**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para detecção de
Xanthomonas axonopodis pv. *malvacearum* em sementes de algodão
(*Gossypium hirsutum* L.)**

Cleci Dezordi

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia**

**Piracicaba
2006**

Cleci Dezordi
Engenheiro Agrônomo

Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)

Orientador:

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2006**

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

Dezordi, Cleci

Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) / Cleci Dezordi. - - Piracicaba, 2006.

95 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Algodão 2. Bactéria fitopatogênica 3. Mancha angular 4. Meio de cultura
5. Sementes I. Título

CDD 633.51

Dedico este trabalho a duas pessoas especiais na minha vida. Minha amiga Dora Marchiori Neves, que me incentivou a buscar novos horizontes e, conseqüentemente, fazer o doutorado, e ao conselheiro de todas as horas, Antonio Carlos Maringoni, pelo apoio e paciência a mim dedicados ao longo desta jornada.

Ofereço aos meus queridos pais, Adivino e Maria, e aos irmãos, Dirceu e Eduardo, à sobrinha, Raphaella, e às cunhadas, Célia e Mari, pelas palavras de carinho e incentivo em todos os momentos, pela constante presença, ainda que distantes fisicamente. Ofereço, também, ao meu esposo Paulo César (PC), que sempre me incentivou a seguir meu caminho profissional.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos às pessoas e instituições que tornaram possível a realização deste trabalho:

Ao Prof. Dr. José O. M. Menten, pela confiança depositada, amizade e orientação;

Aos Profs. Dr. Sérgio F. Pascolati, Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo e Dr. Nelson Massola, pelas sugestões no exame geral de qualificação;

Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, *in memoriain*, pela boa convivência e pelos ensinamentos transmitidos;

À Dra. Maria Heloísa Duarte de Moraes, um agradecimento especial, pelo apoio irrestrito durante o projeto;

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni, pelo acolhimento, amizade e orientação durante o período de trabalho no Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP/FCA, Botucatu, SP;

A Renata de Cássia Câmara e Sandra C. Vigo-Schultz, pelo apoio em trabalhos de campo e laboratório e, sobretudo, pela amizade;

Ao Dr. Luis Otávio V. Berian do Instituto Biológico – Campinas/SP, pela doação do antissoro utilizado neste trabalho;

Ao Dr. Júlio Rodrigues Neto do Instituto Biológico – Campinas/SP, pela doação dos isolados bacterianos utilizados nesta pesquisa;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realização do curso de doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Prof. da UFPel, Carlos Roberto Pierobom, pela excelente convivência no período de 2000 a 2002, e pelos ensinamentos e incentivos que só um grande amigo pode dar.

Aos Profs. da UNESP/FCA Edson Luiz Furtado e Nilton Luiz de Souza pela atenção, confiança, carinho e lições de vida durante todo o tempo de convivência.

Aos colegas e amigos da ESALQ e de Piracicaba, Gleiber Q. Furtado, Paulo Albuquerque e Nathália Albuquerque, Roberta e Thomas Gloaguen, Graziela e Gustavo Guapo, Alexandre (Jiló) e Carla, e aos amigos da UNESP/FCA de Botucatu, Renata (em especial, por me ajudar sempre de bom humor), Débora e Fábio, Sandra, Tati e Cecília Toshie Ohto . Aos meus queridos

amigos “viçosenses”, Wanderlei e Dorinha, que sempre, de uma forma ou de outra, tornaram minha vida mais completa.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ: Fernanda e Rodolfo, Jéferson e Marina, pelo apoio sempre que precisei.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária da UNESP/FCA: Renata de Cássia Camara, Tatiana Paulossi; Claudio Luiz da Cruz e Norberto Vaz de Carvalho.

Mais uma vez, agradeço à minha família, e em especial ao meu esposo Paulo César Teixeira, exemplo de sensatez, paciência e amor.

À turminha de pêlos, Luna e Rosinha, sempre de rabinho balançando, chova ou faça sol.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
1 INTRODUÇÃO	16
2 DESENVOLVIMENTO.....	18
2.1 Revisão bibliográfica	18
2.1.1 A cultura do algodão no Brasil.....	18
2.1.2 A importância das doenças e da mancha angular na cultura do algodão.....	18
2.1.3 Etiologia, sintomatologia e condições predisponentes.....	19
2.1.4 Controle da mancha angular e suas implicações na produção de algodão	22
2.1.5 Metodologias de detecção de fitobactérias em sementes.....	24
2.2 Material e Métodos.....	30
2.2.1 Local e época de realização do experimento	30
2.2.2 Origem, preservação e cultivo de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	30
2.2.3 Caracterização dos isolados bacterianos para a determinação da espécie.....	31
2.2.3.1 Teste de coloração de Gram	31
2.2.3.2 Teste de KOH.....	31
2.2.3.3 Meio YDC	32

2.2.3.4 Patogenicidade em plântulas de algodoeiro	32
2.6.5 Isolamento de fungos associados a sementes de algodão	33
2.2.4 Ação de antibióticos <i>in vitro</i> na inibição do crescimento de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	33
2.2.4.1 Antibiograma qualitativo.....	33
2.2.4.2 Antibiograma quantitativo	35
2.2.5 Ação <i>in vitro</i> de misturas de antibióticos adicionados ao meio de cultura sobre crescimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	35
2.2.6 Efeito de fungicidas adicionados ao meio de cultura nutriente sacarose ágar (NSA), sobre o crescimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	36
2.2.7 Efeito de fungicidas adicionados ao meio de cultura nutriente sacarose ágar (NSA) sobre o crescimento de fungos isolados de sementes de algodão.....	37
2.2.8 Ação <i>in vitro</i> de diferentes antibióticos misturados com fungicidas e adicionados no meio de cultura, sobre o crescimento de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	39
2.2.9 Ação de antibióticos e fungicidas sobre bactérias saprófitas associadas às sementes de algodão.....	39
2.2.10 Determinação de repressão de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> no meio de cultura semi-seletivo	40
2.2.11 Determinação da sensibilidade do isolamento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes de algodão no meio de cultura NSA modificado.....	41
2.2.12 Isolamento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em sementes produzidas em campos comerciais com ocorrência da mancha angular.....	42

2.2.13 Caracterização e identificação de isolados bacterianos de sementes de algodão, suspeitos de serem <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	44
2.2.13.1 Teste de patogenicidade	44
2.2.13.2 Teste de coloração de Gram	44
2.2.13.3.10.3 Teste de KOH.....	45
2.2.13.4 Hidrólise da esculina	45
2.2.13.5 Catalase	45
2.2.13.6 Teste de redução de nitrato a nitrito.....	46
2.2.13.7 Teste de crescimento a 40°C	46
2.2.13.8 Teste de hidrólise de gelatina.....	46
2.2.13.9 Teste de ação sobre leite Litmus.....	47
2.2.13.10 Testes sorológicos.....	47
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
2.3.1 Caracterização dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	49
2.3.2 Sensibilidade qualitativa <i>in vitro</i> de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> a diferentes antimicrobianos	50
2.3.3 Sensibilidade quantitativa <i>in vitro</i> de diferentes isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> a diferentes concentrações e combinações de antibióticos	58
2.3.4 Avaliação <i>in vitro</i> da ação de diferentes fungicidas adicionados no meio cultura NSA quanto ao crescimento de Xam	62
2.3.5 Ação de fungicidas adicionados ao meio de cultura NSA no crescimento de diferentes fungos.....	64

2.3.6 Ação de diferentes antibióticos e fungicidas adicionados ao meio de cultura NSA sobre o crescimento de Xam e de bactérias saprófitas	68
2.3.7 Determinação de índice de repressão.....	71
2.3.8 Capacidade de Xam hidrolisar amido e Tween 80	72
2.3.9 Sensibilidade de detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> de subamostras de sementes de algodão utilizando meio de cultura semi-seletivo	74
2.3.10 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> de sementes algodão produzidas em campos que apresentaram sintomas de mancha angular	75
2.3.11 Caracterização e identificação de isolados bacterianos de sementes de algodão, suspeitos de serem <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	78
3 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS	85

RESUMO

Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)

Um dos principais fatores limitantes da produção de algodão é a ocorrência de doenças e, entre os patógenos mais importantes estão às bactérias, que causam danos significativos à cultura. A doença conhecida como mancha angular, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), é uma doença grave, que tem gerado grande preocupação dos produtores. Porém, muitos cultivares com boas características agronômicas apresentam suscetibilidade ao patógeno e, poucos são aqueles que apresentam resistência à doença. O controle da mancha angular é realizado basicamente com uso de resistência genética ao patógeno. Uma das principais fontes de inóculo para esta bactéria é a semente infectada. Este trabalho objetivou o desenvolvimento de um meio semi-seletivo para o isolamento de Xam em sementes de algodão, visando a utilização em análises de rotina em laboratórios de patologia de sementes. O meio de cultura semi-seletivo possui a seguinte constituição: 3 g de extrato de carne; 5 g de peptona; 10 g de amido solúvel; 10 mL de Tween 80; 0,25 g de cloreto de cálcio; 150 µL de solução de cristal violeta a 1%; 50 mg de cefalexina; 10 mg de clorothalonil; 10 mg de tiofanato metílico e água destilada por 1000 mL. Este meio de cultura possui baixa repressividade a Xam e permite isolar este patógeno de sementes de algodão.

Palavras-chave: Meio de cultura, Algodão, bactéria fitopatogênica, Mancha angular.

ABSTRACT

Development of a semi-selective medium to detection *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* from cotton seeds (*Gossypium hirsutum* L.)

One of the main limiting factors of the cotton production is the occurrence of diseases. The bacteria are among the most important pathogens causing significant losses in the production. Cotton bacterial blight is caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam). Is a serious disease that affects cotton and has worried world producers. The main source of inoculum for this bacterium is the infected seed. This work had as objective the development of a semi-selective medium to detect *Xanthomonas axonopodis* pv *malvacearum* in cotton seeds for routine tests in seed pathology laboratories. By fungitoxicity tests, basead on qualitative and quantitative antibiograms, it was idealized a semi-selective medium with the folloing composition: peptone (5.0 g/L); agar (15.0 g/L); meat extract (3.0 g); starch (10.0 g/L); violet crystal (150.0 µL violet crystal solution at 1%); water (1,000 mL); CaCl₂ (0.25 g); Tween 80 (10.0 mL/L). This medium has small effect on Xam and allows to isolate cotton seeds pathogens.

Keywords: Cotton, Bacterial phytopathogenic, Bacterial blight, Seeds, Medium.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Antibiógrama qualitativo com isolado IB 12.392 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a diferentes antibióticos em discos de papel filtro sobre meio de cultura, após incubação. 52**
- Figura 2 – Crescimento de quatro isolados bacterianos saprófitas (I, III, V e VII) de sementes de algodão e de um isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (IB 12.430) em meio de cultura semi-seletivo (MSS) com adição do antibiótico cefalexin e dos fungicidas tiofanato metílico e clorothalonil e em meio de cultura NSA. 71**
- Figura 3 – Hidrólise de amido e de Tween 80 por colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em meio semi-seletivo, após incubação por 36 horas à 28 °C. 73**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> utilizados para o desenvolvimento de método de detecção em sementes de algodão	30
Tabela 2 – Diferentes antibióticos e concentrações, utilizadas no bioensaio de difusão em meio de cultura	34
Tabela 3 – Antibióticos utilizados para a realização do antibiograma quantitativo.....	35
Tabela 4 – Fungicidas utilizados para avaliação de fungitoxidade a Xam em meio de cultura nutriente sacarose ágar (NSA)	37
Tabela 5 – Fungicidas utilizados para avaliação de fungitoxicidade em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA).....	37
Tabela 6 – Caracterização de amostras de sementes de algodão utilizadas para detectar <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em meio de cultura semi-seletivo desenvolvido.....	43
Tabela 7 – Procedimento para a extração de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> de sementes de algodão com e sem linter	44
Tabela 8 – Características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e patogênicas de cinco isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	50
Tabela 9 – Halo de inibição de crescimento e reação de sensibilidade ou resistência de cinco isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> a diferentes antibióticos e concentrações, por meio de antibiograma qualitativo.....	55
Tabela 10 – Sensibilidade de cinco isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> (Xam) sob diferentes concentrações de antibióticos designados eficientes pelo antibiograma qualitativo em meio nutriente sacarose ágar (NSA)	60

Tabela 11 – Sensibilidade crescimento de cinco isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> (Xam) em diferentes concentrações de oxacelin no meio de cultura basal (NSA)*	62
Tabela 12 – Sensibilidade isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> (Xam) após a incorporação conjunta de diferentes antibióticos ao meio de cultura NSA	62
Tabela 13 – Ação <i>in vitro</i> de diferentes concentrações de fungicidas no crescimento de cinco isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> (Xam)	63
Tabela 14 – Fungitoxicidade <i>in vitro</i> em 11 fungos frequentemente associados a sementes de algodão.....	67
Tabela 15 – Caracterização de diferentes isolados bacterianos frequentemente associados a sementes de algodão	68
Tabela 16 – Ação <i>in vitro</i> de diferentes antibióticos e fungicidas, em diferentes concentrações, adicionados ao meio de cultura basal, no crescimento de doze isolados bacterianos frequentemente associados a sementes de algodão e de cinco isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	70
Tabela 17 –Número de unidades formadoras de colônias (UFC), e repressão de crescimento de diferentes isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> no meio semi-seletivo (MSS) e no meio basal nutriente sacarose ágar (NSA).....	72
Tabela 18 – Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> (Xam), com e sem centrifugação do líquido previamente macerado de sementes de algodão artificialmente inoculada e teste de patogenicidade de Xam.....	75
Tabela 19 – Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em macerados de amostras de sementes de algodão, com e sem centrifugação, por meio do uso de meio de cultura semi-seletivo desenvolvido.....	73

Tabela 20 – Características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, sorológica e patogênica de 19 isolados suspeitos de serem *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* provenientes de sementes de algodão naturalmente infectadas/contaminadas 82

1 INTRODUÇÃO

O algodão está entre as plantas mais cultivadas no mundo. Existem muitos fatores que podem interferir na qualidade de sementes de algodão, entre estes estão os agentes de doenças bióticas representados pelos mais diversos patógenos. Dentre as muitas moléstias que o produtor de algodão precisa se ater está a mancha angular, causada por uma bactéria que pode ser veiculada pelas sementes produzidas em plantas com ou sem sintomas da enfermidade.

O agente causal desta bacteriose é *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* que normalmente se localiza na parte externa aderida ao linter das sementes, na superfície ou em rachaduras, na chalaza e no embrião (BRINKERHOFF; HUNTER, 1963). A *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) pode permanecer viável por até 56 meses na semente (CASSETARI NETO; MACHADO, 2000a), fazendo com que a semente se constitua em uma das principais fontes da contaminação de lavouras com ausência deste patógeno.

Estudos epidemiológicos se fazem necessários para este patossistema, porém, segundo Cia e Fuzatto (2000), as condições ambientais exigidas para o desenvolvimento de uma epidemia de mancha angular na lavoura são as mesmas requeridas pela cultura do algodão, e perdas provocadas por doenças na cultura do algodão podem atingir os patamares de 15%. O controle desta doença é feito unicamente com uso de cultivares resistentes, pois o controle a base de antibióticos é de custo elevado e de eficiência duvidosa. Segundo Menten et al. (2005), não existem produtos químicos com registro que viabilizem a prática de controle curativo, ou seja, quando a doença já está implantada na área. A utilização de sementes sadias é uma das práticas recomendadas para o controle e prevenção de doenças bacterianas, cujos patógenos são transmitidos por sementes (CASSETARI NETO; MACHADO, 2000b). Neste contexto, a necessidade de verificação da presença desta bactéria em lotes de sementes é um dos recursos que podem auxiliar o produtor na escolha deste insumo, com maior probabilidade de resultar em um campo de produção economicamente viável. Porém, para avaliar a sanidade de um lote de sementes é necessária a disponibilidade de metodologias adequadas para tal finalidade.

A busca de alternativas de avaliação da qualidade de sementes é constante, principalmente na área de sanidade. Atualmente, existem muitos métodos em fitopatologia que podem detectar a presença do patógeno de diversas etiologias, porém, poucos são aqueles que oferecem possibilidades de uso em grande escala, ou seja, em rotina nos laboratórios de sanidade vegetal. Neste contexto, justificam-se os estudos de metodologias que visem uma performance

maior na detecção, quantificação e identificação do patógeno presente em sementes, imprescindível na redução da incidência de doenças economicamente importantes, prevenindo, assim, grandes epidemias e prejuízos na cotonicultura.

Os métodos que são aceitos mundialmente para a detecção envolvem dois passos principais: extração da bactéria das sementes e sua detecção e identificação. Deve-se ter em mente que a sensibilidade de qualquer método diminui à medida que aumenta a incidência de bactérias saprófitas (SHEPPARD; ROTH; SAETTLER, 1989).

Para as atuais condições brasileiras, em termos de detecção de patógenos em sementes em nível de rotina, é de fundamental importância que pesquisas sejam direcionadas para o desenvolvimento de métodos que ofereçam alta sensibilidade e confiabilidade aliada à rapidez dos resultados, mas com o menor custo financeiro possível de detecção. Laboratórios podem utilizar muitas combinações de técnicas de detecção, porém, os resultados finais precisam ser os mesmos em todos.

É consenso da comunidade científica envolvida com patologia de sementes de algodão, que a extração de bactérias, pelo método da maceração de sementes em líquidos pode ser afetada por microrganismos contaminantes que dificultam a identificação do patógeno. Entretanto, este problema pode ser solucionado por meio do uso de meios semi-seletivos, pois este tipo de meio de cultura aumenta as possibilidades de isolamento de Xam.

A busca por excelência de um meio de cultura para detectar bactérias em sementes está na padronização e validação de todos os testes realizados, bem como na seleção de antibióticos de fácil manuseio, custo baixo e com ampla disponibilidade no mercado agro-químico ou farmacêutico nacional para a elaboração e confecção de um meio de cultura semi-seletivo de fácil preparo, barato e eficiente. Com isso, busca-se contribuir com uma alternativa possível de se adotada, em nível de rotina, pelos laboratórios de sanidade de sementes no Brasil, a fim de realização de diagnose de Xam em sementes e, conseqüentemente, a seleção de lotes livres dessa bactéria, assegurando, assim, ao produtor de algodão, a tranquilidade de estar implantando uma lavoura com um insumo de maior qualidade sanitária.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e disponibilizar uma alternativa sensível e eficiente de detecção de Xam em sementes de algodão, com capacidade de detectar sementes infestadas e infectadas com este patógeno.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 A cultura do algodão no Brasil

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das mais antigas espécies vegetais cultivadas no mundo e uma das mais importantes, por se constituir na principal fibra têxtil utilizada pelo homem. O USDA (*United States Department of Agriculture*) aponta que serão colhidos mundialmente uma área na safra 2005/06, estimada em 34,9 milhões de hectares e, os principais países produtores são a China, Estados Unidos da América, Índia e o Ubezkistão (CONAB, 2006).

O Brasil era importador de algodão na década de 1990 e passou atualmente a ser exportador do produto, e a China é o país que mais importa algodão do Brasil. A expansão se deu, principalmente, no Estado de Mato Grosso, responsável por metade da produção brasileira, com a inserção do grande produtor à cultura do algodão, utilizando novas áreas e tecnologia, que proporcionaram grande aumento de produtividade, passando de 1.117 kg/ha em 1994 para 3.101 Kg/ha em 2006 (NEUMANN, 2001). Segundo CONAB (2006), a safra de 2005/06 será de 2.465,7 mil toneladas de algodão no Brasil.

O Brasil, atualmente, é o quarto exportador mundial, atrás dos EUA e do Usbequistão e da Austrália, e deverá tornar-se o segundo maior exportador de algodão no mundo até a safra 2015/16. Entretanto, para atingir este patamar é preciso tecnificar ainda mais o cultivo, incorporando novas práticas agrícolas que possam aumentar a produtividade e reduzir as perdas (CONAB, 2006).

2.1.2 A importância das doenças e da mancha angular na cultura do algodão

Entre os fatores que limitam o rendimento do algodoeiro, destacam-se as doenças causando cerca de 15% de danos (GONDIM; BELOT; MICHEL, 1996). Na literatura são relatados muitos patógenos na cultura do algodoeiro, dos quais 90% são fungos, além de 16 vírus, dois fitoplasmas, 10 nematóides e uma bactéria (CIA; SALGADO, 1997). No Estado de Mato Grosso, as doenças fúngicas mais importantes são a ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e o falso oídio ou mancha de ramulária, causada pelo fungo *Ramularia areola* (CIA; ARAÚJO, 1999).

Entre as doenças, uma das mais importantes é a bacteriose ou cretamento bacteriano, também chamado de mancha angular, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), que ocorre de forma generalizada em todas as regiões produtoras no mundo, causando sintomas em toda a planta. É uma doença de importância econômica para o Brasil e sua severidade depende de fatores climáticos e da cultivar (ZADONÁ et al., 2005). Não há registros na literatura de dados consistentes sobre perdas na produtividade de algodão brasileiro provocadas por este agente patogênico, porém, os maiores danos provocados pela mancha angular no algodoeiro têm sido registrados nos Estados da região Centro-oeste e em alguns Estados da região Nordeste (CASSETARI NETO; MESQUITA NETO; SANTOS, 2001; CIA; FUZATTO, 1999). Atualmente, a mancha angular do algodoeiro vem se constituindo em grave problema para a cultura do algodão na região Centro-Oeste, tendo causado grandes perdas (FREIRE; FARIAS; AGUIAR, 1999). É considerada, também, importante no Estado do Paraná e do Mato Grosso, demandando medidas de controle, e de mediana importância em nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, necessitando precauções e estudos (CIA; FUZATTO, 2000).

