

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**DESENVOLVIMENTO DE MEIO SEMI-SELETIVO
PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv.
Malvacearum EM SEMENTES DE ALGODOEIRO**

JUCENARA SOARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, março de 2006

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**DESENVOLVIMENTO DE MEIO SEMI-SELETIVO
PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv.
Malvacearum EM SEMENTES DE ALGODOEIRO**

**JUCENARA SOARES
Bióloga**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Norimar D'Ávila Denardin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, março de 2006

**Para vocês, meus queridos e amados pais,
Wilmar e Sueli.**

DEDICO

***“O papel dos infinitamente pequenos
é infinitamente grande.”***

Louis Pasteur

BIOGRAFIA DA AUTORA

JUCENARA SOARES, filha de Wilmar e Sueli Maria Soares, nasceu em 29 de fevereiro de 1976, porém registrada em 01 de março de 1976, em Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul.

Em março de 1993, ingressou na Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas/Ecologia, obtendo o título de Bióloga em janeiro de 1998. E em março de 1999, iniciou o Curso de Pós-graduação em nível de Especialização em Microbiologia, concluindo em agosto de 2000. Durante este período, a partir de 1993, trabalhou na Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, no setor da Central Analítica com ensaios de rotina laboratoriais nas áreas de microbiologia de alimentos e águas e ensaios fitopatológicos, realizando vários estágios e cursos na área técnica e gerencial, permanecendo na Central Analítica até fevereiro de 2002.

Em março de 2002, ingressou no quadro funcional da Universidade de Passo Fundo – UPF no setor do Centro de Pesquisa em Alimentação – Cepa, como assistente e gerente técnica substituta do Laboratório de Microbiologia. No ano de 2003, nesta mesma instituição e continuando suas atividades no Laboratório de Microbiologia do Cepa, ingressou no Curso de Pós-graduação em Agronomia em nível de Mestrado, na área de concentração em Fitopatologia e concluindo o curso em março de 2006.

AGRADECIMENTOS

Ao “papai do céu” pela oportunidade de estar aqui, por me proteger, dar força e coragem de seguir em frente realizando as atividades que me competem durante este caminho.

A meus pais, Wilmar e Sueli, a minha irmã Jocelene e ao meu companheiro Jairon, que sempre estiveram do meu lado, em todos os momentos, em todas as dificuldades com seu amor, dedicação, apoio, compreensão e incentivo constante. Amo vocês.

A Professora, Dr^a Norimar D’Ávila Denardin, orientadora, pelo incentivo, sugestões e auxílio, sempre que necessário, e, sobretudo pelo carinho e amizade demonstrada.

A Usina de deslincamento de sementes de algodão, Itaquerê Ltda, Primavera do Leste – Mato Grosso e a Fundação Mato Grosso – Rondonópolis pelo envio de sementes de algodão para execução da pesquisa.

As colegas de trabalho, Aidir e Graciela, do Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Alimentação/Cepa, da UPF, pelo convívio diário, amizade e compreensão; a Coordenação geral, Prof^a Msc. Maria Teresa Friderich pela oportunidade de aprimoramento profissional. Enfim, aos colegas, estagiários e bolsistas de trabalho atualmente e, aos que passaram ao longo deste período pelo laboratório, minha amizade e carinho.

Aos estagiários do Laboratório de Fitobacteriologia da FAMV Ana Cristina, Ana Rúbia, Rafael, Letícia e Márcia pela colaboração e auxílio prestado. A Cheila C. Sbalcheiro colega de dia-a-dia, “noite-a-noite”, finais de semanas e feriados no laboratório,

cada uma trabalhando em seu experimento, e a Andréia I. Tumelero pela nossa agradável convivência no cotidiano e pela nossa amizade.

Aos companheiros do Rotaract Club Passo Fundo Norte, pela receptividade, amizade, demonstração de afeto, alegria e carinho nos meus primeiros meses de moradia em Passo Fundo e nos dias atuais.

Aos queridos amigos de Santa Cruz do Sul, toda falta e saudade e, muita alegria nos reencontros. “Amigos sempre serão amigos”.

