+	+	+	+	+	-	+	-
Tween 40	100	100	+	+	+	-	+	+	+	+
Tween 80	100	100	+	+	+	-	+	+	+	+
Dextrina	95,2	100	+	+	+	+	+	-	+	-
Lactulose	90,5	42,9	+	-	+	-	-	-	+	-
Maltose	90,5	95,2	+	+	+	+	-	-	+	-
Metilpiruvato	90,5	90,5	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-glutâmico	85,7	85,7	+	-	+	+	-	+	+	+
Glicogênio	85,7	100,0	+	+	+	-	+	-	+	-
Ácido α-cetoglutárico	81,0	81,0	+	-	+	-	-	+	+	+
Ácido <i>cis</i> -aconítico	81,0	81,0	-	-	-	+	-	+	+	+

...continua...

TABELA 5, Cont.

Fonte de Carbono	Xap (%)	Xapf (%)	Xcc	Xavlt	Xpass	Xav 1	Xav 2	Pcic	Erw	Rsol
D-Psicose	81,0	81,0	-	+	-	+	+	-	+	-
D-Melibiose	76,2	76,2	+	-	-	-	-	-	+	-
Hidroxi-L-prolina	71,4	71,4	+	-	+	-	-	-	+	-
Ácido Glicil-L-glutâmico	66,7	66,7	-	-	+	+	-	-	+	-
Ácido acético	61,9	61,9	+	-	+	-	+	-	+	+
Ácido D-sacárico	61,9	61,9	+	-	-	+	-	+	+	+
Ácido L-aspártico	42,9	42,9	-	-	+	+	-	+	+	+
D-Rafinose	42,9	42,9	-	-	-	-	-	-	+	-
Glicerol	42,9	42,9	+	+	-	+	+	+	+	-
Ácido malônico	38,1	38,1	+	-	+	-	-	+	+	-
Ácido propiônico	33,3	33,3	+	-	+	-	-	+	+	+
D, L- α -Glicerofosfato	33,3	33,3	+	-	+	-	-	+	+	-
Glicose 1-fosfato	33,3	33,3	+	-	+	+	-	-	+	-
Glicose 6-fosfato	33,3	33,3	-	-	+	+	-	-	+	-
L-Serina	33,3	33,3	+	+	+	+	-	+	+	+
Ácido α -cetobutírico	28,6	28,6	-	-	+	-	-	-	-	-
Ácido cítrico	28,6	28,6	+	-	-	+	-	+	+	+
L-Treonina	28,6	28,6	+	-	+	-	-	-	+	+
N-Acetil- D-glucosamina	28,6	100,0	+	-	+	+	-	-	+	-
Ácido β -hidroxibutírico	23,8	23,8	-	-	-	-	-	-	+	-
Glicil-Ácido L-aspártico	23,8	23,8	-	-	-	-	-	-	+	-
Ácido urocânico	19,0	19,0	-	-	-	+	+	-	+	-
Inosina	19,0	19,0	+	-	+	+	+	+	+	+
L-Fenilalanina	19,0	19,0	-	-	-	-	-	-	+	-
Turanose	19,0	19,0	-	-	-	-	+	-	+	-
Uridina	19,0	19,0	+	-	+	-	-	+	+	-
β -Metil-D-Glucosídeo	9,5	9,5	-	-	-	+	-	-	+	-

...continua...

TABELA 5, Cont.

Fonte de Carbono	Xap (%)	Xapf (%)	Xcc	Xavit	Xpass	Xav 1	Xav 2	Pcic	Erw	Rsol
Ácido D, L-lático	9,5	9,5	-	-	-	+	-	+	+	-
L-Histidina	9,5	9,5	-	-	-	+	-	-	+	-
α -Ciclodextrina	4,8	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
α -D-Lactose	4,8	0,0	-	+	-	-	-	-	+	-
2-Aminoetanol	4,8	4,8	-	-	-	-	-	-	+	-
Ácido α -hidroxibutírico	4,8	4,8	+	-	-	-	-	-	+	-
Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	4,8	4,8	-	-	-	-	-	-	+	+
Ácido quínico	4,8	4,8	-	-	-	-	-	-	+	+
Adonitol	4,8	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
L-Prolina	4,8	4,8	+	-	+	+	-	+	+	-
2,3-Butanediol	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
Ácido γ -aminobutírico	0,0	0,0	-	-	-	-	-	+	+	-
Ácido α -cetovalérico	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido γ -hidroxibutírico	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
Ácido D-galactônico lactona	0,0	0,0	-	-	-	-	-	+	+	-
Ácido D-galacturônico	0,0	0,0	-	-	-	+	-	-	+	-
Ácido D-glucônico	0,0	0,0	-	-	-	+	-	+	+	-
Ácido D-glucosamínico	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
Ácido D-glucurônico	0,0	0,0	-	-	-	+	-	-	+	+
Ácido fórmico	0,0	0,0	+	-	-	-	-	-	+	-
Ácido itacônico	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido L-pirolutâmico	0,0	0,0	-	-	-	-	-	+	+	-
Ácido sebácico	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Arabitól	0,0	0,0	-	-	-	+	-	+	+	-
D, L-Carnitina	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Manitol	0,0	0,0	-	+	-	+	+	+	+	-
D-Serina	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	+
D-Sorbitol	0,0	0,0	-	+	-	-	-	+	+	-

...continua...