A bactéria pode ser transmitida da semente para a planta. No entanto, até agora não existem métodos apropriados para erradicar a bactéria das sementes. A doença não é satisfatoriamente controlada por produtos químicos, sendo que, seu controle depende de sementes saudáveis e resistência varietal (ZADONÁ et al., 2005). Atualmente, existem algumas cultivares resistentes, tais como Delta OPAL, EPAMIG Liça e Fibermax 986 (FREIRE et al., 1999; METHA et al., 2005). Porém, há demanda por parte dos produtores por informações sobre controle da mancha angular, devido a variedade mais plantada no Brasil (Delta Pine, Acala 90 e ITA 90) ser suscetível, ocasionando o aumento da incidência desta doença nos últimos anos (SIQUERI, 2005).

2.1.3 Etiologia, sintomatologia e condições predisponentes

Segundo o manual de Bergey (KRIEG; HOLT, 1984), em sua 9ª edição, espécies do gênero *Xanthomonas* (do grego “xanthos” = amarelo; “monas” = unidade) são vistas ao microscópio ótico como bastonetes retos, isolados, medindo 0,4 a 0,7 x 0,7-1,8 micra, e são móveis por meio de um flagelo polar. As espécies conhecidas do gênero, em condições de patogenicidade, são fitopatogênicas.

Em isolamentos quando em cultura pura as colônias são geralmente amarelas, lisas, mucóides e produzem um pigmento amarelo, insolúvel, denominado de xantomonadina e têm crescimento inibido a 0,1% de cloreto de trifenil tetrazólio (BRADBURY, 1986).

As espécies de *Xanthomonas* são não esporogênicas e são Gram-negativas, aeróbicas estritas e não redutoras de nitrato, oxidase-negativas, catalase-positivas, incapazes de utilizar asparagina como única fonte de carbono ou nitrogênio. Além disso são quimiorganotróficas e requerem fatores de crescimento, tais como metionina, ácido-glutâmico, ácido-nicotínico (KRIEG; HOLT, 1984).

Os mecanismos de especificidade do patovar *malvacearum* ainda não estão bem elucidados, mas possivelmente podem estar relacionados a uma fitotoxina que possui um anel aromático, causando os sintomas típicos de mancha angular (PANDIAN et al., 1982). A existência de feixes vasculares no tecido vegetal que parecem impedir a movimentação lateral da bactéria pelos espaços intercelulares do mesófilo foliar. Os sintomas externos aparecem como manchas bem delimitadas pelas nervuras da folha, justificando, assim, o nome genérico de mancha angular.

Cia e Salgado (1997) relataram que esta bactéria é muito resistente à dessecação, calor seco e radiação solar, podendo sobreviver por vários anos no solo (até 11 anos), na semente (até 4 anos), folha, caule, e capulho infectados. No mundo, já foram descritas 20 raças patogênicas de Xam, sendo que no Brasil já foram identificadas sete (BIRD et al., 1981; JULIATTI; POLIZEL, 2003; MORESCO et al., 2001). A quantidade e a qualidade da camada de exopolissacarídeos pode explicar as diferenças de virulência entre as raças de Xam (ZACHOWSKI; EBRAHIM-NESBAT; RUDOLPH, 1989).

Segundo Klement; Rudolph e Sands (1990), a Xam penetra mais no tecido vegetal por meio de aberturas naturais do que por ferimentos, porém, o vento é um fator importante no desenvolvimento das epidemias.

As epidemias são favorecidas por alternância de temperaturas diurnas altas e noturnas mais amenas. No caso da mancha angular, as condições favoráveis para o desenvolvimento da doença são as mesmas requeridas para a cultura do algodoeiro. As altas umidades relativas do ar e do solo são fatores que aumentam a severidade da doença. Além disso, o molhamento folhar, neblina, nevoeiro, água da chuva e o orvalho intenso são fatores importantes na disseminação dentro da lavoura.

A matéria orgânica favorece a permanência da bactéria na lavoura, uma vez que esta sobrevive em restos culturais (VALE; ZAMBOLIM, 1997). Porém, segundo Schnathorst (1964), que estudou a disseminação da mancha angular do algodoeiro por sementes. O autor relatou que o fato de a enfermidade surgir em locais onde o algodoeiro não era plantado há mais de 12 anos só podia ser explicado pela veiculação do patógeno pelas sementes usadas no plantio. Observou também, que as sementes podiam ser contaminadas em descaroadores onde anteriormente foram beneficiados capulhos provenientes de plantas infectadas.

A semente do algodoeiro constitui-se na principal fonte de inóculo de Xam em lavouras antes consideradas livres da praga, por isso a utilização de sementes sadias é uma das práticas recomendadas para o controle de doenças bacterianas, cujos patógenos são transmitidos por sementes. A Xam pode ser transmitida internamente pelas sementes para plântula causando mancha angular e reduzindo a produtividade da lavoura. Segundo Metha e Bolognini (2003), sementes com infecção de 0,017 a 2,0% podem resultar em severas perdas em campos comerciais de algodão. E atualmente não existem métodos apropriados para erradicar a bactéria da semente (ZANDONÁ et al., 2005).

Geralmente, a transmissão de bacteriose de plantas por sementes é muito baixa, sempre menor que 1% (SAETTLER; SCHAAD; ROTH, 1989). Em termos práticos, é necessário serem plantadas mais de 100 sementes para haver a possibilidade de uma planta infectada no campo. Porém, é sabido que, dependendo de certos fatores, a transmissibilidade é alta, pois basta uma planta infectada para causar um surto epidêmico (SCHAAD, 1988). Segundo Romeiro (1988), quando são plantados lotes de sementes possuindo uma fitobactéria associada, observa-se um padrão típico de disseminação que após a germinação aparecem poucas plantas infectadas, em “reboleiras” na lavoura. Em razão da disseminação de uma planta para as vizinhas por agentes diversos, essas “reboleiras” tendem a aumentar de tamanho.

Nas folhas, as manchas no início são pequenas de formato anguloso, aspecto oleoso, e posteriormente necróticas apresentando coloração marrom ou pardo-escuro e podem coalescer formando manchas bem maiores. As lesões também podem se localizar ao longo das nervuras principais, formando uma zona necrótica. Nas folhas mais novas e naquelas que ainda não se abriram, as lesões tendem a se localizar nas nervuras principais, abrangendo uma pequena faixa do tecido do mesófilo adjacente e estendendo-se ao longo dos pecíolos. Há queda de folhas quando se segue um período seco. Nos caules e ramos, podem ser observadas lesões deprimidas,

escuras e alongadas, podendo atingir vários centímetros de comprimento e se estender longitudinal e transversalmente. Nas maçãs, as lesões podem ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento; se jovens, podem morrer e se mais desenvolvidas, formam-se inicialmente lesões circulares encharcadas de coloração verde escuro na parede do carpelo que posteriormente se tornam escuras, causando podridão (VALE; ZAMBOLIM, 1997).

Os sintomas nas plântulas provenientes de sementes infectadas, segundo Godim et al. (1999), podem ser observadas nos cotilédones (lesões de aspecto oleoso e coloração parda) ou hipocótilo (cancro negro, que pode provocar anelamento do hipocótilo e morte da plântula).

Se as condições climáticas forem propícias e os agentes de disseminação eficientes, em curto espaço de tempo toda a cultura estará infectada e, no caso da mancha angular que apresenta epidemia de caráter considerado explosivo, isso acontece com muita frequência (SWINGS; CIVEROLO, 1993).

Segundo Romeiro (1988), sementes podem ser, e realmente são, importantes veículos de disseminação de fitobacterioses, tanto a curta distância como, principalmente, a longa distância. Pode-se especular, com relativa margem de segurança, que a maioria das enfermidades de plantas que hoje causam problemas no Brasil, provavelmente, foram introduzidas via sementes trazidas das mais diversas regiões do mundo. Basta lembrar que um grande número de plantas, de interesse agrônomo ou não, não tem seu centro de origem no Brasil e, possivelmente, em algum momento, sua introdução ocorreu com sementes infectadas com fitobactérias.

2.1.4 Controle da mancha angular e suas implicações na produção de algodão

A utilização de sementes saudáveis é uma das práticas recomendadas para o controle de doenças bacterianas, cujos patógenos são veiculados por sementes (IAMAMOTO, 1994). Atualmente, a principal forma efetiva de controle da mancha angular é o uso da resistência genética por meio do emprego de variedades resistentes como, por exemplo, a IAC 18, IAC 20, Delta OPAL, EPAMIG Liça e Fibermax 986 às raças de Xam predominantes no país (ZANDONÁ et al., 2005). Alternativamente, também pode ser realizado controle cultural, ou seja, rotação de culturas, adubação, espaçamento, aração e gradagem, “roguing”, etc. (CASSETARI NETO; MACHADO, 2000a; CIA; SALGADO, 1997; JULIATTI; POLIZEL, 2003; JULIATTI; RUANO, 1997).

Uma das dificuldades encontradas para o controle de bactérias fitopatogênicas de sementes é a capacidade que esses organismos possuem em sobreviver por longos períodos de tempo em condições hipobióticas e desenvolver, devido as suas características genéticas, quando submetidos a condições de estresse, formas de resistência, dificultando medidas de controle eficientes (DENARDIM; MOURA; MENTEN, 2004).

O aumento significativo da ocorrência de mancha angular na região Médio Norte de Mato Grosso, onde foram cultivadas grandes áreas com a variedade ITA 90 (susceptível a doença), nas últimas três safras, favorecendo o acúmulo de inóculo no solo e em restos de cultura, mostra a importância da utilização de variedades resistentes. A completa destruição de restos culturais e uso de rotação de culturas são medidas adicionais importantes no controle desta bacteriose (CASSETARI NETO e MACHADO, 2000).

A doença não é satisfatoriamente controlada por produtos químicos, sendo que seu controle depende de sementes sadias e resistência varietal (ZANDONÁ et al., 2005). Como controle curativo, pode-se usar produtos químicos, por meio de pulverização com fungicidas cúpricos e estânicos, ou antibióticos que podem ser pulverizados na parte aérea das plantas ou usados no tratamento de sementes. Andrei (2005) cita como comerciais, os seguintes produtos: oxitetraciclina (Agrimicin-500 e Mycoshield), oxitetraciclina + estreptomicina (Agrimicina) e casugamicina (Hokko Kasumin). Apesar das recomendações de antibióticos e fungicidas cúpricos encontrados em Andrei (2005), o controle químico de Xam ainda é objeto de estudo técnico e econômico, levando-se em consideração a eficiência e o custo de antibióticos. Menten et al. (2005) não citam nenhum antibiótico entre os produtos fitossanitários registrados para tratamento de sementes de algodão no Brasil. Antibióticos eficientes contra Xam poderão ser mais bem estudados para controle químico do patógeno, tanto na pulverização da parte aérea como no tratamento de sementes. O controle químico com o uso de antibióticos é de elevado custo e de eficiência duvidosa. O deslintamento ácido nas sementes não elimina totalmente a bactéria, uma vez que estas podem estar alojadas na parte interior das mesmas (JULIATTI; POLIZEL, 2003).

Os fungicidas cúpricos, amplamente utilizados como preventivos no controle de bacterioses, têm sido questionados, quanto a sua eficiência, por Nascimento et al., (2000) e Pereira et al. (2000).

Atualmente, na prática, o controle desta doença é feito unicamente com o uso de cultivares resistentes, o que tem limitado os produtores de plantar algumas cultivares com

características agronômicas de maior desempenho. As principais cultivares de algodão recomendado para controle da mancha angular são: BRS Aroeira, BRS Ipê e BRS Sucupira. (CASSETARI NETO; MACHADO, 2000a).

2.1.5 Metodologias de detecção de fitobactérias em sementes

As bactérias fitopatogênicas podem ser detectadas nas sementes por meio de diferentes metodologias, e os laboratórios podem usar várias combinações de técnicas de análise sanitária de sementes, porém, o resultado deverá se igual para todos. Na literatura são descritas as seguintes metodologias: análise de sintomas diretamente nas sementes: exame visual de sementes a olho nu ou com auxílio de lupa ou microscópio, testes de crescimento, inoculação em plantas indicadoras, identificação de bactérias: isolamento de bactérias em meios seletivos ou semi-seletivos e técnicas de isolamento direto em meio de cultura sem seletividade, exame microscópico das células bacterianas, bacteriófagos, testes bioquímicos e fisiológicos, postulados de Koch: patogenicidade, testes sorológicos: (imunoflorêscencia – direta, indireta e citometria de fluxo); ELISA (enzyme-linked immunosorbent); IDGA (imunodifusão em gel de ágar); reação de precipitação, imunoblot, Western Blot, técnicas moleculares: PCR, PCR Múltipla, RAPD, Real-Time PCR e Chips DNA – DNA arrays (RODRIGUES NETO, 1988; DENARDIN et al., 2004).

Segundo Denardin et al. (2004), vários são os métodos de detecção de bactérias em sementes, porém, para análise de diagnose, com fins de subsidiar a adoção de tecnologias preventivas à ocorrência de epidemias, requerem combinações, em série, de inúmeras técnicas, envolvendo desde a inspeção visual de sementes até o emprego de técnicas moleculares para identificação e quantificação da bactéria.

Os métodos disponíveis apresentam grandes variações quanto a sua sensibilidade, especificidade, praticidade e viabilidade de rotina, dependendo da bactéria a ser detectada (KRUPPA, 1993). Por isso, há necessidade de se pesquisar métodos que visem a detecção de bactérias em sementes, principalmente, nos casos em que o nível de infecção/contaminação é baixo (CLAFLIN; RAIMUNDO, 1987). Contudo, para o estabelecimento de procedimentos de análise de rotina, essa combinação de técnicas deve considerar, nos métodos selecionados, aspectos relativos a sensibilidade, especificidade, precisão, robustez relativa, interpretação e predição de resultados, bem como, adaptabilidade à rotina laboratorial, ou seja, simplicidade, rapidez, padronização e baixo custo (DENARDIM; MOURA; MENTEN, 2004).

Para detectar Xam em sementes de algodão existem generalizações de práticas que são utilizadas para outras fitobactérias e foram adaptadas com a finalidade de detectar o transporte de Xam em sementes de algodão. Como a observação visual dos sintomas apresentados pelas sementes. Porém, esse método não é preciso, pois pode sub ou superestimar a infecção das sementes, uma vez que sementes assintomáticas podem estar localizadas internamente (CAFATI; SAETTLER, 1980). Outra forma de detecção Xam em sementes de algodão é o plantio das sementes em substrato esterilizado e, observação posterior dos sintomas. Porém, este método demanda necessidade de muito espaço em casa de vegetação e, também, bastante tempo para obtenção dos resultados (DENARDIM; MOURA; MENTEN, 2004).

Alguns meios de rotina não seletivos têm sido usados para isolar algumas bactérias associadas às sementes. Por exemplo, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* pode ser isolada em meio B de King (TAYLOR, 1970) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em meio amido-nutriente-ágar (SCHAAD; DONALDSON, 1980). Pode detectar Xam de sementes de algodão via plaqueamento direto das sementes ou suspensão de maceração das sementes; trituradas ou não em meio de cultura agarizado (METHA; BOLOGNINI, 2003). O emprego de meios de cultura não seletivos tem dificultado o isolamento de Xam em sementes de algodão, uma vez que inúmeras bactérias saprófitas podem ser veiculadas às sementes, que interferem na recuperação da bactéria alvo (ROMEIRO et al., 1993). Entretanto, tais isolamentos são possíveis apenas se o lote de sementes estiver altamente contaminado pelo patógeno alvo ou se a microflora saprofítica for relativamente baixa. Desde que estas condições não existam na maioria dos casos, meios de rotina não-seletivos têm sido usados com sucesso em poucos casos e os seletivos ou semi-seletivos se tornam, assim, ferramentas valiosas em bacteriologia de plantas para estudos em patologia de sementes.

Atualmente, os meios de cultura semi-seletivos existentes são de custo relativamente caro, pois necessitam para a sua composição ingredientes importados, o que dificulta a adoção em nível de rotina em laboratórios de análise sanitária de sementes. Segundo Zachowski e Rudolph (1988), para a detecção de Xam em partes de plantas de algodoeiro com sintomas de mancha angular, poderá ser realizado o isolamento em meio de cultura constituído de 10 g de amido solúvel; 1 g de peptona; 5 g de NaCl; 0,5 g de KH_2PO_4 ; 20 g de ágar; 1000 mL de água destilada, e a incubação a 27°C. Após 3-5 dias de incubação, podem ser observadas colônias individualizadas sobre o meio de cultura.

Um método bastante utilizado para a detecção de Xam em sementes é a maceração das sementes em água destilada e esterilizada por pelo menos 24 h, para que a bactéria possa se difundir para o meio líquido. Maceram-se 100 sementes em 50 mL de água estéril por 2 dias a 25°C e, simultaneamente, plantam-se as em areia esterilizada para posterior observação dos sintomas típicos da doença nos cotilédones (BRINKERHOFF; HUNTER, 1963).

Normalmente, a maioria das sementes em uma amostra não é portadora de Xam, o que pode diminuir a sensibilidade de detecção pela metodologia descrita por Brinkerhoff e Hunter (1963), uma vez que outros microrganismos podem se difundir para a água, prejudicando o diagnóstico (HALFON-MEIRI; VOLKANI, 1977). Por isso, é feito o plantio em solo esterilizado de todas as sementes utilizadas na maceração para observação dos sintomas de mancha angular durante a germinação, ou até 14 dias após o plantio. Quando houver desenvolvimento de sintomas típicos de mancha angular, é necessário, ainda, fazer o isolamento (ZACHOWSKI; RUDOLPH, 1988).

Devido a grande versatilidade fisiológica das bactérias, os testes comumente utilizados para a sua detecção e identificação tornam-se muitas vezes insensíveis, além de complexos e morosos. Se não avaliadas para cada grupo de bactérias, podem mostrar-se ineficientes, induzindo a diagnóstico “falso positivo” ou “falso negativo”, principalmente, quando o número de células bacterianas nas sementes for extremamente baixo, não permitindo a sua detecção (DENARDIM; MOURA; MENTEN, 2004).

Diferentes isolados de Xam mostram alta variabilidade de virulência, o que não tem sido muito reportado para outras patovares de *Xanthomonas*, mas que pode ser fator limitante na diagnose em plântulas de algodão (SWINGS; CIVEROLO, 1993).

Sinais e sintomas na semente, identificados por inspeção visual, podem auxiliar na diagnose, porém, nem sempre são suficientes, pois freqüentemente, encontram-se bactérias sem que a presença seja percebida por sinais ou sintomas. Conseqüentemente, é imprescindível o emprego de métodos sensíveis e eficientes que permitam detectar sementes infectadas e infestadas por bactérias, demandando associações de técnicas que considerem a extração diferenciada (DENARDIM; MOURA; MENTEN, 2004). Uma vez que as fontes primárias de inoculação de Xam são as sementes infestadas, até mesmo baixas taxas de infestação precisam ser detectadas.

Além destes métodos, ainda há a detecção usando métodos sorológicos como imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais (CHITARRA, 2001). A citometria de fluxo é uma técnica que combina as vantagens da microscopia e análise serológica em uma técnica simples e altamente sensível para exame e detecção de numerosas células individuais em poucos minutos (MUIRHEAD; HORAN; POSTE, 1985). Chitarra (2001) verificou que a citometria de fluxo em combinação com antissoro específico mostrou ser uma técnica quantitativa rápida para detecção e quantificação de células de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em extratos de sementes inteiras.

Apesar de nos dias atuais existirem muitos avanços na biologia molecular, juntamente com a indústria de equipamentos ultra-sofisticados com suas metodologias de identificação de espécies bacterianas, como por exemplo, a análise de perfil de ácidos graxos da parede celular, homologia de DNA, sondas biológicas e outros. Entretanto, atualmente, os laboratórios de patologia de sementes do Brasil não possuem estrutura para utilizar desses métodos como procedimentos de rotina na identificação de isolados bacterianos.

Segundo Schaad et al. (1989), a melhor metodologia disponível para identificação de bactérias em sementes é a utilização de meios semi-seletivos para isolar o patógeno, em combinação com a imunofluorescência para a rápida identificação. Segundo Frankena; van Vuurde (1990), as técnicas sorológicas apesar de serem extremamente sensíveis não distinguem as células vivas das não-vivas e podem detectar células mortas das bactérias presentes na amostra de sementes. Por isso é importante a utilização da combinação de metodologias de detecção para aferição da viabilidade das bactérias presentes nas sementes.

Os meios de culturas são valiosos instrumentos em fitobacteriologia para o diagnóstico de doenças e estudos epidemiológicos. Entretanto, eles dificilmente são inteiramente seletivos, por isso, o termo “semi-seletivo” parece ser mais adequado. Os meios semi-seletivos são também extremamente úteis para o isolamento de bactérias fitopatogênicas de tecidos vegetais, solo, água e são de grande valor em estudos de epidemiologia e etiologia (RUDOLPH et al., 1990). Meios de cultura semi-seletivos têm sido considerados uma das alternativas racionais de detecção de fitobactérias em sementes e são desenvolvidos por vários pesquisadores (FRARE, 2006; MARINGONI et al., 1993; METHA et al., 2005; MOURA; ROMEIRO, 1993; OLIVEIRA, 1995; VALARINI, 1990).

Os meios semi-seletivos são definidos como um meio de cultura empregado para suprir ou prevenir o crescimento de um grupo de organismos enquanto permite o crescimento de outro grupo, quando estão presentes na mesma flora. Os dois principais critérios para a avaliação de um meio semi-seletivo são a sua eficiência no plaqueamento, ou seja, o número de colônias presentes no meio semi-seletivo comparado com os meios não seletivos e sua seletividade pela capacidade de prevenir o crescimento de organismos contaminantes no meio de cultura (SANDS, 1990). O sucesso no isolamento de um patógeno bacteriano associado às sementes, em meio de cultura, depende em grande parte, da disponibilidade de um bom meio seletivo ou semi-seletivo. Um meio para uso em rotina deve utilizar ingredientes facilmente disponíveis, ser fácil de preparar, barato e permanecer efetivo após armazenamento prolongado (CLAFLIN et al., 1987).