As amigas e colegas de curso, Rocheli, Paloma, Francine, Daniela, Ariane, Roseana, Marivani, Tanaka e Kalibia pelos momentos de alegria e descontração. Em especial, a grande e eterna amiga e companheira Vanessa Tedesco, por todos os momentos maravilhosos e difíceis que passamos juntas. Também, em especial ao amigo Eliézer Machado pela passagem em minha vida e, com sua demonstração de afeto e carinho homenageou-me com a letra da música “Sétimo céu”.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 O Algodoeiro.....	20
2.2 Descrição botânica.....	21
2.3 Importância da cultura.....	21
2.4 Clima, solo e cultivo.....	22
2.5 Doenças do algodoeiro.....	23
2.6 Etiologia e classificação do gênero <i>Xanthomonas</i> ...	27
2.7 Detecção de bactérias em sementes.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Local.....	30
3.2 Origem e cultivo do isolado de referência.....	30
3.3 Atividades desenvolvidas.....	30
3.4 Teste de sensibilidade aos antibióticos e aos fungicidas.....	34
3.5 Elaboração de meio semi-seletivo para o cultivo de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	35
3.6 Extração de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> pela incubação das sementes de algodão.....	37
3.7 Preservação dos isolados.....	38
3.8 Confirmação da identidade dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	51
APÊNDICE.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Meio de cultura Ágar Levine-EMB semeado com o isolado, IB 1153.....	41
2	Meio de cultura Ágar BPLS semeado com o isolado, IB 1153.....	41
3	Meio de cultura Ágar Citrato semeado com o isolado, IB 1153.....	41
4	Meio de cultura Ágar SIM semeado com o isolado, IB 1153.....	41
5	Meio de cultura Ágar MYP semeado com o isolado, IB 1153.....	41
6	Meio de cultura Ágar TSI (esquerda) e Ágar LIA (direita) semeado com o isolado, IB 1153....	41
7	Meio de cultura Ágar GYCA semeado com o isolado, IB 1153.....	41
8	Meio de cultura Ágar FS semeado com o isolado, IB 1153.....	41
9	Meio de cultura recomendado para o desenvolvimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> meio 523 (esquerda) e meio semi-seletivo SYA (direita).....	46
10	Meio de cultura recomendado para o desenvolvimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> , Almeida & Berian (esquerda) e meio semi-seletivo SYA (direita).....	46
11	Meio de cultura recomendado para o desenvolvimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> , XCS (esquerda) e meio semi-	

	seletivo SYA (direita).....	46
12	Meio de cultura recomendado para o desenvolvimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> , PTSA (esquerda) e meio semi-seletivo SYA (direita).....	46
13	Divisão da placa em quadrantes com suas respectivas estrias.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Importância potencial de doenças em alguns estados produtores de algodão, no ano de 2000...	24
2	Classificação de doenças por grau de prejuízo....	25
3	Classificação de doenças por grau de importância.....	25
4	Meios de cultura comumente utilizados em rotinas laboratoriais de microbiologia e os recomendados para o desenvolvimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	31
5	Composição básica dos meios de cultura, juntamente com os antibióticos e fungicidas preparados para o cultivo de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	36
6	Descrição morfológica das colônias de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> nos diferentes meios de cultura utilizados.....	40
7	Diferentes carboidratos utilizados por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> para seu crescimento.....	42
8	Diferentes concentrações de antibióticos empregados para o desenvolvimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	43
9	Diferentes concentrações de fungicidas empregados para o desenvolvimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	43
10	Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> nos meio de cultura	

	recomendados (1 ao 4) e os elaborados (Meio 1 ao Meio 4), usando o isolado IB 1153.....	47
11	Cálculo do Índice de Crescimento Absoluto (ICA).....	48
12	Cálculo do Índice de Crescimento Relativo (ICR).....	49