TABELA 5, Cont.

Fonte de Carbono	Xap (%)	Xapf (%)	Xcc	Xavit	Xpass	Xav 1	Xav 2	Pcic	Erw	Rsol
Fenil etilamina	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
Glucuronamida	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
L-Arabinose	0,0	0,0	-	+	-	-	+	+	+	-
L-Asparagina	0,0	0,0	-	-	-	-	-	+	+	+
L-Leucina	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ornitina	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
L-Ramnose	0,0	0,0	-	-	-	+	-	-	+	-
i-Eritritol	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
m-Inositol	0,0	0,0	-	-	-	+	-	+	+	-
N-Acetil-D-galactosamina	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
Putrescina	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
Timidina	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-
Xilitol	0,0	0,0	-	-	-	-	-	-	+	-

Valores numéricos expressos em porcentagem; + Fonte de carbono metabolizada; - Fonte de carbono não metabolizada.

Comparando com outras bactérias do gênero *Xanthomonas* utilizadas neste ensaio, o açúcar D-alanina não foi utilizado por Xcc, Xavit, Xav 1 e Xav 2; alaninamida, gentiobiose e L-alanilglicina por Xavit, Xav 1 e Xav 2.

Basu e Wallen (1966) observaram bom crescimento de Xapf em meio contendo L-arabinose, o que não foi verificado neste ensaio, e nem por Hildebrand, Hendson e Schroth (1993). Ainda verificaram crescimento pobre em D-rafinoose, que aqui propiciou o crescimento para alguns isolados e em adonitol, onde nenhum isolado de Xapf se desenvolveu. Hildebrand, Hendson e Schroth (1993) constataram, para Xap e Xapf, um desenvolvimento pobre em D-manitol, que no presente trabalho não foi utilizado, assim como em D-melibiose, aqui com crescimento para muitos isolados. Fontes como dextrina, glicogênio, celobiose, D-frutose, D-galactose, maltose, D-manose, Sacarose e D-trealose utilizados por muitos isolados no presente trabalho, também foram observados por Hildebrand, Hendson e Schroth (1993).

O perfil da atividade metabólica sobre as fontes de carbono coincidiram com a descrição da espécie *Xanthomonas axonopodis*, caracterizada por Vauterin *et al.* (1995). Não foi constatada relação entre características fisiológicas e graus de virulência, devendo-se, para isto, lançar mão de testes *in vivo* a fim de se determinar esta propriedade.

A utilização de 96% das fontes de carbono por *Erwinia* sp. demonstra a flexibilidade da bactéria em relação ao seu metabolismo, e a vulnerabilidade do sistema BiologTM para fins de diagnose, uma vez que contaminações durante o processo podem fatalmente ocasionar em erros de identificação.

7 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

a) Isolados de Xap e Xapf apresentam como características: colônias amareladas, convexas ou lisas, Gram-negativas, aeróbias estritas, perfil de xanthomonadina, extraído com metanol, caracterizado por uma curva decrescente, com ombros em aproximadamente, 418, 441 e 463 nm; resultado positivo para proteólise do leite, hidrólise do amido, esculina e gelatina; negativo para oxidase; com capacidade em utilizar 19 açúcares como fontes únicas de carbono;

b) Características fisiológicas isoladas não foram eficientes na distinção de Xap e Xapf em relação a *X. sp. pv. passiflorae*;

c) As provas bioquímicas não foram capazes de discriminar os isolados de acordo com seu grau de virulência;


d) Testes de tolerância a 0,1 e 0,02% de cloreto de trifênil tetrazólio, e temperatura máxima de crescimento, normalmente recomendados, se mostraram incapazes de caracterizar os isolados de Xap e Xapf.

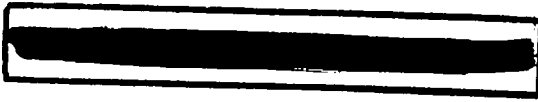
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASU, P.K. Glucose inhibition of the characteristic melanoid pigment of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v. 52, n. 10, p. 2203-2206, Oct. 1974.
- BASU, P.K.; WALLEN, V.R. Influence of temperature on the viability, virulence, and physiologic characteristics of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* *in vivo* and *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v. 44, n. 9, p. 1239-1245, Sept. 1966.
- BASU, P.K.; WALLEN, V.R. Factors affecting virulence and pigment production of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v. 45, p. 2367-2374, 1967.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3 ed. São Paulo: Ceres, 1997. v. 2, p. 376-399.
- BIOLOG (Hayward, CA). **GN Microplate: instructions for use**. Hayward, 1993. 10p.
- BRADBURY, J.F. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187.^{AL}. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 1, p. 199-210, 1984.
- BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Aberystwyth: CAB International, 1986, 332p.
- BURKHOLDER, W.H.; STARR, M.P. The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**. Pennsylvania, v. 38, n. 6, p. 494-502, June 1948.
- CLAFLIN, L.E.; VIDAVER, A.K.; SASSER, M. MXP, a semi-selective medium for of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Phytopathology**. Saint Paul, v. 77, n. 5, p. 730-734, May 1987.