A seletividade dos meios de cultura pode ser obtida utilizando-se fontes específicas de carbono e nitrogênio, os quais podem estimular o crescimento de uma determinada espécie e inibir o de outra ou quando as enzimas bacterianas reagem com constituintes do meio de cultura e propiciam uma distinção natural entre duas espécies que antes pareciam similares (KLEMENT; RUDOLPH; SANDS, 1990).

Antibióticos também são importantes no desenvolvimento de meios semi-seletivos para detecção e identificação de bactérias, ou seja, a adição de substâncias tóxicas ao meio de cultura visa reduzir o número de microrganismos contaminantes e favorecer o desenvolvimento da espécie desejada (SASSER, 1986).

Vários meios de cultura têm sido desenvolvidos para gêneros de bactérias. Kado e Heskett (1970) desenvolveram cinco meios semi-seletivos, designados meios da *Série D*, para isolar bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. O meio de cultura *D-5* foi indicado para isolar as *Xanthomonas* porque favoreceu o crescimento das bactérias desse gênero, enquanto que suprimiu o crescimento das do gênero *Pseudomonas*. Os meios semi-seletivos têm sido empregados em vários estudos epidemiológicos com patovares de *Xanthomonas campestris* (SASSER, 1987), incluindo a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (GITAITIS et al., 1991).

Com base nas características culturais do gênero *Xanthomonas* sp., Schaad e White (1974) desenvolveram um meio de cultura denominado SX-ágar para isolar *X. axonopodis* pv. *campestris* do solo. Seletividade normalmente é conseguida por meio do uso de fontes de carbono específicas, de antibióticos ou outros compostos inibidores que favoreçam o crescimento do

patógeno em meio de cultura (KLEMENT; RUDOLPH; SANDS et al., 1990). A seletividade do meio semi-seletivo pode ser obtida pela inclusão do amido e de alguns corantes e, com isso, distinguir as colônias de *X. campestris* pv. *phaseoli* das demais por meio da hidrólise do amido (CLAFILIN; VIDAVER; SASSER, 1987). Esse meio também permitiu o crescimento de vários outros patovares e ou espécies de *Xanthomonas* spp., incluindo a *X. vesicatoria* do tomateiro. No Brasil, este meio foi empregado para detectar *X. campestris* pv. *campestris* em sementes de crucíferas (MARIANO, 2000). Gitaitis et al. (1991) desenvolveram um meio semi-seletivo (CMC-E) para o isolamento de *Xanthomonas* spp. celulíticas de sementes, entretanto, é um meio relativamente caro e não é de preparo fácil e com rápido resultado, dificultando a sua utilização em termos de rotina.

Meios seletivos e semi-seletivos têm sido desenvolvidos para espécies e patovares específicos de *Xanthomonas* sp. Entretanto, até 2002, quando se deu o início das investigações desta pesquisa, nenhum dos meios desenvolvidos se mostrou adequado para trabalhos envolvendo Xam. Recentemente, Metha et al. (2005) elaboraram um meio de cultura semi-seletivo para tal finalidade. Porém, é um meio que exige na sua composição um antibiótico importado e de elevado custo, dificultando sua adoção por laboratórios de rotina de análise sanitária de sementes.

Há a nítida necessidade de elaboração de metodologias de detecção de fitobactérias em amostras de sementes de algodão com características de alta confiabilidade, rapidez em fornecer os resultados e viabilidade de implementação em laboratórios de rotina de análise sanitária de sementes. Segundo Schaad (1982), enquanto que o uso dos meios semi-seletivos aumenta as chances de sucesso no isolamento do patógeno, há necessidade de confirmação da identidade pelo teste de patogenicidade, o que consome tempo, tornando-se limitante para programas de certificação de sementes, uma vez que os resultados devem ser disponibilizados rapidamente. Segundo Diatloff; Wong e Wood (1993), o uso de meios semi-seletivos aliados a técnicas de sorologia de imunofluorescência demonstrou maior eficiência de detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes do que o método de sintomas em plântulas.

Justificando, assim, pesquisas que visam desenvolvimento de meios de cultura semi-seletivo, objetivando o isolamento de Xam de sementes de algodão, já que esta bactéria se trata de um patógeno altamente comprometedor à cultura do algodoeiro e, é veiculado por sementes. As perspectivas de uso meios de cultura semi-seletivo para isolar Xam de sementes de algodão,

em nível de rotina de laboratórios de análise sanitária, são promissoras. Podendo ser utilizada como ferramenta em estudos de diagnose de Xam em sementes associada a medidas de prevenção do patógeno e, também, em que a fiscalização seja requerida nas transações inter-regionais de sementes.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Local e época de realização do experimento

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Produção Vegetal – Setor de Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, São Paulo, no período de abril de 2004 a setembro de 2005.

Alguns experimentos foram desenvolvidos nas dependências dos laboratórios e de casa de vegetação do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, no período de 2002 a 2004.

2.2.2 Origem, preservação e cultivo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Os isolados de Xam foram obtidos de várias regiões brasileiras produtoras de algodão, em diversas instituições, e cedidos para a realização da pesquisa. Estes se encontram relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* utilizados para o desenvolvimento de método de detecção em sementes de algodão

Código	Origem	Instituição doadora
IB 12.471	Baus-MS	Instituto Biológico de Campinas/SP
IB 12.430	Jataí-GO	Instituto Biológico de Campinas/SP
IB 12.397	Barreiras-BA	Instituto Biológico de Campinas/SP
IB 12.392	Londrina-PR	Instituto Biológico de Campinas/SP
IB 12.400	Ituverava-SP	Instituto Biológico de Campinas/SP
IBSBF 1733	Campinas-SP	Instituto Biológico de Campinas/SP

O meio de cultura basal utilizado para a repicagem e preparo do inóculo de Xam foi Nutriente Sacarose Ágar (NSA), que consiste de: 5,0 g de sacarose; 5,0 g de peptona; 0,5 g de extrato de carne; 15,0 g de ágar bacteriológico e 1000 mL de água destilada.

As culturas quando necessário foram recuperadas da preservação pela transferência para o meio nutriente líquido (NL), e a temperatura de incubação foi de 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) para o crescimento (LELLIOTT; STEAD, 1987).

Para evitar a possibilidade de perda de viabilidade de alguns dos isolados foram utilizados os seguintes métodos: repicagens tubo a tubo (TUIE, 1969); preservação sob óleo mineral; preservação em emulsificação de glicerina (LELLIOTT; STEAD, 1987); preservação por desidratação (TAKATSU, 1978).

2.2.3 Caracterização dos isolados bacterianos para a determinação da espécie

Os isolados de Xam relacionados na Tabela 1 foram submetidos aos seguintes testes, para a confirmação da identidade.

2.2.3.1 Teste de coloração de Gram

Os isolados bacterianos foram submetidos a coloração com corantes básicos e descoloradas com solventes neutros. Após, foram observados ao microscópio e verificadas as características de coloração, formato e agrupamento, configurando o teste de Gram (FAHY; PERSLEY, 1983; GRAHAM, 1953; LOURES; GUIMARÃES, 1974). Para a avaliação, foram consideradas reações Gram negativas quando as células eram de cor vermelha e formato de bastonete.

2.2.3.2 Teste de KOH

O teste de KOH foi feito de acordo com a metodologia descrita por Ryu (1938), neste teste, os diferentes isolados foram previamente cultivados em meio NSA, em estufa a 28°C, por 24 h. Posteriormente, foi colocada uma porção de colônia bacteriana de sobre uma lâmina de vidro e homogeneizado a uma gota de hidróxido de potássio (3%), levantando-se a alça em aro várias vezes.

A avaliação foi feita de forma qualitativa verificando se quando a alça de platina ao ser levantada ocorria à formação de um fio viscoso desta mistura. Quando houve a formação do fio, a reação era considerada positiva, ou seja, um indicativo que a bactéria do isolado testado era Gram negativa.

2.2.3.3 Meio YDC

Todos os isolados estudados foram repicados na superfície do meio YDC solidificado, composto por 10 g de extrato de levedura; 10 g de dextrose; 2,5 g de carbonato de cálcio; 15 g de ágar; 1000 mL de água destilada, previamente vertido em placas de Petri. Após, as placas foram colocadas em estufa bacteriológica com temperatura de 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por 36 h. A avaliação foi realizada observando-se, visualmente, os aspectos culturais das colônias, considerando como indicativo de Xam quando apresentassem colônias amarelas, mucóides, grandes, brilhantes, lisas e convexas, conforme descrições feitas por Mariano (2000), para espécies de *Xanthomonas*.

2.2.3.4 Patogenicidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em plântulas de algodoeiro

Em casa de vegetação, sementes de algodão, cultivar Acala 90, foram plantadas em vasos (três sementes/vaso) contendo aproximadamente 2,8 L de substrato constituído da mistura de esterco de curral curtido, terra e areia grossa lavada.

Quando as plantas estavam na fase de segunda folha verdadeira, em torno de 30 dias após o plantio, procedeu-se a inoculação por meio da técnica de injeção (EDDIN et al., 2005), infiltrando-se a suspensão bacteriana abaixo da cutícula com auxílio de uma agulha hipodérmica fina, visando atingir os espaços intercelulares do tecido da planta, conforme Saettler (1971). Para tal, foram utilizados os isolados de Xam, previamente cultivados em placas de Petri com meio de cultura NSA. As culturas bacterianas utilizadas estavam em fase logarítmica de crescimento e foram ressuspensas em tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada (5 mL/tubo). A mistura foi agitada até completa homogeneização, em agitador elétrico, preparando-se uma suspensão de células bacterianas na concentração aproximada de 10^8 UFC/mL que foi infiltrada imediatamente após o preparo. A testemunha consistiu na infiltração de água destilada e esterilizada nas folhas das plantas. Todas as plantas foram inoculadas em no mínimo três folhas e, quando possível, inoculou-se, também, os cotilédones, utilizou-se de cinco plantas por isolado. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, realizando-se observações diárias para verificar o aparecimento dos sintomas típicos de mancha angular, durante 18 dias.

2.6.5 Isolamento de fungos associados a sementes de algodão

Para a detecção e identificação dos fungos associados a sementes de algodão foram utilizadas 10 amostras e de cada amostra utilizou-se 100 sementes. Estas foram dispostas em placas de Petri (plástico), sobre meio de cultura NSA (Nutriente Sacarose Ágar), totalizando 10 sementes por placa, e 10 placas amostra.

As placas foram mantidas em câmara de incubação ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente / 12 horas de escuro) por 7 dias; após esse período procedeu-se à avaliação com a ajuda de microscópio estereoscópico e microscópio óptico.

Os fungos identificados foram isolados em meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e preservados sob óleo mineral, para posterior utilização no teste de fungitoxicidade.

2.2.4 Ação de antibióticos *in vitro* na inibição do crescimento de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Para estimar a sensibilidade de Xam a diferentes antibióticos foi necessária a confecção de um antibiograma qualitativo e outro quantitativo.

2.2.4.1 Antibiograma qualitativo

O antibiograma foi elaborado avaliando-se *in vitro* a ação de 66 antibióticos (Tabela 02), usando-se discos de papel-filtro impregnados com antibióticos (OXOID®), seguindo a metodologia descrita por Sherwood, Falco e Beer (1944), com modificações, sobre a sensibilidade do crescimento de cinco isolados de Xam.

Foram utilizados “kits” de antibióticos da marca OXOID®, cujos antibióticos são fabricados de acordo com as especificações DIN, que é o padrão internacional de fabricação mais rigoroso (APPLENTON, 2004), buscando desta maneira maior padronização das concentrações de antibióticos. Após chegarem ao laboratório os discos de antibióticos foram armazenados em freezer a -20°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Para a montagem do teste, foram repicados individualmente os isolados de Xam em meio de cultura nutriente líquido (NL) contidos em tubos de ensaio, com volume de 5 mL por tubo. Os isolados bacterianos foram incubados em estufa, por 24 h, a 28°C . Após este período, a suspensão foi incorporada em 300 mL de meio de cultura NSA fundente a aproximadamente 45°C , e vertido um volume aproximado de 20-25 mL por placa de Petri. Imediatamente após a

solidificação do meio, foi feita a distribuição equidistante de seis discos de papel-filtro com antibióticos, com uso de um dispensador de discos da OXOID®.

Tabela 2 – Diferentes antibióticos e concentrações, utilizadas no bioensaio de difusão em meio de cultura

Antibiótico	Concentração (µg/disco)	Antibiótico	Concentração (µg/disco)
Ac. Clavulanic + Amoxilin	20	Kanamycin	30
Ácid Nalidixic	30	Kanamycin	30
Ácid Pipemidic	2	Levofloxacin	5
Amikacin	30	Lincomycin	2
Amoxilin	20	Lovefloxacin	5
Ampicillin	30	Methicillin	5
Azithromycin	15	Mupirocin	30
Aztreonam	30	Neomicin	30
Bacitracin	10	Netilmicin	30
Carbencillin	100	Netilmycin	30
Cefaclor	30	Nitrofurantoin	300
Cefadroxil	30	Nitrofurazona	15
Cefalexin	30	Novobiocin	30
Cefazolin	30	Ofloxacin	5
Cefepime	30	Oxacillin	1
Cefetamet	10	Pefloxacin	5
Cefixime	5	Pennicillin G	10
Cefodizima	15	Polymyxin B	300
Ceforoxime	30	Sulbactan + Ampicilin	10
Cefotaxima	30	Sulfadiazim	250
Cefoxitin	30	Sulfazotrim	15
Ceftazidime	30	Sulfonamida	250
Cephalothin	30	Sulphamethoxazole	23
Ciprofloxacin	5	Sulphamethoxazole	23
Clarithromycin	15	Teicoplanin	30
Clindamycin	2	Tetraclin	30
Doxicielin	30	Tianfenicol	30
Erythromycin	15	Ticarcilin + Ác. Clavulnico	75
Espiramicin	10	Ticarcillin	10
Estreptomycin	30	Tobramicin	10
Forazolidon	20	Trimetoprim	23
Fosfomicin	200	Vancomycin	30
Gentamicin	120	Imipenem	10

As placas foram incubadas em estufa por 48 h a 28°C. A avaliação foi realizada de forma quantitativa, aferindo-se em milímetros (mm), o diâmetro médio do halo de inibição formado ao redor de cada disco de antibiótico. Posteriormente, considerou-se sensibilidade (S) ou resistência (R); neste último caso reações intermediárias foram consideradas resistentes, para cada um dos antibióticos avaliados conforme recomendação da Bioanalyse^{®1} (s/d) e Anônimo (1997).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições.

2.2.4.2 Antibiograma quantitativo

Foram utilizados antibióticos de uso clínico, encontrados em farmácias locais, conforme relacionado na Tabela 3.

Os antibióticos foram previamente diluídos em água destilada e esterilizada, formando soluções estoques, para serem adicionadas ao meio de cultura fundente.

Ao meio de cultura NSA (basal), após autoclavagem a temperatura de 50°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) e, antes de ser vertido em placas de Petri, foi adicionada alíquotas das suspensões estoque de antibióticos, obtendo-se as seguintes concentrações: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, nos meios de cultura.

Tabela 3 – Antibióticos utilizados para a realização do antibiograma quantitativo

Ingrediente ativo	Nome comercial	Concentração (mg)
Cefalexin	Keforal	500/ cápsula
Cefadroxil	Cefamax	500/ cápsula
Nitrofurantoin	Nitrofen	100/ cápsula
Oxacelin	Staficilin N	500/ ampola
Lincomycin	Linco-specilin	300/ ampola

O semeio dos cinco isolados foi realizado em forma de riscas, sobre o meio de cultura contido nas placas de Petri. Após o plaqueamento, as placas de Petri foram incubadas a 28°C por 72 h. Considerou-se na avaliação apenas o crescimento ou a inibição dos isolados de Xam no meio de cultura.

Para o antibiótico oxacelin, foi feito ajuste quantitativo *in vitro* sobre cinco isolados de Xam. Este antibiótico foi adicionado ao meio de cultura após a autoclavagem, a temperatura de 45°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), para se obter concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 $\mu\text{g/mL}$ no meio de cultura basal.

O ensaio foi instalado no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo uma placa de Petri considerada uma repetição.

2.2.5 Ação *in vitro* de misturas de antibióticos adicionados ao meio de cultura sobre crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Cinco isolados de Xam foram avaliados quanto à sensibilidade *in vitro* aos antibióticos selecionados no antibiograma quantitativo, incorporados em conjunto, ao meio basal. Os

tratamentos consistiram das seguintes combinações: nitrofurantoin (50 µg/mL) + lincomycin (50 µg/mL) + oxacelin (1 µg/mL); nitrofurantoin (50 µg/mL) + oxacelin (1µg/mL); lincomycin (50 µg/mL) + nitrofurantoin (50 µg/mL); lincomycin (100 µg/mL) + nitrofurantoin (100 µg/mL); oxacelin (1 µg/mL) + lincomycin (50 µg/mL); cefalexin (50 µg/mL) + cefadroxil (50 µg/mL). O tratamento testemunha foi o uso de meio de cultura NSA sem adição de antibióticos.

Os antibióticos foram previamente diluídos e suspensos em água destilada esterilizada, formando soluções estoques. Alíquotas destas foram tomadas e adicionadas ao meio NSA, após autoclavagem, em temperatura aproximada de 45°C. Foram utilizadas quatro placas por isolado por tratamento.

O semeio dos diferentes isolados foi realizado em forma de riscas sobre o meio de cultura nas placas de Petri e, após, foram incubadas a 28°C por 72 h. Considerou-se na avaliação apenas o crescimento (+) ou a inibição (-) das bactérias no meio de cultura.

2.2.6 Efeito de fungicidas adicionados ao meio de cultura nutriente sacarose ágar (NSA), sobre o crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Para este bioensaio, foram utilizados diferentes fungicidas suspensos em água destilada e esterilizada, conforme relacionados na Tabela 4.

Quantidades apropriadas das suspensões estoques foram adicionadas, separadamente, ao meio de cultura NSA fundente para formar concentrações de 0, 5, 10, 50 e 100 µg/mL e, após vertido em placas de Petri. O tratamento testemunha foi à utilização do meio NSA, sem adição de fungicidas.

Avaliou-se, também, a mistura dos fungicidas tiofanato metílico e clorothalonil na concentração de 10 µg/mL de meio de cultura NSA para cada um dos produtos.

Sobre o meio de cultura solidificado foram colocadas eqüidistantemente quatro tiras de papel-filtro (tamanho de 10 x 15 mm) por placa de Petri. Sobre cada tira de papel, foram colocados 10 µL de suspensão bacteriana de Xam, previamente cultivada em meio líquido (NL) por 24 h a 28°C.

Foram utilizadas cinco repetições por isolado em cada fungicida estudado, sendo cada repetição representada por uma tira de papel-filtro.

Após a deposição da suspensão bacteriana sobre as tiras de papel-filtro, realizou-se a incubação em estufa a 28°C por 72 h. Após este período, foi observado o crescimento de cada isolado bacteriano ao redor das tiras de papel-filtro, na superfície do meio de cultura.

Tabela 4 –Fungicidas utilizados para avaliação de fungitoxidade a *Xam* em meio de cultura nutriente sacarose ágar

Ingrediente ativo	Nome comercial	Concentração	Formulação
		(mg/Kg ou mL/L)	
Tiofanato metílico	Cercobin	700	PM
Clorothalonil	Daconil	500	SC
Tolyfluanid	Euparen	500	PM
Penycuron	Monceren	250	PM
Triadimenol	Baytan	150	SC
Tebuconazole	Folicur	200	CE
Cyproconazole	Alto	100	CS

PM= pó molhável; SC= solução concentrada; CE= concentrado emulsionável.

A avaliação deste bioensaio foi qualitativa, verificando-se visualmente a presença (+) ou ausência (-) de crescimento dos isolados de *Xam* sobre as tiras de papel-filtro comparando-se com tratamento testemunha.

2.2.7 Efeito de fungicidas adicionados ao meio de cultura nutriente sacarose ágar (NSA) sobre o crescimento de fungos isolados de sementes de algodão

Sementes de algodão sem desinfestação superficial foram depositadas na superfície do meio de cultura NSA em placas de Petri e, incubadas no escuro em estufa bacteriológica a 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) até o surgimento de colônias de fungos ao seu redor ou até um período máximo de 10 dias de incubação. Neste período, procederam-se avaliações diárias das diferentes colônias de microrganismos, com auxílio de microscópio estereoscópico e microscópio óptico.

As colônias que surgiram foram repicadas e isoladas, estabelecendo-se sub-culturas que, por sua vez, foram preservadas individualmente em tubos de ensaio contendo meio BDA, coberto com óleo mineral.

Os isolados fúngicos preservados sob óleo mineral foram recuperados em meio BDA e submetidos ao teste de fungitoxicidade. Para este teste, foram utilizados fungicidas, que não apresentaram inibição no crescimento dos isolados de Xam, e relacionados na Tabela 5.

Cada fungicida foi suspenso em água destilada e esterilizado, formando uma solução estoque. Foram transferidas alíquotas de cada suspensão estoque para o meio de cultura NSA de forma que ao meio ficasse com as seguintes concentrações: 0, 5, 10, 50 e 100 µg/mL.

Tabela 5 – Fungicidas utilizados para avaliação de fungitoxicidade em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA)

Ingrediente ativo	Nome comercial	Concentração	Formulação
		(mg/Kg ou mL/L)	
Tiofanato metílico	Cercobin	700	PM
Clorothalonil	Daconil	500	SC
Tolyfluanid	Euparen	500	PM
Penycuron	Monceren	250	PM
Triadimenol	Baytan	150	SC

PM= pó molhável; SC= solução concentrada.

Verteu-se o meio de cultura para placas de Petri que foram identificadas e mantidas em temperatura ambiente até a instalação do teste. Como testemunha foi utilizado meio NSA sem fungicida. Este procedimento foi repetido para todos os isolados fungicos.