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

JUCENARA SOARES¹, NORIMAR D'ÁVILA DENARDIN²

RESUMO – *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (*Xam*) é uma bactéria que causa importantes prejuízos ao sistema produtivo do algodão, causando a doença conhecida por mancha angular. Essa bactéria pode sobreviver no solo, em restos culturais e nas sementes, sua principal via de disseminação. Objetivando sua detecção, buscou-se desenvolver um meio semi-seletivo para uso em rotina laboratorial de patologia de sementes. Com o intuito de se desenvolver um meio semi-seletivo para *Xam* foram estudadas as exigências nutricionais empregando-se diferentes fontes de carboidratos, bem como a utilização de antibióticos e fungicidas, os quais foram testados sozinhos ou em combinação e em diferentes concentrações. Os testes permitiram a seleção de substâncias antimicrobianas como ampicilina, cefalexina, e ciclohexamida. A idealização de um meio semi-seletivo foi embasada em tentativas de preparo, o qual ficou constituído por compostos simples e de fácil elaboração. A composição final do meio semi-seletivo ficou composta de 10g/L de sacarose, 10g/L de amido solúvel, 10g/L de extrato de levedura, 5g/L de cloreto de sódio, 15g/L de ágar-ágar, suplementado com 10mg de ampicilina, 30mg de cefalexina e 100mg de ciclohexamida. O meio de cultura permitiu a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* de forma

relativamente rápida e segura, podendo ser utilizada com confiabilidade em teste de rotina.

Palavras-chave: mancha angular, meio de cultura, algodão, patologia de sementes.

¹ Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da Universidade de Passo Fundo (UPF), área de concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dr^a, Professora do PPGAgro/FAMV/UPF.

**DEVELOPMENT SEMI-SELECTIVE MEDIUM A
DETECTION OF THE *Xanthomonas axonopodis* pv.
malvacearum IN COTTON SEED**

JUCENARA SOARES¹, NORIMAR D'ÁVILA DENARDIN²

ABSTRACT – *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (*Xam*) is a bacterium that causes important damages to the productive system of the cotton, is one of the most important diseases, causal agent of angular leaf spot. That bacterium can survive in soil, plantation rest and seeds, considered to be an important transmission vehicle of dissemination. For its detection, was developed a semi-selective medium for use in laboratorial routine of seed pathology. With intention the nutrition exigent study, carboidrat, antibiotics and fungicides in different concentrations were tested alone or in combination with others. From these tests, was allowed the selection of the antibacterial substance ampicilina, cefalexina, and ciclohexamide. Attempts of thinking a was elected semi selective medium the to found, in its final composition of simple compost and basic prepare. The composed of semi selective medium of 10g/L sucrose, 10g/L starch, 10g/L yeast extract, 5g/L sodium clorite, 15g/L agar-agar, whit suplement 10mg ampicilina, 30mg cefalexina and 100mg ciclohexamide. The semi selective medium detected a *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* of relative insurance and rapid, used in routines test.

Key words: angular leaf spot, medium culture, cotton, seed pathology.

¹ Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da Universidade de Passo Fundo (UPF), área de concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dr^a, Professora do PPGAgro/FAMV/UPF.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L) merece destaque no cenário agrícola mundial. É cultivada na Ásia, África, Austrália e América. Atualmente, essa espécie contribui com 90% da produção mundial de algodão, e seu cultivo apresenta grande importância social e econômica (FREIRE et al., 2000).

O Brasil ocupa o sexto lugar em volume de produção e de consumo (GONDIM et al., 1996), sendo responsável pela quase totalidade do abastecimento da indústria têxtil (NEUMANN, 2001).

A cotonicultura está sujeita a um grande número de doenças causadas por bactérias, fungos, vírus e nematóides (AZEVEDO & SIQUEIRA, 1998; AMORIM et al., 1997;), entre estes, ressalta-se a mancha angular, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) (HUNTER & BRINKERHOFF, 1964).

A mancha angular do algodoeiro afeta toda a parte aérea da planta, onde comumente ocorrem sintomas como a exudação da bactéria em forma de cristais, coloração cremosa, que pode ser observada em manchas no pecíolo (GALLI, 1980). Este tipo de exudação é responsável pela sua disseminação em outras áreas, por intermédio de uma planta a outra, através de respingos de água e pelo trânsito de máquinas agrícolas. Contudo, as sementes ainda são a principal fonte de disseminação. Desta forma, esta bacteriose vem provocando perdas na quantidade e qualidade da produção (CASSETARI NETO & MACHADO, 2000; BAKER, 1970).