- HILDEBRAND, D.C.; HENDSON, M.; SCHROTH, M.N. Usefulness of nutritional screening for the identification of *Xanthomonas campestris* DNA homology groups and pathovars. *Journal of Applied Bacteriology*. London, v. 75, n. 5, p. 447-455, Nov. 1993.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. (eds.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Maryland: Williams & Wilkins, 1994. 787p.
- FAHY, P.C.; HAYWARD, A.C. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In: FAHY, P.C.; PRESLEY, G.J. (eds.) *Plant bacterial diseases: A diagnostic guide*. Sydney: Academic Press, 1983. 393p.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. Worcester, v. 60, p. 969-976, June 1970.
- KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. (ed.) *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Akadémiai Kiado, 1990, 568p.
- JONES, J.B.; CHASE, A.R.; HARRIS, G.K. Evaluation of the Biolog GN microplate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. *Plant Disease*. Saint Paul, v. 77, n. 6, p. 553-558, June 1993.
- LEACH, J.G.; LILLY, V.G.; WILSON, H.A.; PURVIS Jr., M.R. Bacterial polysaccharides: the nature and function of the exudate produced by *Xanthomonas phaseoli*. *Phytopathology*. Saint Paul, v. 47, p. 113-120, Mar. 1957.
- LELLIOT, R.A.; STEAD, D.E. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, v. 2, 1987, 216p.
- MABGALA, R.B.; SAETTLER, A.W. An improved medium for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Plant Disease*. Saint Paul, v. 76, n. 5, p. 443-446, May 1992.
- MALIN, E.M.; ROTH, D.A.; BELDEN, E.L. Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean. *Plant Disease*. Saint Paul, v. 67, n. 6, p. 645-647, June 1983.

- MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Variabilidade sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Summa Phytopathologica*. São Paulo, v. 20, n. 3/4, p. 164-167, jul./dez. 1994.
- POPLAWSKY, A.R.; CHUN, W. Strains of *Xanthomonas* pv. *campestris* *campestris* with atypical pigmentation isolated from commercial crucifer seeds. *Plant Disease*. Saint Paul, v. 79, n. 10, p. 1021-1024, 1995.
- RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. (eds.) *Principais Doenças do Feijoeiro e seu Controle*. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 217-242, 1994.
- ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J. Taxonomia de *Xanthomonas*. In: LUZ, W.C. (ed.) *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Passo Fundo: W. C. Luz, v. 1, p. 143-164, 1993.
- ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, V.A. A impropriedade do teste de inibição pelo cloreto de trifetil tetrazólio na caracterização de espécies e patovares de *Xanthomonas*. *Fitopatologia Brasileira*. Brasília, v. 13, n. 2, p. 102, jul. 1988.
- SCHAAD, N.W. (ed.) *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 2. ed. Minnesota: APS, 1994. 163 p.
- STARR, M.P.; WEISS, J.E. Growth of phytopathogenic bacteria in a synthetic asparagin media. *Phytopathology*. Lancaster, v. 33, n. 4, p. 314-318, Apr. 1943.
- STEPHENS, W.L.; STARR, M.P. Localization of carotenoid pigment in the cytoplasmic membrane of *Xanthomonas juglandis*. *Journal of Bacteriology*. Washington, v. 86, p. 1070-1074, June 1963.
- SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (eds.) *Xanthomonas*. London: Chapman e Hall, 1993. 399p.
- SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (ed.) *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993, p. 121-156.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. London, n. 3, v. 45, p. 472-489, July 1995.

- 
- VELÁSQUEZ, N.C.; TRUJILLO, G.E. Comparacion de metodologias para la deteccion de la infeccion de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) con la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. **Agronomia Tropical**. Maracay, v. 34, n. 1/3, p. 29-41, jun. 1984a.
- VELÁSQUEZ, N.C.; TRUJILLO, G.E. Evaluacion de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. en lotes de semilla de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante la tecnica combinada del medio semi-selectivo e inmunodifusion en agar. **Agronomia Tropical**. Maracay, v. 34, n. 4/6, p. 59-67, dic. 1984b.
- VIDAVER, A.K. Clasificacion, nomenclatura e identificacion del patogeno de la bacteriosis comun dentro del grupo *Xanthomonas campestris*. **1 er Taller Internacional Sobre Bacteriosis Comun Del Frijol**. Puerto Rico, p. 6-20, feb. 1996.
- WONG, W.C. Methods for recovery and immunodetection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in navy bean seed. **Journal of Applied Bacteriology**. London, v. 71, p. 124-129, 1991.



CAPÍTULO 4

Caracterização molecular de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*

1 RESUMO

HALFELD VIEIRA, B. de A. Caracterização molecular de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. In: HALFELD VIEIRA, B. de A. Caracterização fisiológica, molecular e virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. Lavras: UFLA, 1999. p. 66-81. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)*

Visando definir nova técnica laboratorial, envolvendo a PCR na detecção de Xap e Xapf, foi testado um par de *primers* relatados como marcadores moleculares específicos na detecção destas bactérias. Cada isolado, além de outras bactérias distintas de Xap e Xapf, foi submetido à amplificação, sob regimes de temperatura diferenciados, sendo estudada também a necessidade de extração de DNA pelo método rápido alcalino além da alteração do protocolo original, onde a temperatura de anelamento dos *primers* constituiu um ponto chave nesta questão, no sucesso em detectar a bactéria. Similaridades genômicas entre Xap, Xapf e *X. a. pv. vitians* também foram observadas, devido a amplificação fraca de uma banda em *X. a. pv. vitians* com o mesmo número de pares de bases. Como dois isolados de Xap e Xapf, dentre os 42 testados, não apresentaram a banda característica com 0,73 Kb, e nenhum isolado de Xapf uma banda com 0,55 Kb, descrita na literatura como uma possibilidade, ficou demonstrada a variabilidade genômica da bactéria. Foi verificado também o efeito da temperatura na especificidade dos *primers*, já que foram obtidos resultados distintos com a alteração da temperatura de anelamento.

* Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Orientador) e Antônia dos Reis Figueira - UFLA.

2 ABSTRACT

HALFELD VIEIRA, B. de A. Molecular characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. In: HALFELD VIEIRA, B. de A. Physiological, molecular characterization and virulence of isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and its variant *fuscans*. Lavras: UFLA, 1999. p. 66-81 (Dissertation - Master Program in Phytopathology)*

Aiming to define a new laboratory technique, involving PCR in detecting Xap and Xapf, a pair of primers reported as specific molecular markers in the detection of those bacteria was tested. Each isolate, in addition to other bacteria distinct from Xap and Xapf, was submitted to amplification, under regimes of differentiated temperatures, the need for DNA extraction by the rapid alkaline method besides the alteration of the original protocol, where the annealing temperature of the *primers* constituted a fundamental point in this issue, in the success of detecting the bacterium being studied as well. Genomic similarities among Xap, Xapf and X. a. pv. vitians were also observed, due to the poor amplification of a band of in X. a. pv. vitians with the same number of base pairs. As two isolates of Xap and Xapf, out the 42 tested, did not present the characteristic band with 0.73 Kb, and no isolate of Xapf presented a band with 0.55 Kb reported in the literature as a possibility, the genomic variability of the bacterium was demonstrated. Also, the effect of the temperature in the specificity of the *primers* was verified, since different results were obtained with the alteration of annealing temperature.

* Guidance Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Major Professor) and Antônia dos Reis Figueira - UFLA.

3 INTRODUÇÃO

Técnicas moleculares em procedimentos de detecção de patógenos vêm sendo cada vez mais popularizadas como ferramentas promissoras devido a sua maior precisão em caracterizar organismos geneticamente relacionados, além de apresentarem respostas mais rápidas no processo de identificação (Louws *et al.*, 1994).

Métodos de diagnose baseados no uso de meios semi-seletivos (Velásquez e Trujillo, 1984a; Velásquez e Trujillo, 1984b), dupla difusão em gel de agar (Maringoni, Kimati e Kurozawa, 1994), apesar de serem promissores, têm como maior limitação a dificuldade em serem aplicados, devido ao trabalho que demandam, além de serem variáveis quanto a sensibilidade, especificidade e complexidade (Valarini e Menten, 1992).

Neste aspecto, alternativas envolvendo fundamentos de biologia molecular, principalmente com o uso da reação da polimerase em cadeia (PCR), vêm cada vez mais tomando espaço como técnica aplicada ao processo de identificação, tendo, como vantagem, serem mais estáveis quando comparadas a outras metodologias que envolvem mecanismos sujeitos a alterações, devido à influência de condições ambientais, como na produção de proteínas, carboidratos e lipídeos (Gilbertson *et al.*, 1989).

Visando verificar a eficiência da técnica de PCR na detecção de Xap e Xapf, foram testados dois *primers* considerados específicos para estes patógenos (Audy *et al.*, 1994; Audy *et al.*, 1996), com o objetivo de verificar sua adequação em um sistema de rotina capaz de oferecer eficiência e rapidez no processo de diagnose.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

Para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através de técnicas moleculares, existem alguns poucos trabalhos utilizando rep-PCR, que amplifica seqüências que se repetem no DNA (Louws *et al.*, 1994), hibridização com DNA (Constabel *et al.*, 1996), RAPD (Birch *et al.*, 1997), com eficiência inclusive na diferenciação de Xap e Xapf e principalmente a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) (Audy *et al.*, 1994; Audy *et al.*, 1996).

Um dos estudos mais promissores, que levou ao desenvolvimento de um par de *primers* específicos, foi efetuado por Gilbertson *et al.* (1989), que selecionaram um plasmídeo capaz de hibridizar extensivamente com o DNA total de Xap e Xapf, digerindo e clonando os fragmentos para estudos mais específicos, dentre eles um fragmento com 3,4 Kb.

Apesar deste plasmídeo hibridizar também com plasmídeo de alguns outros patovares caracterizados, como: *Xanthomonas campestris* pv. *alfafae*, *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (raças 1 e 2) e *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, o fragmento com 3,4 Kb demonstrou uma fraca hibridização com *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (raças 1 e 2), sem hibridizar com nenhum dos outros patovares. Um fato importante observado foi a não hibridização com o DNA total de bactérias do gênero *Xanthomonas* avirulentas, isoladas de restos culturais de plantas de feijoeiro, uma vantagem, já que um método capaz de detectar somente isolados virulentos é desejável.