Após, foi repicado, para cada placa, um disco de 0,6 cm de diâmetro de meio de cultura com crescimento do fungo a ser testado. Os fungos avaliados foram: *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Bipolaris* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., *Nigrospora* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotinia* sp..

As placas foram mantidas em câmara de incubação sob temperatura de 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e luz próxima da ultravioleta (NUV) alternada (12 h de luz / 12 h de escuro). A avaliação foi realizada pela medida do diâmetro da colônia fúngica, em dias alternados, até o momento em que as colônias fúngicas das placas testemunhas atingiram nove centímetros (cm) de diâmetro.

2.2.8 Ação *in vitro* de diferentes antibióticos misturados com fungicidas e adicionados no meio de cultura, sobre o crescimento de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Foi avaliada a sensibilidade de cinco isolados de Xam aos antibióticos cefalexin, cefadroxil, lincomycin, nitrofurantoin e oxacelin e aos fungicidas tiofanato metílico e clorothalonil. Os tratamentos foram: nitrofurantoin + lincomycin + oxacelin + tiofanato metílico + clorothalonil (50/50/1/10/10 e 100/100/1/10/10 µg/mL); cefalexin (50 e 100 µg/mL); cefaroxil (50 e 100 µg/mL); cefalexin + cefadroxil (50/50 µg/mL); cefalexin + tiofanato metílico + clorothalonil (50/10/10 µg/mL).

Os fungicidas e os antibióticos foram suspensos em água destilada e esterilizada, formando uma suspensão estoque. Após, transferiram-se alíquotas de solução estoque de cada produto ao meio basal de forma que se obtivesse as concentrações desejadas. O tratamento testemunha foi representado pelo meio de cultura NSA sem adição de drogas.

Após a solidificação do meio de cultura nas placas de Petri, realizou-se o plaqueamento dos diferentes isolados de Xam na superfície do meio de cultura, em forma de riscas. As placas foram incubadas em estufa por 24 h a 28°C. A avaliação foi qualitativa, verificando-se a presença (+) ou ausência (-) do crescimento dos isolados nos diferentes tratamentos, comparando-se com o tratamento testemunha.

2.2.9 Ação de antibióticos e fungicidas sobre crescimento de bactérias freqüentemente associadas às sementes de algodão

Sementes de algodão sem desinfestação superficial foram depositadas na superfície do meio de cultura NSA em placas de Petri e, incubadas no escuro em estufa a 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) até o surgimento de colônias de bactérias ao seu redor ou até um período máximo de 10 dias de incubação. Neste período, procederam-se avaliações diárias das diferentes colônias de microrganismos, com auxílio de microscópio estereoscópico e microscópio óptico.

As colônias que surgiram foram repicadas e isoladas, estabelecendo-se sub-culturas que, por sua vez, foram identificadas em ordem crescente, e caracterizadas quanto à reação no teste de Gram, KOH, morfologia e coloração de colônias, após foram preservadas individualmente em tubos de ensaio contendo meio NSA com óleo mineral.

Posteriormente, estes isolados foram cultivados em meio NL, por 24 h a 28°C e, plaqueados em forma de riscas sobre o meio de cultura NSA em placas de Petri.

Após a autoclavagem do meio de cultura NSA, a temperatura de 45°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) foram acrescentados os diferentes antibióticos, previamente suspensos em água destilada e esterilizada, nas seguintes concentrações: nitrofurantoin (50 $\mu\text{g/mL}$); lincomycin (50 $\mu\text{g/mL}$); nitrofurantoin (100 $\mu\text{g/mL}$); lincomycin (100 $\mu\text{g/mL}$); oxacelin (1 $\mu\text{g/mL}$); cefalexin (50 $\mu\text{g/mL}$); cefadroxil (50 $\mu\text{g/mL}$); e, os fungicidas tiofanato metílico (10 $\mu\text{g/mL}$); clorothalonil (10 $\mu\text{g/mL}$). Como controle utilizou-se meio nutriente sacarose ágar (NSA) sem adição de antibióticos e fungicidas.

Após a solidificação do meio de cultura, foi plaqueado em forma de riscas cada isolado “saprófita”. Como testemunha, foi utilizado meio de cultura sem adição de antibióticos. As placas foram incubadas em estufa por 72 h a 28°C. Foram feitas cinco repetições por tratamento, sendo considerada cada placa de Petri uma repetição.

A avaliação foi qualitativa, verificando-se a presença (+) ou ausência (-) do crescimento dos isolados saprófitas sobre o meio de cultura, comparando-se com o tratamento testemunha.

2.2.10 Determinação de repressão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* no meio de cultura semi-seletivo

Culturas puras de 11 isolados de Xam, crescidas em meio NSA por 48 h, a 28°C, em meio NL foram diluídas em série em solução salina esterilizada (8,5 g de cloreto de sódio em 1000 mL de água destilada).

Procedeu-se o semeio na superfície dos meios de cultura de alíquotas de 100 μL das suspensões bacterianas das diluições 10^{-6} a 10^{-9} e, espalhou-se na superfície com auxílio de uma alça de Drigalski. Foram utilizadas cinco placas por isolado, em cada uma das diluições.

Os meios de cultura utilizados foram NSA e o meio semi-seletivo para Xam. O meio de cultura semi-seletivo possui a seguinte constituição: 3 g de extrato de carne; 5 g de peptona; 10 g de amido solúvel; 10 mL de Tween 80; 0,25 g de cloreto de cálcio; 150 μL de solução de cristal violeta a 1%; 50 mg de cefalexina; 10 mg de clorothalonil; 10 mg de tiofanato metílico e água destilada por 1000 mL. O tween 80 foi previamente dissolvido em 50 mL de água destilada e autoclavado. A seguir, foi adicionado ao meio de cultura previamente autoclavado, quando este

atingiu temperatura fundente ($\pm 45^{\circ}\text{C}$), juntamente com alíquotas das soluções dos fungicidas e do antibiótico, previamente suspensos em água destilada e esterilizada.

As placas foram incubadas a 28°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) e, após 48 h procedeu-se a contagem do número de colônias de Xam em cada meio. O IR foi determinado pela fórmula: (média do número de colônias formadas (UFC) no meio seletivo / média do número de UFC no meio basal) x 100, de acordo com Oliveira (1995).

2.2.11 Determinação da sensibilidade do isolamento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão no meio de cultura NSA modificado

Cerca de 300 sementes da cultivar Acala 90, procedentes de campo comercial da Empresa BASF S.A., em Rondonópolis (MT), comprovadamente livres do patógeno foram utilizadas para o ensaio.

Devido à exigência do ensaio em sementes portadoras de Xam, providenciou-se por meio da utilização do método de inoculação artificial de Xam em sementes descrito por Valarini (1990), com modificações.

Culturas puras de Xam foram obtidas em placas de Petri, em meio de cultura NSA, após a incubação em estufa a 28°C , por 72 h. Posteriormente, colocaram-se 25 sementes de algodão por placa de Petri e manteve-se sob agitação manual por alguns instantes, até que o inóculo envolvesse completamente as sementes. As sementes foram mantidas por 36 h em contato com as colônias bacterianas em estufa a 28°C . Em seguida, procedeu-se à retirada das sementes do contato com o meio de cultura e colocou-se sobre papel absorvente esterilizado e manteve-se à temperatura ambiente, por quatro dias, para a secagem. Posteriormente, as sementes foram armazenadas em frascos de vidro com tampa rosqueável e em geladeira até a utilização.

Posteriormente, para a detecção de uma única semente infectada com Xam em amostras de sementes de algodão, foram utilizadas sub-amostras de 499 e 999 sementes sadias e, mais uma semente artificialmente contaminada por Xam, acrescentado 150 mL ou 300 mL de água destilada e esterilizada, respectivamente. Após, os recipientes foram acondicionados em geladeira por 18 h e, ou, durante aproximadamente uma noite.

Foram retiradas alíquotas por meio do uso de uma alça em aro de suspensão de maceração das sementes e, plaqueados de maneira que ficassem desenhadas estrias na superfície

do meio de cultura semi-seletivo idealizado e NSA (testemunha) em placas de Petri. Utilizou-se cinco repetições para cada amostra, em que uma placa de Petri foi considerada uma repetição.

A seguir, procedeu-se a incubação a 28°C por 24 h. A avaliação foi qualitativa, ou seja, pela observação de presença ou ausência de crescimento de Xam no meio de cultura.

Algumas colônias com características de Xam que se desenvolveram sobre o meio de cultura foram purificadas e preservadas e posteriormente inoculadas em folhas de plantas de algodão, por meio de infiltração, para o teste de patogenicidade.

2.2.12 Isolamento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes produzidas em campos comerciais com ocorrência da mancha angular

Para a avaliação da capacidade de isolamento de Xam de sementes de algodão utilizando o meio de cultura semi-seletivo, foram utilizadas amostras de sementes de algodão, obtidas junto a empresas de pesquisa e produtoras de sementes. Foram solicitadas amostras de sementes provenientes de campos que apresentaram, durante o cultivo, plantas com sintomas de mancha angular. Foram utilizadas 25 amostras de sementes de algodão, conforme Tabela 6.

As amostras foram recebidas gradativamente e, à medida que chegavam, foram numeradas, devidamente identificadas e, nas embalagens originais, acondicionadas em caixas maiores de papelão, sendo armazenadas no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Defesa Fitossanitária da UNESP-Botucatu-SP, em local seco e à temperatura ambiente.

Para cada amostra de sementes, foram divididas em cinco sub-amostras de 100 g de sementes sem linter e 120 g de sementes com linter, conforme Tabela 6. As sub-amostras foram submetidas à maceração em frascos de tamanhos variados, contendo água destilada esterilizada, conforme relacionado na Tabela 7.

Os frascos foram fechados com tampões de algodão, identificados e submetidos a temperatura de aproximadamente 5°C, por cerca de 18 h. As suspensões obtidas das macerações de sementes foram divididas em duas partes, sendo uma plaqueada diretamente sobre o meio de cultura, e a outra centrifugada antes do plaqueamento.

Para centrifugar o líquido da maceração das sementes, foi retirada uma alíquota de 100 mL de suspensão de maceração das sementes e submetida à centrifugação a 8.000 g por 10 minutos e ressuspenso o sedimento em 1 mL de água destilada e esterilizada. Em seguida, foram repicadas com auxílio de uma alça de platina, em forma de riscas, diretamente sobre meio

de cultura em placas de Petri previamente divididas em dois campos, conforme Maringoni et al. (1994). Como controle, foi semeado isolado “IBSBF 1733” de Xam. Foram utilizadas cinco placas de Petri por amostra, sendo considerada cada placa de Petri duas repetições.

As placas foram incubadas a 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e, após 24 h, procedeu-se a avaliação verificando-se a presença ou ausência de crescimento bacteriano suspeito de ser Xam e, observação da formação de halo de hidrólise do amido e lipólise de tween 80.

Tabela 6 – Caracterização de amostras de sementes de algodão utilizadas para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em meio de cultura semi-seletivo desenvolvido

Amostras	Cultivar	Presença de linter ¹	Safra	Procedência
1	IAC 24S2	C	2003/2004	Campinas-SP
2	IAC 24S2	C	2003/2004	Campinas-SP
3	IAC 24S3	C	2003/2004	Campinas-SP
4	CD 406	S	2003/2004	Acreúna-GO
5	CD 406	S	2004/2005	Rondonópolis-MT
6	DELTA OPAL	S	2004/2005	Dourados-MS
7	MAKINA	S	2004/2005	Dourados-MS
8	BRS AROEIRA	S	2003/2004	Dourados-MS
9	CD 406	S	2003/2004	Rondonópolis-MT
10	BRS CEDRO	S	2002/2003	Primavera do Leste-MT
11	CD 406	S	2003/2004	Rondonópolis-MT
12	CD 408	S	2004/2005	Piracicaba-SP
13	CD 406	S	2003/2004	Acreúna-GO
14	CD 406	S	2003/2004	Primavera do Leste-MT
15	BRS AROEIRA	S	2004/2005	Barreiras-BA
16	ITA 90	S	1998/1999	Rio Verde-GO
17	CD 406	S	2003/2004	Acreúna-GO
18	CD 406	S	2003/2004	Acreúna-GO
19	ITA 90	S	2003/2004	Acreúna-GO
20	CD 406	C	2003/2004	Acreúna-GO
21	CD 406	S	2004/2005	Rondonópolis-MT
22	ITA 90	S	2004/2005	Rondonópolis-MT
23	CD 406	S	2004/2005	Rondonópolis-MT
24	CD 406	S	2004/2005	Rondonópolis-MT
25	ITA 90	S	2004/2005	Rondonópolis-MT

1/ C=com linter; S=sem linter.

As placas de Petri foram divididas, riscando-se o fundo da placa com caneta hidrográfica, de maneira que tivesse dois campos por placa de Petri, considerando cada campo uma repetição, ou seja, para cada sub-amostra de semente de algodão, obteve-se oito campos ou oito repetições totalizando 40 repetições ou campos representativos (cinco placas por tratamento).

Tabela 7 – Procedimento para extração de *Xanthomonas axopodis* pv. *malvacearum* de sementes de algodão com e sem linter

Deslintamento das sementes	Tamanho da amostra (g)	Volume de água (mL)	Tamanho do frasco (mL)
Com	120	500	1000
Sem	100	300	500

A amostra de sementes foi considerada portadora de Xam quando houve o crescimento de isolados suspeitos de Xam em pelo menos uma repetição.

2.2.13 Caracterização e identificação de isolados bacterianos de sementes de algodão, suspeitos de serem *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Todos os isolados de Xam utilizados na pesquisa foram submetidos aos testes descritos abaixo, para a confirmação da identidade. Os protocolos para os testes bioquímicos foram utilizados de acordo com Schaad et al. (2001).

2.2.13.1 Teste de patogenicidade

Em casa de vegetação, sementes de algodão, cultivar Acala 90, foram plantadas em vasos (três sementes/vaso) contendo aproximadamente 2,8 L de substrato constituído da mistura de esterco de curral curtido, terra e areia grossa lavada. Quando as plantas estavam na fase de segunda folha verdadeira, em torno de 30 dias após o plantio, procedeu-se a inoculação por meio da técnica de injeção, infiltrando-se a suspensão bacteriana, conforme metodologia descrita no item 2.2.3.4.

2.2.13.2 Teste de coloração de Gram

Todos os isolados bacterianos utilizados durante a pesquisa foram submetidas ao teste de Gram, seguindo a metodologia descrita no item 2.2.3.1.

2.2.13.3.10.3 Teste de KOH

Neste teste, os diferentes isolados freqüentemente encontrados nas sementes de algodão foram testados seguindo a metodologia do item 2.2.3.2.

2.2.13.4 Hidrólise da esculina

Foi vertido em tubos de ensaio o meio de cultura com a seguinte composição: 10,0 g de peptona; 1,0 g de esculina; 0,5 g de citrato férrico; 15,0 g de ágar; 1000 mL de água destilada. Para a verificação da hidrólise da esculina, transferiram-se 5 mL de meio de cultura para cada tubo de ensaio. Autoclavou-se e, após, deixou-se esfriar em posição inclinada em temperatura ambiente. Os diferentes isolados de sementes de algodão, suspeitos de serem Xam, foram semeados na superfície do meio. Foram utilizados três tubos de ensaio por isolado e, como testemunha, foram utilizados tubos com meio de cultura sem o semente de Xam. A incubação foi feita em estufa. A avaliação foi realizada observando-se houve mudança de cor ou não do meio de cultura, considerando que a esculina foi hidrolisada ou a reação foi positiva quando ocorreu escurecimento do meio. A observação visual em condições ambientais normais, a verificação da produção de cor marrom-escura ou prata no meio é indicação de teste positivo, ou seja, a bactéria é capaz de hidrolisar a esculina (SCHAAD et al., 2001).

2.2.13.5 Catalase

Para a realização do teste de catalase, os diferentes isolados de sementes de algodão e do isolado “IBSBF 1733” de Xam foram previamente cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA), em estufa bacteriológica a 28°C por 24 h. Posteriormente, colocados à quantia de uma alçada (de alça de platina) cheia de colônia bacteriana de cada um dos diferentes isolados sobre uma lâmina de vidro e misturado a uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. Para cada isolado testado, foram utilizadas três lâminas de vidro. Para a testemunha foram utilizados os isolados considerados “IBSBF 1733” de Xam.

Na avaliação, foi considerada como reação positiva quando houve formação de bolhas de gás e negativa, na ausência destas (SCHAAD et al., 2001).

2.2.13.6 Teste de redução de nitrato a nitrito

Para realizar este teste, foram utilizados os seguintes reagentes: 10 g de peptona; 5,0 g de extrato de carne; 1,0 g de KNO_3 e 1000 mL de água destilada, que foram colocados em tubos de ensaio (5mL/tubo) e autoclavado. Procedeu-se a repicagem dos diferentes isolados de sementes de algodão e do isolado “IBSBF 1733” de Xam, previamente cultivados em meio NSA, em estufa bacteriológica a 28°C por 24h. Como testemunha, foram incubados três tubos de ensaio sem bactéria. A incubação foi realizada a 28°C, por cinco dias.

Para a avaliação, foram adicionados 3 mL de reagente de Follet & Ratcliff em cada tubo de ensaio, aguardando-se 10 minutos para observar as reações. Quando o meio de cultura no tubo de ensaio ficou laranja-amarronzado teve-se indicativo de reação positiva. No tubo sem semente de bactéria (testemunha) foi adicionado pó de zinco e houve a formação de coloração laranja-amarronzado no meio de cultura, indicando a redução de nitrato a nitrito na presença de pó de zinco (SCHAAD et al., 2001).

2.2.13.7 Teste de crescimento a 40°C

O teste consistiu em preparar uma suspensão levemente turva de cada isolado de sementes de algodão suspeita de ser Xam, em tubo de ensaio, e transferir uma alíquota de 100 μL para os tubos contendo meio nutriente líquido. Como testemunha, foi utilizado o isolado “IBSBF 1733” de Xam. Colocou-se imediatamente em “banho-maria” em água a temperatura de 40°C, por 120 h.

A avaliação foi qualitativa verificando a presença ou ausência de crescimento bacteriano, devido à turvação de meio de cultura (SCHAAD et al., 2001).

2.2.13.8 Teste de hidrólise de gelatina

Para a realização deste teste, foram utilizados diferentes isolados de sementes de algodão, suspeitos de serem Xam e, do isolado “IBSBF 1733” de Xam, previamente cultivados em meio NSA, em estufa a 28°C, por 24h. O meio de cultura empregado para este teste foi constituído de: 3,0 g de extrato de levedura; 5,0 g de peptona; 120,0 g de gelatina; 1000 mL de água destilada.

Para a confecção do meio foi realizada mistura de todos os componentes, aquecidos e em seguida vertido em tubos de ensaio (5 mL/tubo) e autoclavado. O pH foi ajustado para 7,0, antes do meio ser autoclavado.

Após, foi realizado repicagem dos isolados por meio de picada na superfície do meio de cultura (3 tubos/isolado). O tratamento testemunha foi representado por tubos sem semente de cultura bacteriana. Estes foram submetidos à incubação a 28°C, por sete dias, em estufa bacteriológica. Após da incubação, os tubos foram colocados sob refrigeração até que houvesse solidificação do meio de cultura no tratamento testemunha.

A avaliação foi realizada de maneira qualitativa, verificando-se a liquefação do meio de cultura nos tubos onde as bactérias foram repicadas, indicando reação positiva quando houve produção da enzima gelatinase ou reação negativa, quando não aconteceu a liquefação do meio de cultura (SCHAAD et al., 2001).

2.2.13.9 Teste de ação sobre leite Litmus

Foram utilizados diferentes isolados bacterianos obtidos de sementes de algodoeiro, suspeitos de serem Xam e, do isolado “IBSBF 1733” de Xam, previamente cultivados em meio NSA, em estufa bacteriológica a 28°C por 24h.

O meio foi constituído de 100 g de leite em pó desnatado (Molico®) misturados a 1000 mL de água destilada. A mistura foi vertida em tubos de ensaio (5 mL/tubo) e, em seguida, autoclavada por 15 minutos. Após o terceiro dia de preparo do meio para eliminação dos tubos contaminados, foram repicados os diferentes isolados, utilizando três tubos por isolado e três tubos sem a bactéria (testemunha). Estes foram incubados por sete dias, a 28°C.

A avaliação foi qualitativa utilizando-se o corante bromocresol e realizada da seguinte forma: meio azulado (reação alcalina), meio róseo/avermelhado (reação ácida), presença de coágulos (coagulação da caseína) e meio transparente (digestão ou proteólise da caseína), conforme Schaad et al. (2001).

2.2.13.10 Testes sorológicos

Para realizar este teste, baseou-se na reação específica entre antígeno e antissoro, dispondo-se de um antissoro policlonal obtido para Xam, pelo Dr. Luis Otávio S. Berian.