O controle de fitobactérias é difícil, onerando os custos de produção e causando problemas ao ambiente. Portanto, as melhores medidas para o controle são as de caráter preventivo (AGRIOS, 1997).

Presente na semente, *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, pode permanecer viável por mais de quatro anos, sem que o inóculo interno seja eliminado pelo deslincamento ácido, e sua transmissão pode chegar a 4% (CIA & SALGADO, 1997). Conforme Romeiro (2000), as sementes, o solo e os restos culturais apresentam fontes de disseminação, sendo estas o principal veículo de propagação de fitobacterias.

Para evitar a ocorrência de diversas enfermidades no campo, deve-se adotar o uso de sementes comprovadamente sadias, ou com níveis de contaminação dentro dos padrões aceitáveis (FREIRE et al., 1999). Assim, a produção, a avaliação e o subsequente plantio de sementes livres do patógeno são medidas importantes para o controle de diversas doenças (SCHAAD et al., 2001; ROMEIRO & NET, 2001; SAETTLER et al., 1995).

Para a obtenção de sementes sadias é necessário erradicar os patógenos a elas associados. Existe a necessidade de testes que possibilitem detectar bactérias em sementes a nível laboratorial, o que evitaria o plantio de sementes de qualidade sanitária duvidosa, evitando futuras perdas de produção (TOGNI et al., 2005; REIS et al., 2001; KOBAYASHI & VIEIRA, 2000; AGRIOS, 1997).

No presente trabalho, buscou-se desenvolver um meio semi-seletivo para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Algodoeiro

Estudos confirmam que o algodoeiro já era conhecido há 4.000 anos A.C., é uma das principais plantas domesticadas pelo homem e uma das mais antigas. Tecidos de algodão foram encontrados na Índia 3.000 anos A.C. (AGRIDATA, 2002; MEIRELLES, 2001).

A Índia é tida como centro de origem do algodoeiro embora exista outros registros (múmias incas eram envolvidas em algodão). Constatou-se, também, o cultivo dessa planta pelos indígenas (que transformavam o algodão em fios e tecidos) na época do descobrimento do Brasil (AGRIDATA, 2002; MEIRELLES, 2001).

O algodoeiro está sendo cultivado comercialmente em mais de 65 países, em uma área anual superior a 30 milhões de hectares. Essa cultura representa mundialmente mais de 40% da vestidura da humanidade, no Brasil representa mais de 60% dos insumos têxteis. Por sua grande resistência à seca o algodoeiro constitui-se em uma das opções para cultivo em regiões semi-áridas, podendo fixar o homem ao campo, gerar emprego e renda no meio rural e urbano (PAIVA et al., 2001). É, portanto, atividade de grande importância social e econômica.

Os maiores estados produtores são Mato Grosso, Goiás, São Paulo, Paraná e Minas Gerais (CASSETARI NETO & MACHADO, 2000).

2.2 Descrição Botânica

O algodoeiro pertence ao grupo de plantas dicotiledoneas, família Malvaceae e tem como nome científico, *Gossypium hirsutum* L. Atualmente são cultivados no mundo dois tipos diferentes de algodão: o arbóreo e o herbáceo. O algodão arbóreo é aquele que parece uma árvore mediana, de cultivo permanente. Já a espécie herbácea (*Gossypium hirsutum* L.r. latifolium Hutch) é um arbusto de cultivo anual, uma entre as 50 espécies já classificadas e descritas do gênero *Gossypium* (CASSETARI NETO & MACHADO, 2000).

2.3 Importância da cultura

Do algodoeiro quase tudo é aproveitado, principalmente o caroço, que representa em torno de 65% do peso da produção, e a fibra, representando 35% do peso da produção (WATKINS, 1981). Os restos de cultura como caule, folhas, maçãs, capulhos são utilizados na alimentação de animais em geral (SOAVE & MORAES, 1987).

O caroço (semente) é rico em óleo e contém 20-25% de proteína bruta. O óleo extraído da semente é refinado e destinado à alimentação humana e a fabricação de margarina e sabões (SOAVE & MORAES, 1987).