Audy *et al.* (1994), selecionando este fragmento, o seqüenciaram parcialmente e desenvolveram um par de *primers*: X4c (24 bases) e X4e (23 bases), constatando sua eficiência em amplificar somente o DNA total de

Xap e Xapf, resultando em uma banda com 0,73 Kb, sendo que, alguns isolados de Xapf apresentaram uma banda adicional com 0,55 Kb. Segundo os autores, a sensibilidade da reação foi capaz de detectar uma única célula bacteriana, podendo inclusive ser processada a reação diretamente de folhas e sementes, com fins de diagnose em material vegetal, já que os *primers* não se anelam ao DNA de plantas de feijoeiro em condições de alta temperatura de anelamento. Além disso, os autores confirmaram esta especificidade dos *primers* em amplificar somente isolados patogênicos, como observado por Gilbertson *et al.* (1989).

Posteriormente, Audy *et al.* (1996) associaram com sucesso este par de *primers* com outros dois visando detectar, simultaneamente, Xap, Xapf e *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, ainda de ocorrência incerta no Brasil (Bradbury, 1986; Marques *et al.*, 1994; Oliveira e Souza, 1997; Yorinori *et al.*, 1998), observando capacidade em identificar uma única semente infectada em um lote de 10.000, uma ferramenta realmente promissora em processos de rotina. Porém, estudos de base envolvendo uma gama mais abrangente de isolados tornam-se necessários para torná-lo válido em programas de certificação.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Preparação dos isolados

Colônias dos isolados cultivadas por 24 horas a 28 °C, em meio 523 de Kado & Heskett (1970), foram coletadas com alça de platina e semeadas em 5,0 ml do mesmo meio desprovido de agar, contido em tubos de ensaio e incubados pelo mesmo período, à mesma temperatura, em incubadora do tipo B.O.D.

O caldo foi utilizado diretamente para reação de PCR, sem submeter as células bacterianas a qualquer tipo de extração de DNA.

5.2 Preparo da reação de polimerase em cadeia

Foi adaptado o protocolo sugerido pelo fabricante (Gibco). A mistura consistiu de 5 µl de tampão de PCR 10x; 3 µl de MgCl₂ 25 mM; 1 µl de dNTP *mix* 10 mM; 1 µl de cada *primer* (X4c (GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG) 62,89 nmoles/ml e X4e (CGC CGG AAG CAC GAT CCT CGA AG) 66,59 nmoles/ml); 0,5 µl de *Taq* DNA polimerase 5 u/µl; 5 µl do caldo inoculado com o isolado e 33,5 µl de água bi-destilada, deionizada.

O controle negativo conteve, ao invés de caldo bacteriano, água bi-destilada e deionizada.

Preparadas as misturas, estas foram levadas ao termociclador, sendo submetidas a 25 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão a 94 °C/1 min, 55 °C/2 min, 72 °C/2 min, respectivamente; com uma extensão final a 72 °C/10 min.

5.4 Eletroforese e fotodocumentação

Ao final da reação, procedeu-se a aplicação de 5 µl de cada amostra, acrescida de 2 µl do corante azul de bromofenol, em gel de agarose 0,8%, preparado com tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5 x, submetendo-se, a seguir, à eletroforese. Como marcador de bases, foi utilizado DNA marcador (GIBCO) com 1 Kb, para se determinar o tamanho dos fragmentos amplificados. Ao ser encerrada a eletroforese, o gel permaneceu imerso no corante brometo de etídio por 10 minutos, para a visualização das bandas e fotodocumentação, em luz ultravioleta.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O par de *primers* utilizado para os diferentes isolados de Xap e Xapf, outras espécies e patovares de *Xanthomonas*, além de outros gêneros fitopatogênicos, apresentaram-se eficientes na identificação do patovar (Figura 3), verificando-se a necessidade de adaptação do protocolo utilizado por Audy *et al.* (1994), uma vez que a temperatura de anelamento a 65 °C não permitiu uma repetibilidade dos resultados, ora havendo amplificação, ora não.

Reações com DNA extraído pelo método rápido alcalino (Wang e Cutler, 1993), adaptado por Audy *et al.* (1994), também foram testadas nestas condições de temperatura, tendo o mesmo efeito que reações onde não houve extração de DNA.

Por outro lado, ao ser reduzida a temperatura de anelamento para 55 °C, verificou-se a amplificação do fragmento com 0,73 Kb (Figura 3), obtendo repetibilidade dos resultados, com eficiência tanto nas reações com DNA extraído como nas reações diretamente de colônias crescidas em meio líquido. Este fato permitiu a supressão da etapa de extração de DNA, agilizando o processo sem perder eficiência.

Estas adaptações, que se mostraram necessárias, são esperadas, já que tanto as condições de reação e principalmente os isolados são distintos. Além disso, a temperatura de anelamento elevada aumenta a especificidade dos *primers*, exigindo um alto grau de homologia com o DNA bacteriano (Audy *et al.*, 1996).

Este efeito da temperatura na capacidade de amplificação foi tanto observado por Audy *et al.* (1996) como demonstrado (Figura 4) para o isolado Xap 1. Para a variante *fuscans*, não foi verificada a banda de 0,55 Kb (Figura 3), constatada por Audy *et al.* (1994) para alguns isolados, sendo mais um indicativo da variabilidade da bactéria, diferenciação que encontra uma maior

aplicação em estudos genéticos, já que tanto Xap quanto Xapf vêm apresentando características similares nos mais diversos aspectos, a não ser pela produção de melanina por Xapf em meio de cultura, propriedade facilmente distinta.