Para a confirmação de identidade dos diferentes isolados bacterianos de sementes, foi utilizado o teste de imunofluorescência indireta, empregado para a bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, com adaptações, seguindo os procedimentos a seguir:

- (a) Todos os isolados de Xam foram cultivados em meio de cultura NA em placas de Petri a 28°C por 24 h em estufa bacteriológica;
- (b) Após este período, efetuou-se a transferência de porções de colônias bacterianas para tubos de ensaio contendo água destilada e esterilizada, visando a obtenção da suspensão bacteriana (10^7 a 10^8 UFC/mL);
- (c) Na lâmina de microscopia, contendo oito alvéolos, colocou-se 30 µL de suspensão bacteriana por alvéolo (2 alvéolos por isolado);
- (d) Secaram-se as lâminas com ar quente produzido por um secador de cabelos, para a fixação das células bacterianas;
- (e) Mergulharam-se as lâminas em etanol 96% por 10 minutos;
- (f) Após, as lâminas foram lavadas três vezes em água destilada, por um minuto cada vez;
- (g) O excesso de água das lâminas foi retirado com ar quente de um secador de cabelos;
- (h) Adicionaram-se 30 µL/alvéolo de antissoro de Xam (título 1:32) previamente diluído em 0,01 M PBS, pH 7,2 acrescido de 0,02 g de nitrito azida de sódio por litro; o controle negativo foi composto de células bacterianas do Isolado F de Xam, tratadas com soro normal do coelho (título 1:32) e o controle positivo pelo Isolado F de Xam, tratado com soro normal do coelho (título 1:32);
- (i) As lâminas foram transferidas para câmara úmida no interior de uma placa de Petri (16 cm) de plástico por um período de 30 minutos, em temperatura ambiente, contendo um pedaço de algodão umedecido com água destilada e esterilizada;
- (j) As lâminas foram retiradas da câmara úmida e lavadas três vezes consecutivas em tampão 0,001 M;
- (k) Secaram-se as lâminas em ar quente de secador de cabelos;
- (l) Adicionou-se antissoro conjugado com isocianato de fluoresceína (anti IGg produzido em cabra), título 1:200; e, incubou-se em câmara úmida no escuro, por 30 minutos em temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$);
- (m) Lavaram-se as lâminas duas vezes em PBS 0,001 M, por cinco minutos cada vez;
- (n) Lavaram-se as lâminas uma vez em água destilada, por um minuto;

- (o) Secaram-se as lâminas com ar quente de secador de cabelos;
- (p) Colocou-se tampão glicerina (uma gota) no centro da lâmina;
- (q) Cobriu-se a lâmina de vidro com lamínula apropriada;
- (r) Examinaram-se as lâminas em microscópio de imunofluorescência munido de luz UV, de 100 watts nos aumentos de 400 e 1000 vezes;
- (s) As reações foram consideradas positivas quando as células bacterianas emitiam fluorescência de cor verde, comparando-se aos controles positivos e negativos.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Os resultados referentes à caracterização dos aspectos morfológicos, bioquímicos e patogênicos de seis isolados de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* encontram-se no Tabela 8.

Plantas de algodão cultivar Acala 90, considerada suscetível à mancha angular, quando inoculadas com os isolados IB 12.471, IB 12.430, IB 12.397, IB 12.392, IB 12.400 e o Isolado IBSBF 1733 de Xam, por meio do método de infiltração de suspensão bacteriana, até 18 dias após a inoculação, mostraram sintomas de mancha angular. As plantas que sofreram a injeção de água destilada e esterilizada (testemunha) permaneceram saudáveis, ou seja, sem manifestação de sintomas da doença. Pôde-se verificar, que todos os isolados estavam com suas características de patogenicidade preservadas. Pode-se verificar que por meio do uso da técnica de infiltração de suspensão bacteriana nos tecidos das plântulas foi possível a bactéria Xam infectar o tecido vegetal, colonizar e multiplicar-se a ponto de causar sintomas de mancha angular. Concordando com Mahmood e Hussain (1993), em que compararam diferentes metodologias de inoculação e verificaram que a técnica de infiltração de suspensão bacteriana de Xam é a mais adequada para verificar patogenicidade deste patossistema.

A atividade lipolítica pôde ser observada para todos os isolados, pois, após a incubação a 28°C por 48 h, foi visualizada ao redor das colônias a presença de um halo opaco de coloração esbranquiçada, o que segundo Schaad et al. (2001), indica atividade lipolítica, característica do gênero *Xanthomonas* quando há presença do tween 80 no meio de cultura.

Verificou-se que no meio de cultura NSA com adição amido solúvel ocorreu formação de um halo transparente ao redor do crescimento das colônias de Xam, após o período de incubação, indicando a hidrólise do amido por todos os isolados. Esta característica está de

acordo com Krieg e Holt (1984), em que descrevem a hidrólise do amido como uma característica diferencial para espécies de *Xanthomonas*. Estes resultados concordam, também, com Schaad (1988), que verificou a utilização de carboidrato pelos diferentes isolados do gênero, por meio do surgimento de zonas de coloração transparente ao redor das colônias.

Ao observar as características culturais do crescimento dos isolados em meio YDC, após incubação por 48 h, verificou-se que as colônias eram amarelas, grandes, bordas lisas, convexas e mucóides, sendo que estas características estão de acordo com aquelas descritas para *Xanthomonas* por Holt et al. (1994) e Schaad et al. (2001).

Tabela 8 – Características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e patogênicas de cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, após 48 horas de incubação a 28°C

Testes	Reação dos isolados*					
	IBSBF 1733	IB 12.471	IB 12.397	IB 12.400	IB 12.430	IB 12.392
Coloração de Gram	-	-	-	-	-	-
Crescimento mucóides e colônias amarelas em YDC	+	+	+	+	+	+
Hidrólise de amido	+	+	+	+	+	+
Hidrólise de Tween 80	+	+	+	+	+	+
KOH	+	+	+	+	+	+
Patogenicidade em algodoeiro	+	+	+	+	+	+

*(+) = reação positiva; (-) = reação negativa.

Ao microscópio ótico com aumento de 10X e 40X e em objetiva de imersão (100X), observou-se que todos os isolados eram Gram-negativos, pelo teste de Gram, em forma de bastonetes, características que estão de acordo com aquelas descritas no Manual de Bergey (KRIEG; HOLT, 1984) para o gênero *Xanthomonas* em que espécies do gênero são vistas ao microscópio ótico como bastonetes retos.

2.3.2 Sensibilidade qualitativa *in vitro* de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a diferentes antimicrobianos

Os isolados de Xam foram testados quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos por meio do teste disco difusão, utilizando-se discos impregnados com antimicrobianos relacionados na Tabela 9, seguindo as recomendações de armazenamento e conservação dos antibióticos da National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2005). Existem tabelas onde se classificam os isolados bacterianos como resistentes, intermediários e sensíveis, de acordo com o antibiótico e com o diâmetro do halo de inibição (BAUER et al., 1966). Porém, a maioria dos

autores considera sensíveis todos os isolados que formarem qualquer tipo de halo de inibição (BAKER, 1970; BAILEY e SCOTT, 1974; LACAZ, 1975). Neste trabalho foram considerados sensíveis os isolados para os quais houve formação de halo de inibição, independente da magnitude do seu diâmetro.

A Figura 1 ilustra a sensibilidade do isolado IB 12.392 de Xam a diferentes antibióticos, visualizados pela formação do halo de inibição de crescimento das bactérias ao redor dos discos de antibióticos depositados sobre o meio de cultura. O tamanho do halo de inibição de crescimento da bactéria foi proporcional à sensibilidade do isolado ao antibiótico e à quantidade de difusão da droga no meio de cultura.

A média dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento de Xam nos testes de sensibilidade aos produtos antimicrobianos e, estão listados na Tabela 9. Verificou-se que a maioria dos isolados de Xam foi sensível à maioria dos antibióticos avaliado.

Foi possível verificar grande variabilidade entre isolados de Xam por meio dos resultados com diferentes reações de suscetibilidade a antibióticos. De acordo com Romeiro et al. (1998), em algumas bactérias fitopatogênicas, como *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, ocorre resistência constitutiva múltipla para alguns antibióticos.

Foram considerados sensíveis os isolados que tiveram formação de halo de inibição de crescimento de Xam sobre o meio de cultura basal relacionando o tamanho médio do diâmetro destes, com dados de padrões internacionais sobre a concentração de antibióticos nos discos Bioanalyse^{®1} (s/d) e Anônimo. Aqueles antibióticos que causaram inibição de crescimento da maioria dos isolados de Xam testados foram descartados de serem utilizados como possíveis drogas na elaboração de um meio semi-seletivo para detecção de Xam em sementes.

Figura 1 – Antibiograma qualitativo com do isolado IB 12.392 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a diferentes antibióticos em discos de papel filtro sobre meio de cultura, após incubação

Pode-se observar que houve variação entre isolados em termos de sensibilidade aos antibióticos nos testes de difusão de antibióticos em meio de cultura, apresentados na Tabela 9. Houve casos emblemáticos com a reação resistência (R) dos isolados IB 12.471 e IB 12.392 ao antibiótico cefetamet (ausência de halo de inibição), enquanto o isolado IB 12.400 foi sensível (S), com raio de halo de inibição de 25 mm. Segundo Applenton (2004), um dos fatores que podem influenciar no tamanho das zonas de inibição está relacionado à solubilidade ou a capacidade de difusão do antibiótico no meio de cultura, porém, a difusão pode ser considerada a

mesma para todas as repetições realizadas neste experimento, logo, o fator que pode ter influenciado foi a variação natural entre isolados, pois, segundo Romeiro et al. (1998), podem existir isolados sensíveis e outros resistentes na natureza.

Também, houve caso de um isolado ser resistente (R), um intermediário (I) e outro sensível (S) ao mesmo antibiótico, como nos testes com cephalotin, fosfomicin, nitrofurazona, cefetamet e teicoplanin e alguns isolados serem sensíveis (S) e outros resistentes (R) ao mesmo antibiótico, como o caso de cefaclor e amoxilin. Também, houve casos de isolados serem sensíveis (S) e outros intermediários (I) (ticarcilin) e intermediários (I) e resistentes (R) (cefadroxil, penicillin), demonstrando a possível variação genética entre os isolados.

Resultados semelhantes de variação de sensibilidade entre isolados de um mesmo patógeno foram encontrados por Lozano e Sequeira (1974) e Souza (1979) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* ao mesmo antibiótico.

Houve diferença na reação de sensibilidade dos diferentes isolados de Xam para os seguintes antibióticos: ticarcillin, erithromycin, cefaclor, penicilin G, clindamycin, cefixime, bacitracin, estreptomycin, sulfadiazol, fosfomicin, levofloxacin, cefetamet, cefadroxil, neomicin, amoxilin, nitrofurazona, levofloxacin, sulfazotrim, cefodizima, teicoplanin. Este resultado mostra que, na natureza, os diferentes isolados de Xam sofrem variações que acarretam em variabilidade entre os isolados de uma mesma espécie ou patovar, fazendo com que estes isolados reajam de forma distinta aos mesmos antibióticos. Segundo Padilha e Costa (2002), a resistência a antibióticos em muitos microrganismos é devida à presença de plasmídios que contêm genes que codificam a síntese de enzimas que inativam antibióticos específicos. Estes são denominados plasmídios de resistência R ou fator R. Isolados com fator R podem ser mutantes que exibem diferente tolerância a drogas como antibióticos e quimioterápicos, ou seja, tratam-se de isolados que sofreram, em algum momento, alguma alteração na estrutura química ou física do DNA.

Em relação ao teste de sensibilidade com disco difusão todos os isolados de Xam mostraram-se resistentes a cefalexin, cefadroxil, oxacelin, lincomycin, nitrofurantoin, cefazolin, tripetoprim, sulfonamida, cefalexin, mupirocin, oxacelin e novobiocin (Tabela 9). Estes antibióticos têm potencial para serem utilizados em meios semi-seletivos, desde que apresentem outras características interessantes, tais como: eficiência contra bactérias saprofíticas, normalmente associadas com sementes ou outras estruturas nas quais se pretende detectar e

identificar Xam; acessibilidade no mercado nacional; preço compatível com o custo das análises de rotina pretendidas; formulação adequada para serem incorporados aos meios de cultura, etc.

O desenvolvimento do meio semi-seletivo para Xam embasou a interpretação dos resultados em tabelas comumente utilizadas para bactérias patogênicas a humanos, pois para servir como orientação terapêutica, os testes *in vitro* devem predizer a provável eficácia *in vivo* dos agentes antimicrobianos (DO BRASIL, 1977). Em nenhum dos trabalhos consultados foi encontrada referência à tabela de sensibilidade de bactérias fitopatogênicas a antibióticos. Desse modo, adotou-se tabelas utilizadas em patologia humana. Portanto, estudos futuros que objetivem comparar o tamanho do halo de inibição de crescimento e o efeito *in vivo* permitirão correlacionar esses valores e criar uma tabela para bactérias fitopatogênicas. Porém, considerando o elevado número de fitobactérias e de tipos de meios de cultura, este estudo demandaria muito tempo e trabalho, para que o somatório de informações subsidiasse a elaboração de uma tabela para fitopatologia.

Os resultados evidenciaram que, nas concentrações dos discos de papel-filtro com os seguintes antibióticos lincomycin, nitrofurantoin, oxacelin, cefalexin, cefadroxil, mupirocin, cephalotin, cefaclor, clindamicin, cefixime, novobiocin, fosfomicin, ceadroxil, amoxilin, nitrofurazona, cefazolin, trimetropim, sulfonamida, cefetamet e teicoplanin, a maioria dos isolados de Xam foi resistente à ação destes produtos (Tabela 9).

Algumas destas drogas não foram encontradas no mercado farmacêutico nacional e, ou, quando encontrados, possuíam um custo muito elevado. Portanto, produtos como cefazolin, trimetoprim, sulfonamida, mupirocin e novobiocin foram descartados por apresentarem uma ou mais limitações de utilização na elaboração de meio semi-seletivo. Foram incluídos os antibióticos cefalexin e cefadroxil, apesar deste segundo de ser de toxidez intermediária contra os isolados IB 12.400 e IB 12.397, por suas características interessantes, como preço e fácil disponibilidade no mercado farmacêutico.

Tabela 9 – Halo de inibição de crescimento e reação de sensibilidade ou resistência de cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a diferentes antibióticos e concentrações, pelo antibiograma qualitativo

(continua)

Antibióticos	Limite de reação		Concentr. µg/disco	Isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>									
	mm			IB 12.400*		IB 12.471*		IB 12.392*		IB 12.430		IB 12.397*	
	R	S		Halo	Reação ²	Halo	Reação ²	Halo	Reação ²	Halo	Reação ²	Halo	Reação ²
	<	>		mm		mm		mm		mm		Mm	
Amikacin	14	17	30	27,2	S	24,2	S	27,3	S	23,9	S	30,6	S
Ceforoxime	14	18	30	27,2	S	21,8	S	26,8	S	25,0	S	28,0	S
Mupirocin	13	19	30	8,0	R	0,0	R	8,8	R	3,0	R	11,3	I
Ofloxacin	12	16	5	28,6	S	30,2	S	33,6	S	35,8	S	31,3	S
Sulphamethoxazole	10	16	23	30,0	S	25,8	S	25,6	S	25,0	S	27,2	S
Ticarcillin	16	23	10	24,2	S	20,4	I	24,4	S	22,5	I	25,7	S
Methicillin	9	14	5	17,0	S	16,4	S	15,0	S	17,4	S	17,2	S
Ácido Nalidixic	13	19	30	26,0	S	28,0	S	25,1	S	25,5	S	25,1	S
Vancomycin	14	17	30	25,0	S	22,6	S	24,7	S	26,0	S	24,1	S
Ceftazidime	14	20		31,2	S	32,2	S	30,8	S	30,0	S	31,1	S
Netilmycin	12	15	30	20,2	S	20,4	S	20,4	S	22,1	S	24,2	S
Erythromycin	13	21	15	24,6	S	19,6	I	25,6	S	21,5	S	29,2	S
Aztreonam	15	22	30	31,0	S	27,9	S	26,9	S	27,3	S	30,6	S
Cephalothin	14	18	30	23,7	S	10,0	R	15,8	I	3,6	R	24,2	S
Ciprofloxacin	15	21	5	33,3	S	33,5	S	31,0	S	35,1	S	31,6	S
Pefloxacin	15	22	5	30,0	S	29,2	S	28,3	S	33,0	S	30,2	S
Cefaclor	14	20	30	20,6	S	6,6	R	21,0	S	3,0	R	21,8	S
Polymyxin B	8	12	300	17,6	S	14,4	S	18,2	S	16,8	S	18,1	S
Cefepime	14	18	30	38,5	S	31,9	S	37,9	S	37,4	S	36,4	S
Pennicillin G	19	28	10	19,9	I	22,2	I	13,8	R	22,5	I	20,0	I
Oxacillin	10	18	1	0,0	R	2,8	R	0,0	R	2,1	R	0,0	R
Gentamicin	6	10	120	20,5	S	19,9	S	21,6	S	20,0	S	22,5	S
Cefoxitin	14	18	30	27,6	S	26,6	S	28,2	S	30,6	S	31,2	S
Clarithromycin	13	18	15	24,9	S	30,4	S	25,0	S	25,2	S	24,8	S

Tabela 9 – Halo de inibição de crescimento e reação de sensibilidade ou resistência de cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv.*malvacearum* a diferentes antibióticos e concentrações, pelo antibiograma qualitativo

(Continua)

Antibióticos	Limite de reação		Concentr. µg/disco	Isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>									
	mm			IB 12.400*		IB 12.471*		IB 12.392*		IB 12.430*		IB 12.397*	
	R	S		Halo	Reação ²	Halo	Reação ²	Halo	Reação ²	Halo	Reação ²	Halo	Reação ²
	<	>		mm		mm		mm		mm		Mm	
Clindamycin			2	10,6	R	8,2	R	9,7	R	17,3	I	13,6	R
Cefixime	15	19	5	20,0	S	22,2	S	20,2	S	23,8	S	18,4	I
Lincomycin	9	15	2	0,0	R	0,0	R	0,0	R	0,0	R	0,0	R
Nitrofurantoin	14	17	300	0,0	R	0,0	R	0,0	R	0,0	R	0,0	R
Azithromycin	13	18	15	32,5	S	34,1	S	31,8	S	33,4	S	29,7	S
Bacitracin	8	13	10	12,3	I	20,2	S	17,9	S	13,2	S	16,5	S
Kanamycin	13	18	30	26,3	S	25,5	S	24,0	S	23,2	S	25,0	S
Ampicillin	14	17	30	22,9	S	25,2	S	22,0	S	18,7	S	24,4	S
Carbencillin	13	17	100	32,0	S	28,8	S	27,4	S	27,4	S	33,2	S
Tobramicin	12	15	10	19,0	S	25,0	S	19,5	S	17,5	S	19,0	S
Forazolidona	10	18	20	28,0	S	25,0	S	24,0	S	37,5	S	21,5	S
Novobiocin	17	22	30	9,5	R	15,0	R	13,0	R	7,0	R	10,5	R
Netilmicin	12	15	30	19,0	S	30,0	S	26,5	S	19,5	S	30,5	S
Ácid Pipemidic	12	18	2	25,0	S	31,0	S	22	S	20,0	S	30,0	S
Sulfadiazol	12	17	250	20,0	S	20,0	S	13,0	I	18,5	S	15,0	I
Fosfomicin	12	16	200	17,0	S	6,0	R	8,0	R	10,5	R	0,0	R
Cefotaxima	14	23	30	26,5	S	29,0	S	23,0	I	23,5	S	33,5	S
Lovefloxacin	13	17	5	15,0	I	40,0	S	30,0	S	30,0	S	39,0	S
Espiramicin	12	14	10	15,0	S	28,0	S	24,5	S	20,0	S	25,0	S
Cefadroxil	14	18	30	15,0	I	0,0	R	0,0	R	0,0	R	15,0	I
Neomicin	12	17	30	19,0	S	20,0	S	23,5	S	15,0	I	25,0	S

Tabela 9 – Halo de inibição de crescimento e reação de sensibilidade ou resistência de cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a diferentes antibióticos e concentrações, pelo antibiograma qualitativo

(conclusão)

Antibióticos	Limite de reação		Concentr. µg/disco	Isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>									
	mm			IB 12.400*		IB 12.471*		IB 12.392*		IB 12.430*		IB 12.397*	
	R	S		Halo	Reação ²	Halo	Reação ²	Halo	Reação ²	Halo	Reação ²	Halo	Reação ²
	<	>		mm		mm		mm		mm		mm	
Amoxilin	19	20	20	15,0	R	22,0	S	20,5	S	20,0	I	25,0	S
Nitrofurazona	14	17	15	18,5	S	10,0	R	16,0	I	18,0	S	12,0	R
Levofloxacin	13	22	5	20,0	I	30,0	S	35,0	S	25,0	S	39,0	S
Sulfazotrim	12	23	15	20,0	I	25,0	S	25,0	S	17,5	I	30,0	S
Kanamycin	13	18	30	26	S	32,5	S	32	S	25,5	S	40	S
Tianfenicol	12	18	30	27,5	S	35	S	35	S	27,5	S	35	S
Sulbactam+	11	14	10	31	S	35	S	25	S	32	S	35	S
Ampicilin													
Cefazolin	14	18	30	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Doxiciclin	12	16	30	32	S	40	S	31	S	35	S	32,5	S
Cefodizima	13	18	15	30	S	22	S	25	S	15	I	35	S
Estreptomycin	15	18	30	21,5	S	32	S	22,5	S	24	S	32	S
Trimetoprim	10	16	23	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Imipenem	13	16	10	35	S	30	S	40	S	40	S	42,5	S
Sulfonamida	12	17	250	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Ticarcilina +	14	15	75	26,5	S	35	S	38,5	S	35	S	40	S
Ác. Clavulânico													
Cefetamet	14	18	10	25	S	0	R	0	R	15	I	13	R
Tetracilina	14	19	30	25	S	35	S	30	S	35	S	35	S
Ác. Clavulanico +	13	18	20	26,5	S	35	S	30	S	26,5	S	35	S
Amoxilin													
Cefalexin	14	18	30	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Teicoplanin	10	14	30	10	I	0	R	11	I	0	R	15	S

¹Fonte: Anônimo (1997). ²/= Conforme Tabela Bioanalysis®(1997); *= média de quatro repetições; S= isolado considerado sensível à ação do antibiótico; R= isolado considerado resistente a ação do antibiótico; I= intermediário, depende do grau de variabilidade do isolado.