O bagaço (farelo ou torta), subproduto da extração do óleo, é destinado a alimentação animal (bovinos, aves, suínos) devido ao seu alto valor protéico (40-45% de proteína bruta) (SOAVE & MORAES, 1987).

A fibra, principal produto do algodoeiro, tem mais de 400 aplicações industriais, entre as quais a confecção de fios para tecelagem (tecidos variados), algodão hidrófilo para enfermagem,

confecção de feltro de cobertores, de estofamentos, obtenção de celulose, entre outros (SOAVE & MORAES, 1987).

2.4 Clima, solo e cultivo do algodoeiro

Fatores climáticos como chuva, temperatura, umidade relativa, duração do dia, velocidade do vento e intensidade de luz, interferem na cultura do algodoeiro sendo que o plantio deve ser feito no período mais propício ao início do cultivo, de acordo com os fatores climáticos menos desfavoráveis. A temperatura é um dos fatores que mais interfere no crescimento e desenvolvimento da planta (FREIRE et al., 1999).

A cultura do algodoeiro requer solos profundos e de média a alta fertilidade. Quanto à textura, o algodoeiro se desenvolve satisfatoriamente em solos a partir dos arenosos até os argilosos, desde que existam condições de equilíbrio entre nutrientes, umidade e aeração. Os arenosos, com algumas exceções, geralmente são pobres em nutrientes e de baixo poder de retenção de água, o que pode ser melhorado com a adição de matéria orgânica. Os muito argilosos, apesar de ricos em nutrientes, podem prejudicar o desenvolvimento das plantas, por falta de oxigenação; no entanto, há solos argilosos bem estruturados, que permitem boa circulação de ar. Isto significa que o algodoeiro pode ser cultivado em solos de textura variável, porém bem estruturada, com boa drenagem, fertilidade de média a alta, profunda e relevo plano a ondulado (FREIRE et al., 2000).

A época de plantio do algodão deve ser programada de forma que a colheita ocorra no período seco, evitando-se o comprometimento da qualidade da fibra colhida. A época de plantio

varia de acordo com a região. Esta tarefa é a mais importante, que requer cuidados do qual depende todo o processo produtivo, compreende a época de semeadura, espaçamento adequado, consórcio com outras culturas (se for o caso) adubação e semeadura (FREIRE et al., 1999).

2.5 Doenças do algodoeiro

Existem várias doenças do algodoeiro que provocam perdas apreciáveis no rendimento de algodão (NEERGAARD, 1979; AGARWAL & SINCLAIR, 1987). Verifica-se que existem muitos patógenos importantes e limitantes à cultura, entre estes, há mais de 250 agentes, os quais 90% são fungos, 16 vírus, 2 micoplasmas, 10 nematóides e uma bactéria (CIA & SALGADO, 1997; GOTO, 1990; WILLIAMS et al., 1994).

Algumas doenças são cosmopolitas, como a mancha angular e outras específicas para determinadas regiões algodoeiras. A importância das principais doenças depende do ano agrícola e das diferenças regionais encontradas nos estados produtores de algodão no Brasil (Tabela 1).

Dessa forma, verifica-se que o melhoramento genético do algodoeiro deve contemplar a resistência múltipla a mais de seis patógenos. Destacam-se os patógenos, os quais limitam o rendimento do algodoeiro, *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (ramulose), *Fusarium oxysporum* f. sp. *Nasinfestum* (murcha de fusarium), *Verticillium dahliae* (murcha de Verticillium), *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (mancha angular), *Meloidogyne* spp. e *Rotylenchulus reniformis* (nematóides) (CIA &

ARAÚJO, 1999; CIA & FUZATTO, 1999; CIA & SALGADO, 1997).

Tabela 1 – Importância potencial de doenças em alguns estados produtores de algodão, no ano de 2000.

Doenças	Estados Produtores				
	PR	SP	MG/GO	MT	MS
Murcha de <i>Fusarium</i>	4	5	3	1	2
Nematóides	4	5	4	2	2
Mancha-angular	4	3	3	4	3
Ramulose	3	3	4	5	4
Outras manchas de folhas	4	3	4	5	4
Mosaico das nervuras	3	3	4	5	5
Podridão de maçãs	2	2	3	4	4
Murchamento avermelhado	3	3	3	3	3

Fonte: Ceres Agronômica, FACUAL, 2001

Legenda 1: sem importância; 2: pequena importância; 3: medianamente importante, necessitando precauções e estudos; 4: importante, demandando medidas de controle e 5: muito importante, inviabilizando a cultura se não houver controle.