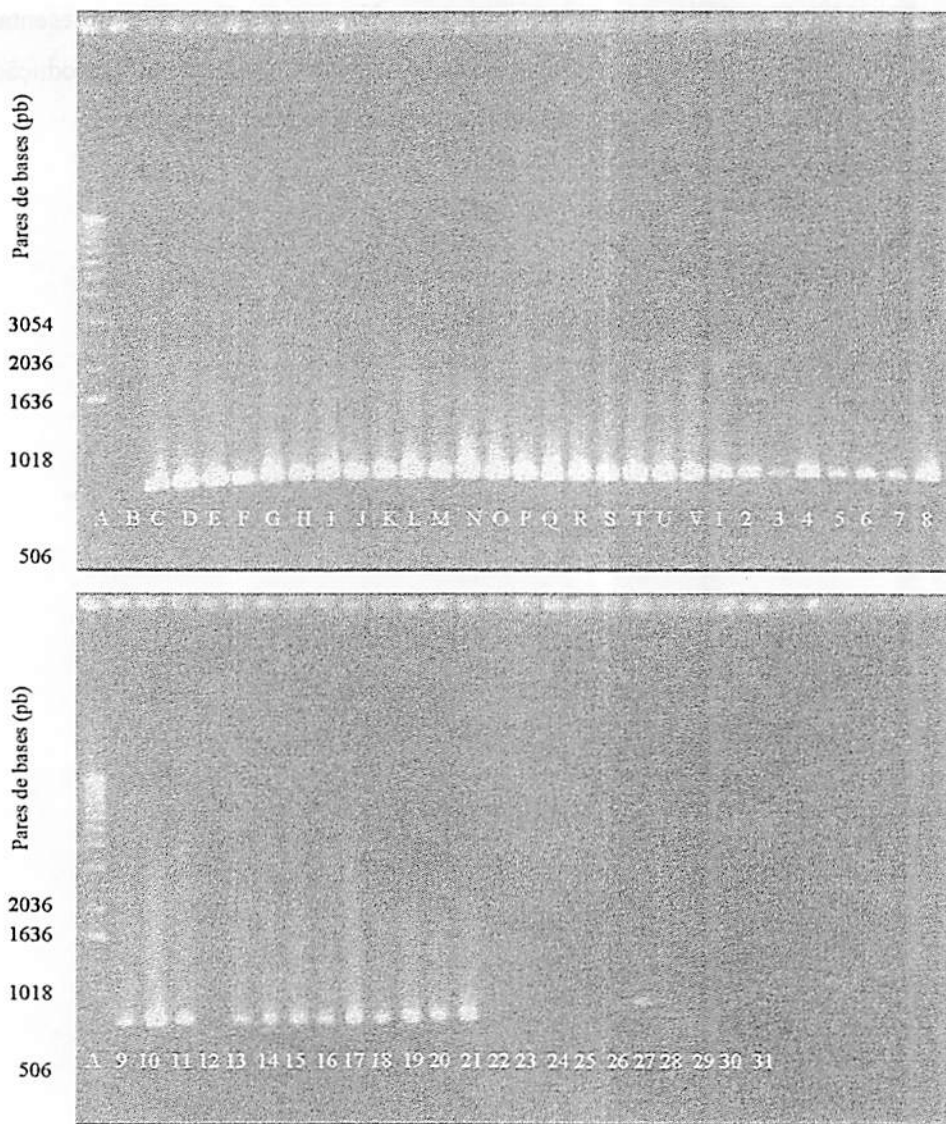


FIGURA 3- Perfil eletroforético dos produtos de amplificação pela PCR, utilizando o par de *primers* X4c e X4e, utilizando temperatura de anelamento de 55 °C.

A= Marcador de 1 Kb (Gibco); B= Xap 1; 12= Xapf 6;
 B a V= Xap; 1 a 21= Xapf; 22= Xcc; 23= Xpass; 24= Xav 3;
 25= Xav 1; 26= Xav 2; 27= Xavit; 28= Pcic; 29= Erw; 30= Rsol;
 31= Controle negativo. UFLA, Lavras-MG, 1999.

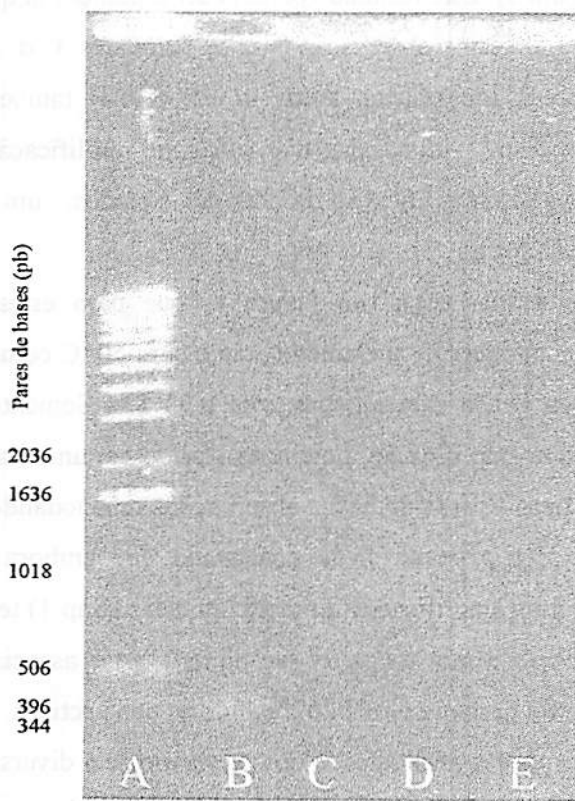


FIGURA 4- Produtos de amplificação pela PCR utilizando o par de *primers* X4c e X4e com temperatura de anelamento diferenciada.