2.3.3 Sensibilidade quantitativa *in vitro* de diferentes isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* a diferentes concentrações e combinações de antibióticos

Conforme os resultados da Tabela 9, os antibióticos que apresentaram baixa toxicidade aos isolados de Xam foram: cefazolin, trimetoprim, sulfonamida, mupirocin, novobiocin, cefalexin, cefadroxil, lincomycin, oxacelin e nitrofurantoin, nas concentrações testadas. Estes antibióticos foram utilizados no antibiograma quantitativo a fim de verificar até que concentração os antibióticos selecionados no antibiograma qualitativo seriam inócuos nos cinco isolados de Xam, determinando, assim, a possível quantidade de cada antibiótico a ser adicionada ao meio básico.

Os antibióticos aos quais a maioria dos isolados foi resistente foram: cefalexin (100 µg/mL), cefadroxil (50 µg/mL), lincomycin (50 µg/mL), oxacelin (1µg/mL) e nitrofurantoin (50 µg/mL). Estes produtos mostraram potencialidades de utilização na elaboração de meio de cultura semi-seletivo para Xam, pois, além de não inibir o crescimento dos isolados de Xam testados, foram encontrados no mercado farmacêutico nacional a um custo compatível.

Foram escolhidas as concentrações 50% menores do que as maiores concentrações na qual a maioria dos isolados se mostrou sensível. Segundo Trabulsi; Mímica e Mimica (2002), uma bactéria é considerada sensível a um produto antimicrobiano quando o seu crescimento é inibido *in vitro* por uma concentração três, ou mais, vezes inferiores àquela que o produto não cause alterações no crescimento ou desenvolvimento normal da bactéria. A sensibilidade dos isolados de Xam a diferentes concentrações dos antibióticos selecionados no antibiograma quantitativo foi variável conforme Tabela 10.

Observou-se que cefalexina permitiu o crescimento de Xam em todas as concentrações avaliadas (0 a 100 µg/mL), exceto o crescimento de um isolado utilizando a concentração de 100 µg/mL, sendo, portanto, potencial antibiótico para ser adicionado aos meios semi-seletivos. Lincomycin promoveu interferência negativa no crescimento de apenas um isolado (IB 12.471) e cefadroxil de apenas dois isolados (IB 12.400 e IB 12.471), na concentração de 100 µg/mL. Quatro isolados apresentaram redução no crescimento quando submetidos a nitrofurantoin na concentração de 100 µg/mL (Tabela 10). Oxacelin mostrou efeito inibidor do crescimento de Xam a partir de 5 µg/mL, chegando a inibir completamente o crescimento de todos os isolados a partir da concentração de 30 µg/mL. Portanto, este antibiótico não tem potencial para ser

utilizado no desenvolvimento de meio-seletivo para detecção e identificação de Xam à estas concentrações (Tabela 10).

Foram necessárias novas avaliações de antibiograma quantitativo para oxacelin (500 mg) com concentrações menores. Das dosagens de oxacelin testadas no novo antibiograma de seleção quantitativa, 1 µg/mL foi a que não interferiu no crescimento de nenhum dos cinco isolados de Xam, obtendo-se crescimento similar ao meio basal (Tabela 11).

Tabela 10 – Sensibilidade de cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) sob diferentes concentrações de antibióticos designados eficientes pelo antibiograma qualitativo em meio nutriente sacarose agar (NSA)

(continua)

Antibióticos	Concentração µg/mL	Isolados de Xam				
		IB 12.400	IB 12.471	IB 12.392	IB 12.430	IB 12.397
Nitrofurantoin	0	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	100	+	±	±	±	±
Lincomycin	0	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	100	+	+	±	+	+
Oxacelin	0	+	+	+	+	+
	5	±	+	±	+	±
	10	±	±	±	±	-
	15	±	-	±	±	-
	20	±	-	±	-	-
	30	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-

Tabela 10 – Sensibilidade de cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) sob diferentes concentrações de antibióticos designados eficientes pelo antibiograma qualitativo em meio nutriente sacarose agar (NSA)

(conclusão)

Antibióticos	Concentração µg/mL	Isolados de Xam				
		IB 12.400	IB 12.471	IB 12.392	IB 12.430	IB 12.397
Cefalexin	0	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	±	+
Cefadroxil	0	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+
	50	+	±	+	+	+
	100	c	+	±	+	+

* (+)=colônias semelhantes ao tratamento testemunha; (±)=inibição parcial do crescimento; (-)=inibição do crescimento.

Verificou-se que não houve efeito de sinergismo e, ou, antagonismo entre os isolados de Xam testados aos antibióticos utilizados, pois quando nitrofurantoin (50 µg/mL), lincomycin (50 µg/mL) e oxacelin (1 µg/mL) foram incorporados conjunta e individualmente ao meio básico, nas concentrações selecionadas, não houve qualquer modificação no desenvolvimento das colônias (Tabelas 14 e 15). Com a incorporação conjunta dos antibióticos cefalexin (50 µg/mL) e cefadroxil (50 µg/mL) ao meio básico, não houve ausência do crescimento de nenhum dos isolados de Xam.

Tabela 11 – Sensibilidade de crescimento de cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) em diferentes concentrações de oxacelin no meio de cultura basal (NSA)*

Concentração (µg/mL)	Isolados de Xam				
	IB 12.471	IB 12.392	IB 12.400	IB 12.397	IB 12.430
0	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+
3	±	+	±	+	+
2	±	+	+	+	+
4		±v	±	+	+
5	±	+	±	+	±
10	±	±	±	±	-

* (+)= crescimento similar ao do controle; (-)= ausência de crescimento; (±)= interferência no crescimento (colônias visualmente menores que o controle ou modificação da cor, forma da colônia, etc).

A incorporação do antibiótico oxacelin (1 µg/mL) em conjunto com nitrofurantoin (50 µg/mL) e lincomycin (50 µg/mL) não reprimiu o crescimento de Xam, nem quando se incorporou somente lincomycin (50 µg/mL) e nitrofurantoin (50 µg/mL). Porém, quando foi realizada a incorporação de lincomycin (100 µg/mL) e nitrofurantoin (100 µg/mL), houve menor crescimento das colônias para três isolados de Xam e ausência de crescimento para dois isolados, comparados à testemunha (Tabela 12).

Tabela 12 – Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) após a incorporação conjunta de diferentes antibióticos ao meio de cultura NSA

Tratamentos	Isolados de Xam				
	IB 12.471	IB 12.392	IB 12.400	IB 12.397	IB 12.430
^{1/} N (50 µg/mL) + L (50µg/mL) + O (1 µg/mL)	+ ^{2/}	+	+	+	+
L (50 µg/mL)+ O (1 µg/mL)	+	+	+	+	+
N (50 µg/mL)+ O (1 µg/mL)	+	+	+	+	+
N (50 µg/mL) + L (50 µg/mL) + O (1 µg/mL)	+	+	+	+	+
L (100 µg/mL) +N (100 µg/mL)	±	±	-	±	-
L (50 µg/mL) + N (50 µg/mL)	+	+	+	+	+
Cefalexin (50 µg/mL) + Cefadroxil (50 µg/mL)	+	+	+	+	+
Testemunha	+	+	+	+	+

^{1/} N=Nitrofurantoin; L=Lincomycin; O=Oxacelin. ^{2/} (+)= crescimento semelhante a testemunha; (-)= ausência de crescimento; (±)= crescimento inferior a testemunha.

2.3.4 Avaliação *in vitro* da ação de diferentes fungicidas adicionados no meio cultura NSA quanto ao crescimento de Xam

Os resultados da avaliação qualitativa da ação *in vitro* de diferentes concentrações de antifúngicos no crescimento de cinco isolados de Xam podem ser observados na Tabela 13.

Houve repressão do crescimento de quatro dos cinco isolados testados como o fungicida tebuconazole, a partir da concentração de 5 µL/mL de ingrediente ativo no meio de cultura, indicando que este produto não tem potencial de ser utilizado na composição de meio de cultura semi-seletivo para Xam, por inibir o crescimento do organismo alvo.

Os fungicidas triadimenol e clorothalonil, em todas concentrações testadas, não inibiram o crescimento dos isolados de Xam avaliados, mostrando terem potencial uso na elaboração de meio de cultura semi-seletivo para Xam. Segundo Metha; Bomfeti e Bolognini (2005), o fungicida tiadimenol não afeta o crescimento de Xam.

O fungicida tiofanato metílico, na concentração de 100 µL/mL, inibiu somente o crescimento um dos isolados de Xam. Já ciproconazole inibiu todos os isolados de Xam nesta concentração. Os fungicidas tolylfluanid e pencycuron interferiram no crescimento de Xam a partir da concentração de 50 µL/mL.

Tabela 13 – Ação *in vitro* de diferentes concentrações de fungicidas no crescimento de cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam)

(continua)

Ingrediente ativo	Concentração µg/mL	Isolados de Xam				
		IB 12.400	IB 12.471	IB 12.392	IB 12.430	IB 12.397
Tiofanato metílico	0	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	100	+	±	+	+	+
Triadimenol	0	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+
Clorothalonil	0	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+
Tebuconazole	0	+	+	+	+	+
	5	±	±	±	±	+
	10	±	±	±	±	+
	50	±	±	±	±	+
	100	±	±	±	±	+

Tabela 13 – Ação *in vitro* de diferentes concentrações de fungicidas no crescimento de cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam)

(conclusão)

Ingrediente ativo	Concentração µg/mL	Isolados de Xam				
		IB 12.400	IB 12.471	IB 12.392	IB 12.430	IB 12.397
Tolylfluanid	0	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	50	±	±	+	±	+
	100	±	±	+	±	±
Cyproconazole	0	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	50	+	+	+	+	+
	100	±	±	±	±	±
Pencycuron	0	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	50	±	±	±	+	±
	100	±	±	±	±	±

(+) = crescimento da colônia de Xam semelhante ao controle; (-) = ausência de crescimento de Xam; (±) = interferência na morfologia, coloração e tamanho da colônia de Xam.

2.3.5 Ação de fungicidas adicionados ao meio de cultura NSA no crescimento de diferentes fungos

Os fungicidas selecionados para o teste de fungitoxicidade *in vitro* foram avaliados quanto à inibição do crescimento de Xam no meio de cultura. Foram avaliados os seguintes fungicidas: triadimenol (Baytan 150 SC), clorothalonil (Daconil 500 PM), tiofanato metílico (Cercobin 700 PM), pencycuron (Monceren 250 PM), tolylfluanid (Euparen 500 PM) nas concentrações de 0, 5, 10, 50 e 100 µg/mL. Os resultados encontram-se na Tabela 13.

De acordo com a Tabela 14 pode-se observar que os fungicidas clorothalonil (10 µg/mL), tiofanato metílico (10 µg/mL) apresentaram controle satisfatório da maioria dos fungos avaliados.

O fungicida clorothalonil a 10 µg/mL apresentou controle satisfatório da maioria dos fungos avaliados, com exceção de *Nigrospora* sp., porém, foi o único fungicida que apresentou controle satisfatório do fungo *Rhizopus* sp., conforme Tabela 14.

O fungicida tiofanato metílico, nas quatro concentrações avaliadas, controlou satisfatoriamente o crescimento dos fungos *Fusarium* sp., *Bipolaris* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Epicocum* sp. e *Nigrospora* sp., nas

concentrações de 10 µg/mL, porém, não controlou satisfatoriamente o crescimento de *Rhizopus* sp. e *Sclerotinia* sp..

Os fungicidas penicuron, triadimenol e tolylfluanid apresentaram baixa inibição no crescimento dos fungos avaliados.

Deste modo, os fungicidas clorothalonil, na concentração de 10 µg/mL e tiofanato metílico na concentração de 10 µg/mL, foram selecionados para serem incorporados na composição do meio semi-seletivo em desenvolvimento.

Tabela 14 – Fungitoxidade *in vitro* de 11 fungos freqüentemente associados às sementes de algodão às diferentes concentrações de fungicidas em diferentes concentrações

Ingrediente Ativo	Conc. (µg/mL)	Percentual inibição crescimento dos fungos (%)										
		<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Pennicillium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Sclerotinia</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp.
Clorothalonil	0	0,0 A	68,9 B	0,0	0,0 A	0,0	0,0 A	0,0 B	0,0 C	0,0 A	0,0	0,0
	5	83,3 B	86,7 B	100,0	91,1 C	66,7	86,7 B	100,0 B	100,0 C	50,0 AB	100,0	10,0
	10	90,0 B	88,9 B	100,0	91,1 C	77,8	100,0 B	100,0 B	100,0 C	50,0 AB	100,0	18,9
	50	90,0 B	88,9 B	100,0	92,2 C	77,8	100,0 B	100,0 B	100,0 C	55,6 AB	100,0	28,9
	100	90,0 B	90,0 B	100,0	92,2 C	77,8	100,0 B	100,0 B	100,0 C	60,0 AB	100,0	44,4
r		0,47 n.s.	0,53**	0,44 n.s.	0,45 n.s.	0,50 n.s.	0,50 n.s.	0,44 n.s.	0,44 n.s.	0,58	0,44	0,95
Tiofanato Metílico	0	0,0 A	57,8 A	0,0	0,0 A	0,0	0,0 A	0,0 A	0,0 ABC	0,0 A	0,0	0,0
	5	62,2 B	93,3 B	100,0	80,0 BC	73,3	82,2 B	72,2 AB	75,6 BC	100,0 B	26,7	100,0
	10	66,7 B	100,0 B	100,0	82,2 BC	77,8	88,9 B	81,1 AB	77,8 BC	100,0 B	61,1	100,0
	50	66,7 B	100,0 B	100,0	83,3 BC	77,8	100,0 B	86,7 AB	85,6 BC	100,0 B	66,7	100,0
	100	66,7 B	100,0 B	100,0	83,3 BC	77,8	100,0 B	91,1 AB	88,9 BC	100,0 B	66,7	100,0
r		0,47 n.s.	0,51 n.s.	0,44 n.s.	0,46 n.s.	0,46 n.s.	0,57 n.s.	0,58 n.s.	0,56 n.s.	0,44 n.s.	0,68 n.s.	0,44 n.s.
Triadimenol	0	0,0 A	84,4 B	73,3	5,6 AB	66,7	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0	0,0
	5	0,0 A	84,4 B	73,3	7,8 AB	66,7	0,0 A	0,0 A	0,0 A	8,9 A	6,7	100,0
	10	0,0 A	83,3 B	100,0	22,2 AB	70,0	0,0 A	0,0 A	1,1 A	11,1 A	24,4	100,0
	50	0,0 A	57,8 B	100,0	24,4 AB	74,4	0,0 A	0,0 A	7,8 A	11,1 A	50,0	100,0
	100	0,0 A	57,8 B	100,0	36,7 AB	74,4	0,0 A	0,0 A	14,4 A	30,0 A	54,4	100,0
R		-	0,17 n.s.	0,66 n.s.	0,90 *	0,87 *	-	-	1,0 **	0,91 *	0,90 *	0,44 n.s.
Pencycuron	0	0,0 A	13,3 A	38,9	4,4 A	24,4	0,0 A	0,0 A	0,0 AB	0,0 A	0,0	0,0
	5	0,0 A	13,3 A	36,7	4,4 A	46,7	48,9 AB	100,0 B	4,4 AB	54,4 AB	100,0	91,1
	10	0,0 A	13,3 A	38,9	4,4 A	27,8	61,1 AB	100,0 B	18,9 AB	56,7 AB	100,0	94,4
	50	0,0 A	10,0 A	33,3	22,2 A	26,7	66,7 AB	100,0 B	40,0 AB	63,3 AB	100,0	96,7
	100	0,0 A	10,0 A	100,0	22,2 A	85,6	66,7 AB	100,0 B	44,4 AB	63,3 AB	100,0	96,7
R		-	-0,90 *	0,85 *	0,90 *	0,79 n.s.	0,59 n.s.	0,44 n.s.	0,91 *	0,55 n.s.	0,44 n.s.	0,47 n.s.
	0	0,0 A	12,2 A	73,3	20,0 AB	63,3	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0	0,0

Tabela 14 – Fungitoxidade *in vitro* de 11 fungos freqüentemente associados à sementes a sementes de algodão à dferentes fungicidaass em diferentes concentrações conclusão

Ingrediente Ativo	Conc. (µg/mL)	Percentual Inibição Crescimento dos fungos										
		(%)										
		<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Pennicillium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Sclerotinia</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp.
Tolylfluanid	0	0,0 A	12,2 A	73,3	20,0 AB	63,3	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0	0,0
	5	0,0 A	12,2 A	73,3	20,0 AB	63,3	5,6 A	48,9 AB	0,0 A	0,0 A	30,0	23,3
	10	0,0 A	11,1 A	34,4	31,1 AB	31,1	8,9 A	53,3 AB	0,0 A	0,0 A	53,3	53,3
	50	0,0 A	11,1 A	34,4	24,4 AB	34,4	11,1 A	61,1 AB	0,0 A	0,0 A	55,6	55,6
	100	0,0 A	15,6 A	34,4	24,4 AB	34,4	11,1 A	66,7 AB	0,0 A	0,0 A	58,9	55,6
r	-	0,75 n.s.	-0,66 n.s.	0,15 n.s.	-0,60 n.s.	0,72 n.s.	0,65 n.s.	-	-	0,67 n.s.	0,66 n.s.	
F	12,11**	60,82**	1,59	6,51**	1,06	7,36**	4,56**	8,64**	7,23**	2,43 n.s.	2,89 n.s.	
C.V. (%)	89,57	20,56	47,40	66,37	45,86	72,24	64,31	34,35	71,72	64,55	62,40	

^{1/} Diam= diâmetro de crescimento; PC= percentual de crescimento; PIC= percentual de inibição de crescimento de colônia fungica; r:coeficiente de correlção; n.s.: não significativo; *: significativo com 95% de confiança; **: significataivo com 99% de confiança. ; C.V.: coeficiente de variação; F: Teste de F (análise de variância)

2.3.6 Ação de diferentes antibióticos e fungicidas adicionados ao meio de cultura NSA sobre o crescimento de Xam e de bactérias freqüentemente associadas a sementes de algodão

Foram isoladas 12 diferentes bactérias de amostras de sementes de algodão denominadas: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, XIX, X, XI e XII, que foram caracterizadas por observações de morfologia das colônias e por testes bioquímicos. Os resultados podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15 – Caracterização de diferentes isolados bacterianos freqüentemente associados a sementes de algodão

Isolados bacterianos	Características das colônias						
	Gram	KOH	Hidrólise de amido	Formato celular ^{1/}	Coloração da colônia	Bordas da colônia	Formato da colônia
I	-	-	-	BR	amarelo opaco	lisa	achatada
II	+	+	-	BR	amarelo brilhante	lisa	convexa
III	+	+	-	BR	branco opaco	rugosa	convexa
IV	-	-	-	ET	amarelo brilhante	lisa	convexa
V	-	-	-	BR	amarelo brilhante	lisa	convexa
VI	+	+	-	BR	cor de laranja	lisas	achatada
VII	-	-	-	BR	amarelo opaco	rugosa	achatada
VIII	-	-	-	DC	amarelo brilhante	lisa	convexa
IX	+	+	+	BR	branca brilhante	lisa	achatada
X	-	-	+	BR	amarelo brilhante	rugosa	convexa
XI	-	-	-	BR	amarelo brilhante	lisa	achatada
XII	+	+	+	BR	amarelo opaco	lisa	achatada

^{1/} BR = bastonetes retos; ET = estreptobacilos; DC = diplococos.

Para determinação da capacidade que o meio semi-seletivo possui de inibir o crescimento da flora microbiota, que não Xam, foram utilizadas avaliações da sensibilidade *in vitro* dos 12 isolados bacterianos provenientes de sementes de algodão, e de cinco isolados de Xam, aos antibióticos nitrofurantoin, lincomycin, cefadroxil, oxacelin e cefalexin, nas diferentes concentrações testadas e os resultados encontram-se na Tabela 16.

Observou-se que houve supressão do crescimento da flora bacteriana saprófita associada a sementes de algodão de apenas 8,3% dos isolados quando a composição do meio de cultura foi formada pela incorporação conjunta dos antibióticos: nitrofurantoin e lincomycin na concentração de 50 µg/mL mais 1 µg/mL de oxacelin e tiofanato metílico (10 µg/mL) e

clorothalonil (1 µg/mL). Nesta situação não houve interferência em nenhum dos isolados de Xam testados. Quando as concentrações de nitrofurantoin e lincomycin foram aumentadas para 100 µg/mL mantendo a mesma concentração de 1 µg/mL de oxacelin, pôde-se observar que o controle dos isolados que acompanhavam as sementes foi de 16,7%, comparado à testemunha, porém, houve menor desenvolvimento das colônias de Xam, com supressão de 40% dos isolados. Para as duas situações o meio apresentou baixa supressão dos contaminantes, portanto, estes antibióticos não podem ser utilizados para a confecção de meio semi-seletivo para Xam (Tabela 16).

O antibiótico cefadroxil nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL apresentou supressão de 50% dos isolados saprófitas. Porém, cefadroxil, na concentração de 50 µg/mL, apresentou 20% de supressão de crescimento dos isolados de Xam e, na concentração de 100 µg/mL, 50%. Segundo Randhawa e Schaad (1983), a inclusão de compostos antibióticos e antifúngicos ao meio básico para a inibição de saprófitas deve ser minuciosamente estudada, pois a mínima sensibilidade a estes compostos pode prejudicar a recuperação das bactérias alvo nas sementes. Portanto, este produto não pode ser utilizado para a confecção de meio de cultura semi-seletivo para isolamento de Xam.

A adição de cefalexin na concentração de 50 µg/mL mais os fungicidas tiofanato metílico (10 µg/mL) e clorothalonil (10 µg/mL) no meio de cultura NSA proporcionou controle de 75% dos isolados saprófitas e nenhuma supressão de crescimento dos isolados de Xam. Porém, quando incorporou-se cefalexin ao meio de cultura com a concentração de 100 µg/mL associadas aos dois fungicidas, nas mesmas concentrações anteriores, ocorreu inibição de crescimento em um dos isolados de Xam. De acordo com Valarini (1995), o uso de cefalexina (40 mg) e clorothalonil (50 mg) para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomate, é um método eficiente pois apresenta excelente especificidade e sensibilidade ao patógeno.