Atualmente, com a expansão das áreas de produção, tem-se observado aumento de doenças até então consideradas secundárias como a mancha de ramulária, mancha de alternaria/stemphylium, cercospora e um complexo de fungos responsáveis por podridões de maçãs. Além disso, outras doenças reconhecidamente importantes, como a ramulose, por exemplo, ampliaram sua abrangência geográfica e seu nível de severidade. Em face deste panorama, nos últimos anos várias estratégias de controle tiveram que ser revistas, culminando no emprego do manejo integrado dessas doenças (CIA & ARAÚJO, 1999; CIA & FUZATTO, 1999; CIA & SALGADO, 1997).

A cada safra muitas pesquisas buscam solucionar as causas de doenças do algodoeiro, mas são os tratos culturais e o ambiente que exercem um papel decisivo na incidência dessas

doenças (CIA & ARAÚJO, 1999; CIA & FUZATTO, 1999; CIA & SALGADO, 1997).

As doenças do algodoeiro podem ser classificadas quanto ao grau de prejuízo direto (Tabela 2), tendo a mancha angular classificação 2, e para o grau de importância (Tabela 3) pelo potencial de dano que essa doença poderá provocar, a mancha angular recebe classificação 4, em relação as demais doenças citadas.

Tabela 2 – Classificação de doenças por grau de prejuízo direto.

Escala	Doença
1	Complexo de podridão de maçãs
2	Mancha-angular – bacteriose
3	Doenças de plântulas
4	Ramulária (fungo)
5	Ramulose (fungo)
6	Doença azul (virose)

Fonte: Ceres Agronômica, FACUAL, 2001

Tabela 3 – Classificação de doenças por grau de importância.

Escala	Doença
1	Doença azul (virose)
2	Ramulose (fungo)
3	Ramulária (fungo)
4	Mancha-angular – bacteriose
5	Complexo de podridão de maçãs
6	Doenças de plântulas
7	Complexo de manchas foliares

Fonte: Ceres Agronômica, FACUAL, 2001.

A mancha angular incitada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, pode sobreviver no solo por até 11 anos, nas sementes e nos restos culturais por um período de até quatro anos e ser transmitida da semente para a planta (CIA & SALGADO, 1997). É uma bactéria muito resistente a dessecação, calor seco e radiação solar. A severidade da doença é favorecida por precipitações

freqüentes e contínuas por período de 3-4 dias, seguidas por temperaturas altas durante o dia ($>30\text{ }^{\circ}\text{C}$) e relativamente baixas durante a noite ($\pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$). A bactéria é disseminada de uma planta a outra através de respingos de água (MOURA et al., 2005; FACUAL, 2001; VAUTERIN et al.; 1995; VALARINI & MENTEN, 1992).

Os sintomas são de lesões angulosas, inicialmente de coloração verde e aspecto oleoso, evolui para parda a necrosada (CIA, 2001). Comumente ocorre também coalescência das lesões e rasgadura do limbo foliar. Sintomas também aparecem nas hastes das plantas, lesões escuras que podem provocar a quebra das hastes (“black arm”); morte dos ponteiros, provocando rebrota, lesões no pecíolo das folhas, nas bráqueas e pedúnculos das maçãs. (NEERGAAED, 1979). As lesões angulosas ocorrem também ao longo das nervuras principais das folhas (CIA & SALGADO, 1997). Nas maçãs pode-se encontrar no início mancha arredondada ou irregular, de cor parda e deprimida (CIA & FUZATTO, 1999).

A mancha angular é controlada pelo uso de sementes saudáveis e resistência varietal. Como controle curativo pode-se usar rotação de cultura, adubação, espaçamento, aração, gradagem, controle químico com pulverizações de fungicidas cúpricos e/ou de antibióticos. Isso, porém, resulta em alto custo de produção (TOGNI et al., 2005; REIS et al., 2001; KOBAYASHI & VIEIRA, 2000; AMORIM et al., 1997; MENTEN et al., 1996).