A= Marcador de 1 Kb (Gibco); B e C= temperatura de anelamento a 45 °C; D e E= temperatura de anelamento a 50 °C; B e D= Xap 1; C e E= Xapf 6. UFLA, Lavras-MG, 1999.

O aparecimento de uma banda fraca para *X. a. pv. vitians*, com o mesmo número de pares de bases, demonstra haver um certo grau de homologia entre os patovares (Figura 3). Este resultado poderia ser esperado, já que Gilbertson *et al.* (1989) fizeram a mesma observação para os patovares *X. a. pv. carotae* e *X. a. pv. vesicatoria*. Curiosamente, Audy *et al.* (1994) também utilizaram dois isolados de *X. a. pv. vitians*, que não sofreram amplificação. Outro resultado verificado foi a não amplificação de dois dos isolados, um de Xap (Xap 1) e outro de Xapf (Xapf 6).

É interessante notar, na Figura 4, que para estes isolados, mesmo reduzindo a temperatura de anelamento, tanto para 50 °C como 45 °C, não houve amplificação da banda característica com 0,73 Kb. Somente o isolado Xap 1 sofreu uma tênue amplificação, porém resultando em uma banda com 0,396 Kb não característica. Apesar de haver observações relacionando patogenicidade e especificidade dos *primers*, ficou constatado que embora patogênicos, dois isolados não foram amplificados. Embora um deles (Xap 1) tenha se apresentado o menos virulento dentre todos, o que poderia estar associado a este fator, o outro (Xapf 6) foi bastante virulento, fugindo às perspectivas.

Através destes resultados, o que se verifica é a diversidade que pode ser encontrada em bactérias, fazendo com que seja necessária uma busca constante de metodologias de caracterização, já que exceções freqüentemente são observadas, não se verificando regras fixas e sim tendências seguidas pela grande maioria dos isolados, fato que torna necessária a utilização não só de uma única ferramenta, mas sim de diversas técnicas, que, combinadas (ou em conjunto), são capazes de oferecer segurança no processo de diagnose.

7 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

a) Os *primers* X4c e X4e demonstraram eficiência na identificação de Xap e Xapf,

b) Existe um certo grau de homologia entre a região do plasmídio amplificada entre Xap e Xapf em relação a *X. a. pv. vitians*;

c) Diferenças na temperatura de anelamento influenciam na especificidade dos *primers* utilizados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUDY, P.; LAROCHE, A.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; GILBERTSON, R.L. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* pv. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*. Saint Paul, v. 84, n. 10, p. 1185-1192, Oct. 1994.
- AUDY, P.; BRAAT, C.E.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology*. Saint Paul, v. 86, n. 4, p. 361-366, Apr. 1996.
- BIRCH, P.R.J.; HYMAN, L.J.; TAYLOR, R.; OPIO, A.F.; BRAGARD, C.; TOTH, I.K. RAPD PCR-based differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. *European Journal of Plant Pathology*. Netherlands, v. 103, n. 9, p. 809-814, Dec. 1997.
- BRADBURY, J.F. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Aberystwyth: CAB International, 1986, 332p.
- CONSTABEL, E.C.; MICHAELS, T.E.; GOODWIN, P.H.; MAYER, J.E.; PASTOR CORRALES, M.A. Evaluation of a DNA probe for the quantitative detection of common bacterial blight in common bean and its application in a breeding program. *Euphytica*. Wageningen, v. 90, p. 129-135, Oct. 1996.
- GILBERTSON, R.L.; MAXWELL, D.P.; HAGEDORN, D.J.; LEONG, S.A. Development and application of a plasmid DNA probe for detection of bacteria causing common bacterial blight of bean. *Phytopathology*. Saint Paul, v. 79, n. 5, p. 518-524, May 1989.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. Worcester, v. 60, p. 969-976, June 1970.
- LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; BRUIJN, F.J. de Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and

PCR. Applied and Environmental Microbiology. Washington, v. 60, n. 7, p. 2286-2295, July, 1994.

MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROSZAWA, C. Variabilidade sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Summa Phytopathologica. São Paulo, v. 20, n. 3/4, p. 164-167, jul./dez. 1994.

MARQUES, A.S.dos A.; ROBBS, C.F.; BOITEUX, L.S.; PARENTE, P.M. Índice de Fitobacterioses Assinaladas no Brasil. Brasília: EMBRAPA, 1994. 65p.

OLIVEIRA, J.R.de; SOUZA, R.M.de. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) controle de doenças causadas por bactérias. In: VALE, F.X.R. do; ZAMBOLIM, L. (eds.) Controle de Doenças de Plantas de Grandes Culturas. Viçosa: Ministério da Agricultura, 1997. Cap.7. p.423-435.

VALARINI, P.J.; MENTEN, J.O.M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: método para detecção em sementes de feijão. Fitopatologia Brasileira. Brasília, v. 17, n. 4, p. 373-383, nov. 1992.