A incorporação conjunta de cefalexin (50 µg/mL) e clorothalonil (10 µg/mL) mais tiofanato metílico (10 µg/mL) ao meio de cultura NSA proporcionou supressão satisfatória dos diferentes isolados saprófitas, tanto os bacterianos como os fungicos, sem afetar o crescimento de Xam. Este resultado está de acordo com Di Ming; Schaad e Roth (1991) em que ao estudar a seletividade de *Xanthomonas* spp. nas sementes de arroz, observaram que o antibiótico cefalexin (20 g/L) não causava nenhuma redução de crescimento dos isolados de *Xanthomonas* spp.

Tabela 16 – Ação *in vitro* de diferentes antibióticos e fungicidas, em diferentes concentrações, adicionados no meio de cultura basal, no crescimento de doze isolados bacterianos freqüentemente associados a sementes de algodão e de cinco isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Isolados bacterianos	Tratamentos								Testemunha
	N+L+O+TM+ CL (50/50/1/10/10 µg/mL)	N+L+O+ TM+ CL (100/100/1/10/10 µg/mL)	CD (50 µg/mL)	CF (50 µg/mL)	CD (100 µg/mL)	CF (100 µg/mL)	CF+ CD (50+50 µg/mL)	CF+ TM+ CL (50/10/10 µg/mL)	
I	+	+	+	±	+	±	±	±	+
II	+	+	-	-	-	-	-	-	+
III	+	+	±	±	±	±	±	±	+
IV	±	±	-	-	-	-	-	-	+
V	+	+	-	-	-	-	-	-	+
VI	±	±	+	-	+	-	-	-	+
VII	±	±	+	+	+	+	+	+	+
VIII	+	-	-	-	-	-	-	-	+
IX	+	+	+	-	+	-	-	-	+
X	+	+	+	-	+	-	-	-	+
XI	+	+	-	-	-	-	-	-	+
XII	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Inibição (%)	8,3	16,7	50,0	75,0	50,0	75,0	75,0	75,0	0,0
Xam									
IB 12.471	+	±	+	+	-	-	+	+	+
IB 12.430	+	-	+	+	+	+	+	+	+
IB 12.397	+	±	+	+	-	±	+	+	+
IB 12.400	+	-	+	+	+	+	+	+	+
IB 12.392	+	±	±	+	±	+	+	+	+
Inibição (%)	0,0	40,0	20,0	0,0	50,0	25,0	0,0	0,0	0,0

N=nitrofurantoin; L=lincomycin; O=oxacelin; CF= cefalexin; CD= cefadroxil; TM tiofanato metílico; CL= clorothalonil; (+)= presença de crescimento dos isolados; (-)= ausência de crescimento dos isolados; (±)= colônias com crescimento menor que o controle.

Apesar de o meio semi-seletivo idealizado não suprimir totalmente o crescimento da flora bacteriana, os isolados “saprófitas” que não foram controlados formavam colônias bacterianas de coloração esbranquiçada, tornando mais fácil distinção das colônias de Xam, pois possuem coloração amarela (Figura 2). Segundo Claflin et al. (1987), é difícil desenvolver um

meio de cultura que restrinja o crescimento de todos os contaminantes, da microflora diversificada, que usualmente se encontram associados às sementes.

Figura 2 – Crescimento de quatro isolados bacterianos frequentemente saprófitas (I, III, V e VII) de sementes de algodão e de um isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (IB 12.430) em meio de cultura semi-seletivo (MSS) com adição do antibiótico cefalexina e dos fungicidas tiofanato metílico e clorothalonil e em meio de cultura NSA

A alta seletividade minimiza problemas de contaminação por outros organismos da espermosfera, bem como, os problemas advindos do fato dos saprófitas crescerem mais rápido e inibirem o crescimento da bactéria alvo, que geralmente apresenta crescimento mais lento (MOURA; ROMEIRO, 1993).

2.3.7 Determinação de índice de repressão

O meio semi-seletivo ficou assim constituído: 3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona, 15,0 g de ágar, 1000 mL de água destilada, 0,25 g de CaCl_2 , 10,0 g de amido solúvel, 10,0 mL de Tween 80, 150 μL de solução de cristal violeta (solução 1%), 50 μg de cefalexina, 10 μg de tiofanato metílico e 10 μg de clorothalonil.

Os resultados das contagens de unidades formadoras de colônias nos meios semi-seletivo e NSA encontram-se na Tabela 17.

Verificou-se que houve baixo índice de repressão do meio semi-seletivo para Xam, principalmente quando se comparou o valor encontrado com índices de meios desenvolvidos para outras bactérias como é o caso do desenvolvido para *Pseudomonas marginalis* que foi de 90%

(SOARES; VALARINI; MENTEN, 2001) e de 77,5% para *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (OLIVEIRA, 1995).

Meios de cultura seletivos e semi-seletivos costumam ser repressivo, mesmo para o organismo para o qual ele foi desenvolvido (KLEMENT; RUDOLPH; SANDS, 1990).

Não se observou nenhuma modificação em termos de morfologia das colônias de Xam desenvolvidas no meio de cultura semi-seletivo em relação às colônias crescidas no meio NSA, pois as colônias desenvolvidas neste meio eram circulares, amarelas, convexas, brilhantes, de bordo liso e apresentavam hidrólise de amido.

Tabela 17 – Número de unidades formadoras de colônias (UFC), e repressão de crescimento de diferentes isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* no meio semi-seletivo (MSS) desenvolvido e no meio basal, nutriente sacarose ágar (NSA)

Isolados	UFC/mL ⁻¹		Repressão (%)
	MSS	NSA	
IB 12.292	1,01 x10 ⁹	1,29x10 ⁹	21,7
2	1,01 x10 ⁹	1,20x10 ⁹	15,8
IB 12.431	1,05x10 ⁹	1,01x10 ⁹	0
1	0,833x10 ⁹	0,86x10 ⁹	3,1
155.661	1,01x10 ⁹	1,10x10 ⁹	8,2
IB 12.397	0,600x10 ⁹	1,07x10 ⁹	43,9
IB 12.471	0,765x10 ⁹	0,537x10 ⁹	0
IB 12.473	0,00913x10 ⁹	0,00958x10 ⁹	4,7
IB 12.359	0,00913x10 ⁹	0,00980x10 ⁹	5,8
IB 12.728	0,0102x10 ⁹	0,0105x10 ⁹	2,9

(*) MSS = meio semi-seletivo; NSA = meio de cultura nutriente sacarose ágar.

2.7.8 Capacidade de Xam hidrólisar amido e Tween 80

Observou-se que ocorreu hidrólise de amido por Xam quando houve formação de um halo transparente ao redor da colônia bacteriana (Figura 3). Em todos os isolados testados, formou-se um halo descolorido e transparente mais claro circundando o crescimento bacteriano, indicando que houve hidrólise do amido e produção de amilase pela bactéria. Resultado semelhante foi encontrado por Maringoni (1993) que, ao adicionar amido no meio de cultura semi-seletivo, verificou a formação de halo transparente ao redor das colônias bacterianas; que serviu para auxiliar na diferenciação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Segundo Frare (2006), a incorporação de amido ao meio semi-seletivo também é uma opção quando a seletividade esperada do antibiótico em relação às bactérias não-alvo não é obtida, uma vez que, pela adição de iodo, pode-se distinguir, em placa, os isolados bacterianos amilolíticos dos não-amilolíticos.

Figura 3 – Hidrólise de amido e de Tween 80 por colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em meio semi-seletivo, após incubação por 36 horas à 28°C

A incorporação do corante cristal violeta no meio de cultura NSA não reduziu o crescimento da Xam, possibilitando sua utilização na elaboração do meio de cultura semi-seletivo. A incorporação de 150 µL/mL de solução de cristal violeta (1%) ao meio básico serviu para colorir o meio e, assim, melhorar a visualização da hidrólise do amido pela bactéria. Nesta concentração este corante não reprimiu o crescimento nem causou qualquer outra alteração visível nas colônias de Xam. Este resultado concorda com Ackermann (1977), que relatou ação bactericida do cristal violeta apenas contra bactérias Gram-positivas. Segundo Neder (1992), vários corantes alteram ou até inibem o crescimento de algumas bactérias, em certas concentrações. Oliveira (1995) acrescentou 50 mg/L de cristal violeta ao meio Kado 523 e observou significativa alteração de cor das colônias de *X. vesicatoria*.

A lipólise de Tween 80 foi obtida em todos os isolados de Xam crescidos em meio semi-seletivo comparado com meio NSA, sem adição de Tween 80. A intensidade dessas zonas variou, porém, puderam ser observadas em todas as repetições. Portanto, as reações foram todas positivas, caracterizadas pela formação de halos opacos esbranquiçados ao redor das colônias suspeitas de serem Xam (Figura 3). Outras colônias bacterianas saprófitas, que cresceram nesse meio não apresentaram lipólise de Tween 80. Estes resultados estão de acordo com McGuire; Jones e Sasser (1986) que utilizaram meio de Tween para detectar *X. vesicatoria* em sementes de tomateiro.

2.3.8 Determinação da sensibilidade de detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sub-amostras de algodão sementes de utilizando meio de cultura semi-seletivo

Observou-se que, independente do tamanho da amostra e da centrifugação do líquido de maceração de sementes de algodão infectadas, usando o meio semi-seletivo, foi possível verificar a presença de Xam (Tabela 18). Assim, mesmo com a incidência de apenas 0,1% de sementes com Xam na amostra, o meio semi-seletivo mostrou-se eficiente na sua detecção. Segundo Taylor; Phelps e Dudley (1979), este percentual de infecção nas sementes equivaleria à estimativa de 0,01% de infecção primária no campo. Com esta taxa de transmissão do patógeno para as plântulas, ocorreria uma estimativa de 4% de infecção secundária no campo.

A alta sensibilidade de detecção de isolamento de Xam é uma característica primordial do meio semi-seletivo, uma vez que o nível de tolerância de infecção no lote de sementes de algodão é zero. A detecção de uma semente em 1000, em laboratório, representa uma infecção de 10.000 plântulas emergidas no campo (COCHRAN, 1950; TAYLOR; PHELPS; ROBERTS, 1993), quantidade de plântulas suficientes para ocasionar epidemia de mancha angular na lavoura, uma vez que ocorra condição climática favorável.

As exigências de ambiente favorável para que ocorra mancha angular são as condições ótimas de produção do algodoeiro, ou seja, as mesmas requeridas pela cultura, logo, uma epidemia pode ser evitada ao detectar e não plantar sementes infectadas por Xam.

Este resultado mostrou que o meio semi-seletivo desenvolvido satisfaz o critério de limite de detecção em até 1 semente infectada no conjunto de 1000 sementes, critério importante para o estabelecimento de análise de detecção e identificação de Xam associada a sementes de algodão. Este método mostrou-se bastante eficiente uma vez que permitiu isolar Xam de sementes mesmo quando o lote de sementes apresentou baixo percentual de contaminação. Segundo Moura e Romeiro (1993), muitas variáveis fazem com que existam concentrações maiores ou menores de bactérias diferentes, dentro de um lote e entre lotes de sementes.

Pelo teste de patogenicidade, pôde-se certificar que todas os isolados bacterianos crescidos no meio eram de Xam, pois, com a inoculação destes em plantas saudáveis de algodoeiro (Acala 90), houve manifestação de sintomas de mancha angular. E, quando se inoculou somente água nas plantas de algodão (controle), não houve aparecimento de sintomas de mancha angular (Tabela 18).

Tabela 18 – Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), com e sem centrifugação do líquido previamente macerado de sementes de algodão artificialmente inoculadas e teste de patogenicidade de Xam

Tratamento	Centrifugação		Patogenicidade
	com ^{1/}	sem ^{1/}	
499 sementes mais uma semente infectada	+	+	+
500 sementes sadias (controle)	-	-	-
999 sementes mais uma semente infectada	+	+	+
1000 sementes sadias (controle)	-	-	-

1/ média de cinco repetições; (+)=presença e (-)= ausência de crescimento de colônia típica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em meio de cultura semi-seletivo e (+)=presença e (-)= ausência manifestação de sintomas da doença mancha angular em plantas de algodão.

2.3.9 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* de sementes algodão produzidas em campos que apresentaram sintomas de mancha angular

Os resultados do semeio das suspensões dos macerados de amostras de sementes algodão obtidas de campos com presença de mancha angular, no meio semi-seletivo encontram-se na Tabela 19.

Observou-se que Xam estava presente em 19 das 25 amostras de sementes de algodão avaliadas. Este resultado mostra que o meio semi-seletivo idealizado satisfaz o critério de detecção de Xam em sementes naturalmente contaminadas e que o número de sementes da amostra com 5000 sementes, sub-divididas em sub-amostras de 1000 sementes, permitiu o estabelecimento de isolamento de Xam associada às sementes de algodão. Também, permitiu inferir que a qualidade do resultado do isolamento de Xam de sementes no meio semi-seletivo desenvolvido não é afetado pela ausência de centrifugação do líquido de maceração de sementes.

A não detecção de Xam em seis lotes pode ser atribuída ao fato de que a presença e a concentração de bactérias nas sementes varia com o genótipo da planta mãe, severidade e estágio de desenvolvimento no qual iniciou a infecção na planta mãe, condições ambientais e de manejo no desenvolvimento da planta mãe e das condições e período de armazenamento das sementes (NEERGAARD, 1977).

Tabela 19 – Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em macerados de amostras de sementes de algodão, com e sem centrifugação, por meio do uso de meio de cultura semi-seletivo desenvolvido

Amostras de sementes	Sub-amostras sementes de de algodão									
	A		B		C		D		E	
	C*	S*	C	S	C	S	C	S	C	S
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*C= com centrifugação; S= sem centrifugação; (+)= presença de Xam; (-) = ausência de Xam.

Após 48 h de incubação no meio semi-seletivo, surgiram várias colônias suspeitas de serem Xam (de aspecto mucóide, convexas, elevadas e de coloração amarela e brilhante, bordas lisas). Essas colônias foram isoladas e caracterizadas por vários testes confirmando a identidade das mesmas (Tabela 20). Esses resultados indicam que algumas bactérias patogênicas de sementes podem ser identificadas apenas com base nas características das colônias em meio de cultura semi-seletivo ou seletivo. Vários autores já identificaram bactérias utilizando estes

critérios (SCHAAD, 1982; IRWIN, 1987; POHRONENZY ET AL., 1977; SCHAAD; KENDRICK, 1975; FATMI; SCHAAD, 1987). Estes resultados concordam com aqueles encontrados por Valarini (1990), em que o isolamento direto do macerado de sementes de feijão no meio de cultura EPGA contendo o antibiótico cefalexin e o fungicida clorothalonil impediram, em parte, a proliferação excessiva dos “contaminantes” bacterianos e fúngicos de sementes, dando melhor resultado do que no meio NGA. De acordo com Kruppa (1993), o isolamento de bactérias em meios comuns é possível somente naqueles lotes de sementes que possuem elevados níveis do patógeno ou que apresentam baixa população de microrganismos contaminantes. De modo geral, os isolamentos dependem em grande parte da disponibilidade de bons meios semi-seletivos, além de critérios como: amostras representativas de sementes, número de sementes adequado, limites de detecção, pessoal treinado, controle de qualidade das mensurações, bem como, escolha de bons métodos e padronização de metodologias (DENARDIM; MOURA; MENTEN, 2004).

O método de maceração das sementes em água destilada e esterilizada mostrou-se eficiente em recuperar Xam, uma vez que a bactéria pode estar localizada interna e externamente na semente e uma desinfestação poderia reduzir sua população na amostra. Segundo Leben (1981), bactérias associadas ao tegumento das sementes são facilmente detectáveis no meio, enquanto que as que veiculam internamente carecem de um contato mais íntimo com o meio para que o patógeno alcance o exterior das sementes e entre em contato com o gel. Este procedimento foi realizado em água esterilizada, mas sem nenhuma assepsia adicional nas sementes, pois a localização do patógeno pode ser tanto interna como externamente nas sementes e, uma desinfestação poderia subestimar a presença de Xam na amostra. Thyr (1969) comenta que quando a bactéria não está infectando a semente, mas apenas infestando-a, isso pode ser um fator importante na disseminação no campo. A desinfecção, além de eliminar a microflora contaminante associada às sementes, pode eliminar também a bactéria alvo (SCHAAD; KENDRICK, 1975). Segundo Mariano (2000), a presença de água faz com que haja a multiplicação da bactéria porventura existente na amostra de sementes, mesmo em baixa concentração, possibilitando sua detecção.

O eventual aparecimento de bactérias contaminantes no meio semi-seletivo durante a incubação não atrapalhou a detecção do patógeno alvo, uma vez que estes foram facilmente distinguidos devido à característica auxiliar de identificação que foi a observação da ausência de

lipólise de Tween 80 e do amido ao redor das colônias, bem como a coloração da maioria das colônias “contaminantes” que surgiram sobre o meio, que eram esbranquiçadas.

A prática de centrifugação auxiliou no aumento da sensibilidade de detecção usando o meio semi-seletivo, pois na amostra 16 foi detectada Xam somente quando se realizou a centrifugação do macerado de sementes, indicando que a concentração de células bacterianas estava muito baixa. Porém, esta amostra de sementes foi obtida na safra de 1998/1999, e encontrava-se parcialmente deteriorada, com a presença de galerias provocadas por insetos de armazenamento, o que talvez tenha contribuído para a redução da população de Xam nas sementes. Quando a detecção foi realizada em amostras relativamente mais novas, não ocorreu esta variação, indicando que, em rotina de laboratório de análise de sementes usando este meio semi-seletivo de detecção de Xam, é desnecessário realizar a centrifugação do macerado das sementes.

2.3.10 Caracterização e identificação de isolados bacterianos de sementes de algodão, suspeitos de serem *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

As colônias suspeitas de serem Xam que surgiram no meio semi-seletivo bem como do Isolado F (padrão) de Xam foram submetidas a testes bioquímicos, sorológicos e de patogenicidade para a comprovação de identidade, e os resultados encontram-se na Tabela 20. Conforme Mariano (2000), após a difusão da bactéria em água, ou seja, o preparo do macerado e desenvolvimento das colônias sobre meio de cultura, recomenda-se à realização de testes que comprovem a presença de bactérias na suspensão. Os resultados obtidos comprovaram que todos os isolados suspeitos de serem Xam, obtidos de diferentes amostras de sementes de algodão eram Xam, evidenciando a eficiência do meio semi-seletivo desenvolvido.

O semeio dos diferentes isolados em placas contendo meio YDC, avaliados após a incubação por 48 h, em temperatura ótima, promoveu a formação de colônias características do gênero *Xanthomonas*, ou seja: amarelas, elevadas brilhantes e de bordas regulares. Segundo Schaad et al. (2001) e Romeiro (1995), este é um aspecto característico de quando há produção abundante de material capsular pelo isolado. Este tipo de crescimento é mais fácil de se visualizar em meios contendo carbonato de cálcio, bem como naqueles com altos teores de açúcares.

As colônias suspeitas de serem Xam, que cresceram no meio semi-seletivo, obtidas das diferentes amostras de sementes de algodão, foram distinguidas das demais colônias por

apresentarem coloração amarela, rodeadas por uma forte zona esbranquiçada, devido à lipólise do Tween 80 e halo translúcido devido à hidrólise do amido e, também, devido ao meio basal oferecer sacarose, o que favorecem a formação da cápsula nas células bacterianas. De acordo com Schaad (1982), a desvantagem de utilizar um meio menos rico, como o nutriente ágar, consiste na dificuldade de distinguir as colônias de *Xanthomonas* spp. de outras que produzem o pigmento amarelo xanthomonadina.

Pelo teste de hidrólise de esculina, pôde-se observar que todos os isolados provocaram escurecimento do meio de cultura após sete dias de incubação. Estes dados estão de acordo com Romeiro (1995) que relata a reação positiva para reação de hidrólise de esculina para algumas espécies de *Xanthomonas* spp.. A esculina é um açúcar de cadeia complexa e fluorescente sob luz UV. Bactérias que possuem sistema enzimático capaz de hidrolisá-la, provocam a formação de esculentina que, ao reagir com íons ferro, dá origem a um complexo de cor escura, não fluorescente (LELLIOT; STEAD, 1987). Nas observações ao microscópio de todos os esfregaços bacterianos dos isolados, pode-se verificar que eram de formato de bastonetes retos indicou se tratarem de bactérias Gram-negativas.

Conforme observado na Tabela 20, houve produção de catalase por todos os isolados testados, pois quando se adicionou água oxigenada sobre o esfregaço de isolado bacteriano sobre lâminas de vidro, em presença de oxigênio livre, ocorreu a formação e desprendimento de bolhas gasosas, indicando a decomposição do peróxido de hidrogênio. Isto pode ser explicado devido a muitas bactérias, inclusive as do gênero *Xanthomonas*, serem produtoras da catalase que é uma enzima capaz de decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), com formação de água e oxigênio molecular. Esta é uma excelente característica de auxílio na classificação de bactérias (NEDER, 1992).

Não foi evidenciada a presença de nitrito no meio nitrado empregado bem como nenhum dos isolados de Xam cresceu quando incubado em meio nutriente líquido (NL) a 40°C. Cia (1972) encontraram resultados semelhantes, em que se evidenciou resultado negativo no teste de redução de nitrato a nitrito para Xam. Normalmente, as bactérias do gênero *Xanthomonas* não reduzem nitrato a nitrito e, também, não crescem em altas temperaturas como a 40°C (SCHAAD et al., 2001).

Todos os isolados testados hidrolisaram a gelatina, pois, após a incubação e colocação por 30-60 minutos em geladeira, o meio de cultura não solidificou, indicando que houve hidrólise

da gelatina. Bactérias proteolíticas são capazes de decompor ou hidrolisar a gelatina, fazendo-a perder suas características geleificantes. Esta característica é conferida àquelas bactérias que têm a capacidade de elaboração de uma enzima extracelular com propriedade de hidrolisar a gelatina em gelatinase (NEDER, 1992).