Potencialmente, todos os organismos fitopatogênicos podem ser transportados pelas sementes (MOURA et al., 2005; VAUTERIN et al., 1995; VALARINI & MENTEN, 1992) e sabe-se que, no Brasil, diversas doenças foram introduzidas por meio de

sementes que carregavam interna ou externamente os organismos patogênicos (TOGNI et al., 2005; KOBAYASHI & VIEIRA, 2000).

2.6 Etiologia e classificação do gênero *Xanthomonas*

De acordo com Krieg & Holt, (1994), no manual de Bergey, em sua 9ª edição, o gênero *Xanthomonas* (do grego “xanthos” = amarelo; “monas” = unidade), são visíveis ao microscópio ótico, onde apresentam morfologia de bastonetes retos, isolados, medindo 0,4-0,7 x 0,7-1,8 µm, e são móveis por meio de um flagelo polar.

As espécies de *Xanthomonas*, quando em culturas puras, apresentam colônias geralmente amarelas, lisas, mucóides e com um pigmento amarelo, insolúvel, denominado de xantomonadina (BRADBURY, 1986; BRADBURY, 1984).

As características fisiológicas e bioquímicas para descrever *Xanthomonas axonopodis* são a coloração de Gram-negativa, crescimento aeróbico, oxidase negativa, catalase positiva, ausência de crescimento a 40°C, não redutoras de nitrito, teste positivo para hidrólise do amido e esculina e, negativo para hidrólise da gelatina, temperatura máxima para crescimento pode variar entre 35-37°C e a tolerância ao crescimento em NaCl é de 1% (MAC FADDIN, 2000; KRIEG & HOLT, 1994).

2.7 Detecção de bactérias em sementes

O estabelecimento de métodos de detecção de bactérias em sementes, em análise de rotina é de extrema importância para assegurar a eficiência dos programas de quarentena e de certificação de sementes (NEERGAARD, 1979).

Freqüentemente encontram-se sementes infestadas/ infectadas por bactérias. Sinais e lesões na semente, sintomas ou sinais na planta, nem sempre são identificados por inspeção visual, isso demanda a associação de técnicas para sua identificação (MOURA et al., 2005; MARIANO & SILVEIRA, 2005; DEZORDI et al., 2005; DEZORDI et al., 2004; DENARDIN, 2004; DENARDIN, 2002).

Existem atualmente várias técnicas disponíveis para detectar patógenos em sementes. A escolha para o estabelecimento de procedimentos de análise de rotina deve basear-se, principalmente, na sensibilidade, na especificidade, na reprodutibilidade e na precisão, bem como, na eficiência, nos custos, na flexibilidade e o retorno (MARIANO & SILVEIRA, 2005; DEZORDI et al., 2005; MOURA et al., 2005; DENARDIN, 2004; DENARDIN, 2002).

Métodos de quantificação de bactérias utilizando diversos meios seletivos têm sido desenvolvidos e utilizados para testes de rotina (MOURA et al., 2005). Sua seletividade usualmente é conseguida utilizando-se fontes de carbono, antibióticos, outros inibidores do crescimento de microrganismos saprofíticos, e estes meios seletivos ou semi-seletivos não devem restringir ou inibir o desenvolvimento do patógeno alvo (MEHTA et al., 2005; MARIANO & SILVEIRA, 2005; DEZORDI et al., 2005; DENARDIN, 2004; MEHTA & BOLOGNINI, 2003; DENARDIN, 2002).

A detecção de fitobactérias em sementes pode ser realizada por uma ampla gama de técnicas, incluindo o plantio em ambiente controlado e substrato esterilizado, o uso de meios seletivos e semi-seletivos, a inoculação de plantas hospedeiras, o uso de bacteriófagos, a sorologia e as sondas de DNA. Tornando-se

necessário combinar dois ou mais métodos para facilitar a detecção e a identificação do patógeno (CHITARRA, 2001; ROMEIRO, 2001; SCHAAD et al., 2001; SAETTLER et al., 1995).