VELÁSQUEZ, N.C.; TRUJILLO, G.E. Comparacion de metodologias para la deteccion de la infeccion de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) com la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. Agronomia Tropical. Maracay, v. 34, n. 1/3, p. 29-41, jun. 1984a.

VELÁSQUEZ, N.C.; TRUJILLO, G.E. Evaluacion de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. en lotes de semilla de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante la tecnica combinada del medio semi-selectivo e inmunodifusion en agar. Agronomia Tropical. Maracay, v. 34, n. 4/6, p. 59-67, dic. 1984b.

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A.J. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acid Research. Oxford, v. 21, n. 17, p. 4153-4154, 1993.

YORINORI, M.A.; FUNADA, C.K.; RODRIGUES, R.; BIANCHINI, A.; LEITE JÚNIOR, R.P.; UENO, B. Ocorrência do crestamento bacteriano aureolado do feijoeiro causado por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* no Estado do Paraná. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 31, 1998, Fortaleza. Fitopatologia Brasileira. Brasília, v. 23, ago. 1998. p. 218. Suplemento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Analizando todas as variáveis em conjunto, o que se pode verificar é que não existe um único teste capaz de identificar isolados de Xap e Xapf. Apesar da planta hospedeira da qual o isolado foi obtido e das características em meio de cultura serem fortes indicativos da identidade da bactéria, erros podem ser cometidos utilizando unicamente como suporte a análise visual, de acordo com a experiência de quem o efetua.

De acordo com a disponibilidade de equipamentos e reagentes, a técnica de PCR se verifica a mais simples, oferecendo rapidez no resultado. Porém, a constatação de que alguns isolados podem não ser amplificados demanda alguns testes auxiliares, o que provavelmente não é necessário caso haja amplificação da banda com 0,73 Kb, se apresentando intensa.

Dentre os testes bioquímicos, um dos mais simples foi a hidrólise de amido, caracterizando-se como bastante seguro e capaz de diferenciar outras bactérias amareladas de Xap e Xapf. Esta característica, além de outras observadas, pode fornecer segurança nas diagnoses em laboratórios com menor disponibilidade de recursos, já que a diversidade dos testes aqui demonstrada pode se adequar de acordo com as condições de cada um.

Finalmente, volto a frisar a importância de se determinar o hospedeiro de onde a bactéria foi isolada, já que a combinação tanto de características fisiológicas como moleculares, se torna dependente deste. Afinal, a classificação em patovares é dependente da gama de hospedeiros em que a bactéria é capaz de causar enfermidade, devendo sempre levar esta propriedade em consideração.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A	Origem e classificação de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> e sua variante <i>fuscans</i> de acordo com o grau de virulência, segundo agrupamento de médias da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). UFLA, Lavras-MG, 1999. 25
TABELA 2A	Dados climatológicos dos locais de procedência dos diferentes isolados de <i>Xanthomonas</i> (Xap e Xapf), classificados em ordem crescente de virulência (Grupos). UFLA, Lavras-MG, 1999. 26
TABELA 3A	Reação de hipersensibilidade em plantas de fumo (<i>Nicotiana tabacum</i>), pimentão (<i>Capsicum annuum</i>) e tomateiro (<i>Lycopersicon esculentum</i>), após infiltração de suspensão de Xap e Xapf. UFLA, Lavras-MG, 1999. . 28
TABELA 4A	Características fisiológicas dos isolados submetidos a diferentes condições de cultivo e provas bioquímicas. UFLA, Lavras-MG, 1999. 50
TABELA 5A	Perfil de utilização de fontes únicas de carbono para diferentes bactérias. UFLA, Lavras-MG, 1999. 56

- FIGURA 1B** Espectro de absorção do pigmento extraído em metanol, produzido por: A= *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; B= *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (isolado Xap 14); C= *Erwinia* sp. UFLA, Lavras-MG, 1999. 52
- FIGURA 2B** Morfologia das colônias e produção de pigmento difusível em meio de cultura. A= colônias circulares, planas, com borda levemente ondulada; B e C= colônias circulares, convexas, com borda completa; B= *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*; C= *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. UFLA, Lavras-MG, 1999. 54
- FIGURA 3B** Perfil eletroforético dos produtos de amplificação pela PCR, utilizando o par de *primers* X4c e X4e, utilizando temperatura de anelamento de 55 °C. A= Marcador de 1 Kb (Gibco); B=Xap 1; 12= Xapf 6; B a V= *X. a.* pv. *phaseoli*; 1 a 21= *X. a.* pv. *phaseoli* var. *fuscans*; 22= Xcc; 23= Xpass; 24= Xav 3; 25= Xav 1; 26= Xav 2; 27= Xavit; 28= Pctic; 29= Erw; 30= Rsol; 31= Controle negativo. UFLA, Lavras-MG, 1999. 76
- FIGURA 4B** Produtos de amplificação pelo PCR utilizando o par de *primers* X4c e X4e com temperatura de anelamento diferenciada. A= Marcador de 1 Kb (Gibco); B e C= temperatura de anelamento a 45 °C; D e E= temperatura de anelamento a 50 °C; B e D= Xap 1; C e E= Xapf 6. UFLA, Lavras-MG, 1999. 77