Normalmente, a espécie *axonopodis* não hidrolisa gelatina (SCHAAD et al. 2001). Porém, para o caso em particular da patovar *malvacearum*, neste ensaio ocorreu, houve hidrólise da gelatina, conforme se pôde observar na Tabela 20. Esta característica também já foi observada por Cia (1972), que relatou que patovar *malvacearum* liquefaz gelatina. Esta característica pode ser muito útil para fins de rotina de laboratório, em termos de distinção de patovar de isolados bacterianos obtidos de sementes.

Não se obteve reação sobre leite (Tabela 20), ou seja, verificou-se que não houve digestão da caseína, pois, usando o indicador bromocresol púrpura, não se visualizou o clareamento do meio de cultura. No entanto, pôde-se observar mudança de cor do meio e alguns isolados, evidenciando produção de ácido ou de base. Os dados obtidos estão de acordo com os encontrados por Cia (1972), que evidenciou a falta de ação de Xam sobre o leite.

Todas as folhas de algodoeiro inoculadas pelo método de injeção com a suspensão bacteriana de Xam e mantidas em casa de vegetação apresentaram sintomas típicos de mancha angular, após 10 dias. Este resultado está de acordo com Zadoná et al. (2005) em 10 dias após inocular Xam em plantas de algodão da cultivar BRS Ita 90 verificou reação de suscetibilidade a mancha angular em todas as plantas inoculadas. A presença da bactéria nas lesões foi confirmada pelo teste de exudação em gota e observação ao microscópio ótico e ou estereoscópio. A metodologia de inoculação de Xam utilizada foi fundamentada na teoria de Klement (1963), em que a Xam penetra mais no tecido vegetal por meio de aberturas naturais do que por ferimentos, confirmada por Mahmood e Hussain (1993) que, utilizando a técnica de inoculação por infiltração por injeção de suspensão bacteriana, obtiveram melhores resultados do que pela inoculação por riscas, fricção ou por pulverização.

Os resultados obtidos, referentes às reações sorológicas de imunofluorescência indireta, encontram-se na Tabela 20.

Ao microscópio óptico de fluorescência foram examinados os esfregaços de células bacterianas tratados com anticorpos policlonais. Observou-se reação de fluorescência para todos os isolados obtidos. Os isolados bacterianos extraídos de sementes e, o Isolado F de Xam

reagiram com o antissoro. Entretanto, não foi observadas reação com água na testemunha. Estes resultados estão de acordo com Coleno (1968), em que afirma que as técnicas sorológicas de imunofluorescência utilizam o princípio do reconhecimento específico antígeno-anticorpo, ou seja, essa reação é visualizada graças a um anticorpo acoplado a uma molécula fluorescente. Naqueles alvéolos em que foi usado água ou soro normal não houve fluorescência, indicando que os anticorpos ligados a antimunoglobulina foram lavados durante o processo de preparo da amostra.

Tabela 20 – Características morfológicas, fisiológicas/bioquímicas, sorológicas e patogênicas de 19 isolados suspeitos de serem *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* provenientes de sementes de algodão naturalmente infectadas/contaminadas

Testes	Isolados de Xam de amostras de sementes de algodão																								
	IBSBF 1733	1	2	3	4	5	10	11	12	14	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25					
Redução de nitrato a N ₂ ^{1/}	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
Crescimento em YDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
Proteólise do leite ^{2/}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
Hidrólise da gelatina ^{3/}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
Hidrólise de amido ^{4/}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
Hidrólise de esculina ^{5/}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
Crescimento a 40°C ^{6/}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
Catalase ^{7/}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
Patogenicidade ^{9/}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
Gram ^{10/}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
Hidrólise de Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
KOH ^{11/}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
Imunoinfluorescência ^{12/}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					

*(+) = reação positiva; (-) = reação negativa. Média de cinco repetições, sendo cada repetição um isolado da mesma amostra de sementes.

Foram observadas células fluorescentes ao microscópio quando o soro foi colocado em contato com o antígeno, indicativo de que houve reconhecimento do antígeno pelo anticorpo. A sorologia é largamente utilizada para confirmação da presença de bactérias fitopatogênicas (BARZIC; TRIGALET, 1982). A detecção de células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi obtida em amostras de sementes de feijão contendo uma semente infectada em 10.000 (0,01%) usando imunofluorescência direta (MALIN; ROTH; BELDEN, 1983) e, excelentes resultados de detecção foram conseguidos para *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* usando imunofluorescência direta (FRANKENA; VAN VUURDE, 1990).

Neste trabalho, todos os isolados bacterianos obtidos de sementes de algodão foram identificados como Xam, visto pelas características culturais e bioquímicas no meio semi-seletivo bem como nos outros testes morfológicos, fisiológicos bioquímicos, patogênicos e sorológicos realizados.

3 CONCLUSÕES

- 1) *X. axonopodis* pv *malvacearum* apresenta ampla variação quanto à sensibilidade a antibióticos e a fungicidas.
- 2) O meio de cultura desenvolvido é constituído de: 3,0 g de extrato de carne; 5,0 g de peptona; 15,0 g de ágar; 1000 mL de água destilada; 0,25 g de CaCl₂; 10,0 g de amido solúvel; 10,0 mL de Tween 80; 150 µL de solução de cristal violeta (solução 1%); 50 mg de cefalexina; 10 mg de tiofanato metílico; 10 mg de clorothalonil, foi semi-seletivo e eficaz no isolamento e detecção de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro naturalmente infectadas.
- 3) O plaqueamento direto em meio de cultura semi-seletivo da suspensão de maceração das sementes de algodoeiro sem centrifugação foi eficaz para isolamento de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* em amostras de sementes naturalmente infectadas, podendo ser indicado para a detecção desta bactéria em análises de rotina de sanidade de sementes desta cultura.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, B. **Laboratory manual: microbiology**. Columbus: Ohio State University, 1977. 130 p.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 7. ed. São Paulo: Org. Andrei, 2005. 1141 p.

Anônimo. Zone diameter interpretative standart and equivalent minimum concentration (MIC) breakpoints for organisms other than *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, and *Streptococcus* spp. **NCCLS**, New York, v. 17, n.p., 1997.

APPLENTON, A. Teste de suscetibilidade a antibióticos: guia para melhor prática. **Microbiologia Clínica**, Porto Alegre: Less & Háes, 2004. v. 25. 147 p.

ARAI, K.; SAKODA, T.; NISHI, Y, IWAI, H. The medium for isolation of *Pseudomonas syringae* pv *theae*, the pattogen of bacterial shoot blight of tea plants. **Japan Journal Phytopathology**, Tockio, v.68, p. 141-147, 2002.

BAILEY, W.R.; SCOTT, C.G. **Diagnostic microbiology**. Saint Louis: C.V. Mosby, 1974. 414 p.

BAKER, F.J. **Manual de técnica bacteriológica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1970. 510 p.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Cinical Pathology**, Philadelphia, v.45, p. 493-496, 1966.

Bioanalyse Ltd. **Zone diameter interpretative standarts**. Ankara. s./p., s./d.

BIRD, L.S.; BRINKERHOFF, L.A.; DAVIS, R.G. Bacterial blighth. In: WATKINS, F.M. (Ed.) **Compedium of cotton diseases**. St. Paul: APS, 1981. p. 25-28.

BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Aberystwyth: CAB International, 1986. 332 p.

BRINKERHOFF, L.A. Variability for pathogenicity of *Xanthomonas malvacearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 49, p. 534-539, 1959.

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

CAFATI, L.R.; SAETTLER, A. W. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* in seed of resistant and susceptible *Phaseolus* genotypes. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, p. 638-640, 1980.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. **Diagnose e controle de doenças do algodão**. Cuiabá: UFMT, 2000a. 55 p.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO A.Q. **Doenças do algodoeiro**: diagnose e controle. Cuiabá: UFMT, 2000b. 47 p.

CASSETARI NETO, D.; MESQUITA NETO, D.R.; SANTOS, E.N. Avaliação de genótipos de algodão quanto a reação as principais doenças no Mato Grosso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3, 2001, Campo Grande. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2001. p. 528-533.

CHITARRA, L.G. **Fluorescence techniques to detect and to assess viability of plant pathogenic bacteria**. 2001.101p. Agrotechnology and Food Sciences – Wageningen University, Wageningen, 2001.

CIA, E.; ARAÚJO, A.E. **Doenças do algodoeiro**. In: Fundação MT/EMBRAPA. Mato Grosso: liderança e competitividade. Rondonópolis, 1999. p. 100-112. (Boletim, 3).

CIA, E.; FUZATTO, M.G. Manejo de doenças na cultura do algodão . In: CIA, E.; FREIRE, E.C.; SANTOS, W.J. (Ed.). **Cultura do algodoeiro**. Piracicaba: Patafos, 1999. p. 121-132.

CIA, E.; FUZATTO, M.G. Doenças do algodoeiro no Brasil. IN: CONGRESSO INTERNACIONAL DO AGRONEGÓCIO DO ALGODÃO, 2000. Cuiabá. IN: **Anais...** EMBRAPA-CNPA, 2000. p. 175-187.

CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p. 33-48.

CLAFLIN, L.E.; RAIMUNDO, B.A. Evaluation of the dot-immunobinding assay for detecting phytopathogenic bacteria in wheat seeds. **Journal of Seed Technology**, Lincoln, v. 11, p. 52-61, 1987.

CLAFILIN, L.E.; VIDAVER, A.K.; SASSER, M. The MXP a selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 730-734, 1987.

COCHRAN, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the most probable number. **Biometrics**, Washington, v. 6, p. 105-116, 1950.

COLENO, A. Utilization de la technique d'immunofluorescence pour le dépistage de *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh) Dawsoun dans les lots de semences de haricot contaminés. **Academic Agricultural**, Paris, v. 18, p. 1016-1020, 1968.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 fev. 2006.

CROSS, J.E. Pathogenicity differences in Tanganyika populations of *Xanthomonas malvacearum*. **Cotton Growing Review**, London, v. 40, p. 125-130, 1963.

DENARDIM, N.D.; MOURA, A.B.; MENTEN, J.O.M. Detecção e identificação de bactérias em sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, João Pessoa, In: **Anais... SNA**, 2004. p. 62-67.

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

DIATLOFF, A. WONG, W.C., WOOD, B. A. Non destructive methods of detecting *Curtobacterium flaccumfacies* pv *faccumfaciens* in mungbean seeds. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 269-273, 1993.

DO BRASIL, E.L. **Antibiograma: teoria e prática**. São Paulo: EDUSP, 1977. 51 p.

EDDIN, K. S.; MARIMUTHU, T.; LADHALAKSHMI, D.; RABINDRAN, R.; VELAZHAHAN, R. A simple inoculation technique for evaluation of cotton genotypes for resistance to bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Journal of Plant Disease and Protection**, Washington, n. 4, p. 321-328, july, 2005.

FAHY, P.C.; PERSLEY, G.J., (Ed.) **Plants bacterial diseases – a diagnostic guide**. Sidney: Academic Press, 1983. 393 p.

FRANKENA, A.A.; VAN VUURDE, J.W.L. Problems and new approaches in the use of serology seedborne bacteria. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 18, p. 415-426, 1990.

FRARE, V.C. **Desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melão (*Cucumis melo* L.)**. 2006. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

FREIRE, E.C.; FARIAS, F.J.C.; AGUIAR, P.H. Perdas estimadas da produção de algodão devido à pragas e doenças no Centro-Oeste. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2. 1999, Ribeirão Preto. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1999. p.1-3.

FREIRE, E.C.; FARIAS, F.J.C.; AGUIAR, P.H.; ARAÚJO, A.E. Comportamento de novas cultivares e linhagens com relação a doenças no Centro-Oeste safra 1998/99. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 2., 1999, Ribeirão Preto. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1999. p.1-3.

GITAITIS, R.D.; CHANG, C.J.; SIJAM, K.; DOWLER, C.C. A differential medium for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and other cellulolytic xanthomonads from various natural sources. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, p. 1274-1278, 1991.

GONDIM, D.M.C.; BELOT, J.L.; MICHEL, B. **Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Estado do Paraná**. 2. ed., Cascavel: COODETEC/CIRAD-CA, 1996. 104 p. (Boletim Técnico, 31).

GONDIM, D.M.C.; BELOT, J.L.; SILVIE, P. **Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil**. 3 ed., Cascavel: COODETEC/CIRAD-CA, 1999. 120 p. (Boletim Técnico, 33).

GRAHAM, J.H. Overwintering of three bacterial pathogens of soybeans. **Phytopathology**, St. Paul, v. 43, p. 189-92, 1953.

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

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. (Ed.). **Bergey`s manual of determinative bacteriology**. 9thed.. Maryland: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

IAMAMOTO, M.M. **Doenças foliares do algodoeiro e seu controle**. Atualidades Agrícolas, BASF, 2004. p.18-21.

IRWIN, J.A. Recent advances in the detection of seedborne pathogens. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 15, p. 755-763,1987.

JULIATTI, F.C.; RUANO, O. Algodão (*Gossypium hirsutum* L.): controle de doenças causadas por fungos e bactérias. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, M.L., (Ed.). **Controle de Doenças de Plantas: Grandes Culturas**. Viçosa: UFV/MAA, 1997. v. 2, p.155-570.

JULIATTI, F.C.; POLIZEL, A.C. **Manejo Integrado de Doenças na Cotonicultura Brasileira**. Uberlândia: EDUFU, 2003. 142p.

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

KLEMENT, Z. Rapid detection of the pathogenicity of phytopatogenic *Pseudomonas*. **Nature**, London, v. 199, p. 299-300, 1963.

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

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey`s manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London: Williams & Wilkins, 1984. v.1, 660 p.

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

LACAZ, C.S. (Ed.) **Antibióticos.** São Paulo:EDUSP, 1975. 509 p.

LEBEN, C. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* with cucumber seed. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ontario, p. 247-249, 1981.

LELLIOTT, R.A.; STEAD, D.E. **Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants.** Oxford: Blackwell Scientific, 1987. 216 p.

LOZANO, J.C.; SEQUEIRA, L. Bacterial blight of cassava in Colômbia: I. Etiological, Epidemiological and Control. **Phytopathology**, St. Paul, v. 64, n.1, p. 153-160, 1974.

MAHMOOD, T.; HUSSAIN, T. Comparison of inoculating methods of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton cultivars. **Sarhad Journal of Agricultural**, Stockholm, v. 9, n. 1, p.1-4, 1993.

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 seed. **Plant Disease**, Sant Paul, v. 67, p. 645-647, 1983.

MARIANO, R.L.R.(Ed.). **Manual de práticas em fitobacteriologia.** Recife: UFRP. 2000. 171p.

MARINGONI, A.C. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye em sementes de feijoeiro e conseqüências epidemiológicas.** 1993. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

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

MCGUIRE, R.G.; JONES, J. B.; SASSER, M. Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. **Plant Disease**, Sant Paul, v.70, p.887-889, 1986.

MENTEN, J.O.M.; LIMA, L.C.S.F.; FRARE, V.C.; RABALHO, A. A. Evolução dos produtos fitossanitários para tratamento de sementes no Brasil. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Sementes: Qualidade Fitossanitária**. Viçosa: UFV/DPF, 2005. cap. 12, p. 333-374.

METHA, Y.R.; BOLOGNINI, V. Meio semi-seletivo para a detecção da presença de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 36., 2003, Uberlândia. **Resumos...** Uberlândia: CBF, 2003. p. 222-223.

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

MORESCO, E.; YUYAMA, M.M.; CAMARGO, T.V.; METHA, Y.R., (Ed.). **Manual de identificação e manejo das doenças do algodoeiro**. Cuiabá: FACUAL, 2001. 167p.

MOURA, A.B.; ROMEIRO, R. S. Desenvolvimento de um meio semi seletivo para *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.2, p.209-214, 1993.

MUIRHEAD, K.A.; HORAN, P.K.; POSTE, G. Flow cytometry. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 3, p. 337-356, 1985.

NASCIMENTO, A. R.P.; SILVA, Z.E.; SILVA, V.A.V. Sensibilidade “*in vitro*” de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* a bactericidas e fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, Suplemento, p. 326-327, 2000.

NEDER, R.N. **Microbiologia**: manual de laboratório. São Paulo: Ed. Nobel, 1992. 138 p.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. London: Mc Millan Press, 1977. 839 p.

NEUMANN, R.I. (Ed.). **Anuário brasileiro do algodão**. Cuiabá: Grupo Gazeta de Comunicação, Fundação MT, 2001. 145 p.

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

PADILHA, G.; COSTA, S.O.P. Genética Bacteriana. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. (Ed.). **Microbiologia**, Editora Ateneu: São Paulo: 3 ed.. 2002. p.55-68.

PEREIRA, J.L.A.; OLIVEIRA, J.R.; SILVA, M.R. Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ao cobre. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, Suplemento, p. 328, 2000.

RANDHAWA, P.S.; SCHAAD, P. Selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, p. 268-272, 1983.

RODRIGUES NETO, J. Detecção e identificação de fitobactérias em sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 3., 1988. Lavras. **Anais...** Fundação Cargill, 1988. p.123-139.

ROMEIRO, R. S. **Fundamentos em bacteriologia de plantas.** Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1988. 50 p.

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

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

ROMEIRO, R. S.; MOURA, A. B.; OLIVEIRA, J.R.; SILVA, H.S.A.; BARBOSA, L.S.; SOARES, F.M.P.; PERES, F. Evidences of constitutive multiple resistance to antibiotics in some plant pathogenic bacteria. **Summa Phytopatologica**. Botucatu, v. 24, n.34, p.220-225, 1998.

RUDOLPH, K.; ROY, M.A.; SASSER, M.; STEAD, D.E.; DAVIS, M.; SWINGS, J.; GOSSELE, F. Isolation of bacteria. In: KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. (Ed.). **Methods in phyto bacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. p. 43-94.

RYU, E. On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. **Journal of the Japanese Society for Veterinary Science**, Tokyo, v.17, p.31, 1938.

SAETTLER, A.W. Seedling injection as aid in identifying bean blight bacteria. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 55, n. 8, p. 703-706, 1971.

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

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

SCHAAD, N.W. Bacteria: inoculum thresholds of seedborne pathogens. **Phytopathology**, Saint. Paul, v.78, p. 872-875, 1988.

SCHAAD, N.W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. **Plant pathogenic bacteria**. 3rd ed., Saint Paul, American Phytopathological Society, 2001. 373 p.

SCHAAD, N.W.; KENDRICK, R.A. Qualitative method of detecting *Xanthomonas campestris* in crucifere seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, p. 1034-1036, 1975.

SCHAAD, N.W.; DONALDSON, R.C. Comparison of two methods for detection of in infected crucifer seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.8, p.383-392, 1980.

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

SHEPPARD, J.W.; ROTH, D.A.; SAETTLER, A.W. Detection of *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* in bean. In: SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A., (Ed.). **Detection of bacteria in seed other planting material**. St. Paul: APS Press, 1989. cap. 4, p.17-29.

SHERWOOD, M.B.; FALCO, E.A.; BEER, E. D. A rapid quantitative method for the determination of penicillin. **Science**, New York, v.99, p.247-248, 1944.

SIQUERI, F.V. Controle químico da mancha angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro. In: **Mato Grosso Liderança e competitividade**. Rondonópolis: Fundação MT/EMBRAPA; 2005. p. 100-112 (Boletim, 3).

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

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

SOUZA, P.E. **Sensibilidade de *Xanthomonas manihotis* a antibióticos e avaliação da resistência de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) à bacteriose**. 1979. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1979.

SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas*. 5thed., London: Chapman & Hall, Boundary Row, 1993. 399 p.

TAKATSU, A. Método de dessecação para a preservação de *Xanthomonas manihotis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, p.130, 1978.

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

TAYLOR, J.D.; PHELPS, K.; ROBERTS, S.J. Most probable number (mpn) method: origin and application. In: PROCEEDINGS OF THE FIRST ISTAPLANT DISEASE COMMITTEE SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING. 1., 1993. Ottawa, CA: Agriculture Canada Central Seed Laboratory, 1993, p.106-114.

TAYLOR; J.D.;PHELPS, K.; DUDLEY,C.L. Epidemiology and strategy for the control of halo-blight of beans. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 93, p. 167-172, 1979.

THYR, B.D. Additional sources of resistance to bacterial canker of tomato (*Coynebacterium michiganense*) **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 53, p. 234-237, 1969.

TRABULSI, L.R.; MIMICA, L.M.J.; MIMICA, I. Genética Bacteriana. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. (Ed.). **Microbiologia**, 3 ed. São Paulo: Editora Ateneu, 2002. p.55-68.

TUITE, J. **Plant pathological methods**: fungi and bacteria. Minneapolis: Burgess, 1969. 239 p.

VALARINI, P.J. **Método quantitativo para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye, 1978, em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*)**. 1990. 166p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

VALARINI, P.J. Métodos para a detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 179-186, 1995.

VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas**, v. 2. Viçosa: UFV, 1997. 415 p.

ZACHOWSKI, M. A.; RUDOLPH, K. Characterization of isolates of bacterial blight of cotton (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*) from Nicaragua. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 123, p. 344-352, 1988.

ZACHOWSKI, A. EBRAHIM-NESBAT, F.; RUDOLPH, K. Effect of continuous darkness on susceptible cotton cotyledons. In: KLEMENT, Z. (Ed.). **Plant Pathogenic Bacteria**. Budapest: Akadémiai Kiado, 1989. p.173-178.

ZANDONÁ, C.; METHA, Y.R.; SCHUSTER, I.; ALVES, P.F.R.; BOMFETI, C.A.; VIVANCO, K.R.P.; SILVA, R.B.; LOPES L.P. Mecanismo genético da resistência com três cultivares de algodoeiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 30, n. 6, p. 647-649, nov.-dez. 2005.