As técnicas de detecção experimentam grandes variações quanto a sensibilidade, especificidade e complexidade em relação a semente/bactéria testada. Não existe, portanto, um método padronizado e que atenda a diferentes necessidades. A escolha do método depende de vários fatores, basicamente, será necessário adaptá-lo para cada sistema biológico em estudo (SCHAAD et al., 2001; ROMEIRO, 2001; SAETTLER et al., 1995).

Schaad et al. (2001), cita que, de modo geral, três itens importantes devem ser considerados quando do desenvolvimento de metodologias para testes de sanidade de sementes: 1) extração ou detecção da bactéria; 2) identificação da espécie; e 3) determinação de sensibilidade e níveis de tolerância. Desta forma, ter-se-iam informações quanto a presença de organismos patogênicos na semente. Assim, a produção, a análise e o subsequente plantio de sementes livres de patógenos são medidas significativas para o controle de diversas doenças de plantas.

O estabelecimento de um método reproduzível e confiável para a detecção de patógenos em análises de rotina é de extrema importância em um programa de certificação de sementes

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Fitobacteriologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – RS.

3.2 Origem e Cultivo do isolado de referência

Como padrão de referência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (*Xam*) utilizou-se a estirpe IB1153, a qual foi obtida junto ao Instituto Biológico de Campinas, Campinas – São Paulo. Esse isolado foi empregado como padrão comparativo, em relação as características culturais do gênero e da espécie como: cor, forma, bordo/margem, elevação/ascensão, brilho da colônia, bem como as características fisiológicas e bioquímicas para comprovação.

O meio de cultura empregado, como padrão comparativo, utilizado para repicagem e preparo de inóculo, foi o meio 523 Kado & Heskett (1970), em estado sólido e/ou líquido. Este meio de cultura é composto de Sacarose 10g, Caseína ácida hidrolisada 8g, Extrato de levedura 4g, K₂HPO₄ (anidro) 2g, MgSO₄.7H₂O 0,3g, Agar 15g e Água destilada 1000 ml.

3.3 Atividades desenvolvidas

Foram realizadas comparações entre diferentes meios de cultura, comumente utilizados em rotinas laboratoriais de microbiologia geral e meios de cultura recomendados em literatura para o desenvolvimento de *Xam*. Estes meios de cultura com seus

componentes básicos, como carboidratos, corantes, antibióticos e fungicidas, estão discriminados na Tabela 4.

Tabela 4 – Meios de culturas comumente utilizados em rotinas laboratoriais de microbiologia e os recomendados para o desenvolvimento de *Xam*.

Meios-ágar	Carboidratos/aa	Corantes/antibióticos/ fungicidas
Almeida & Berian *	Dextrose/Sacarose	Ciclohexamida 100mg
Bile Esculina	-	-
BPLS	Lactose/Dextrose/Sacarose	Vermelho de fenol/Verde brilhante
BSA	Dextrose/Sacarose	-
Columbia-base	-	-
Citrato	Citrato de sódio	Azul de bromotimol
Levine – BEM	Lactose	Eosina amarela /Azul de metileno
Fenilalanina	DL-fenilalanina	-
FS	Amido solúvel	Methyl green/Ciclohexamida Cefalexina/Gentamicina
Gelatina	-	-
GYCA	Dextrose/Sacarose	-
GPA	Glicose	Púrpura de bromocresol (1,5%)
LIA (ágar lisina ferro)	L-lisina/ Glicose	Púrpura de bromocresol (1,5%)
Ágar MacConkey	Sorbitol	Vermelho neutro/Cristal violeta
Meio 523 (Padrão)	Dextrose/Sacarose	-
Meio 523	Trealose	-
Meio 523	Dextrose/Sacarose	Tetrazólio
Meio 523	Trealose	Tetrazólio
Meio 523	Dextrose/Sacarose	Vermelho de fenol
Meio 523	Trealose	Vermelho de fenol
Meio 523	Dextrose/Sacarose	Testar antibióticos
Meio 523	Trealose	Testar antibióticos
MYP	D-manitol	Vermelho de fenol /gema de ovo 50%/ polimixina B 0,1%
MLCB	Manitol/L-lisina cloridrato	Verde brilhante/Cristal violeta
NSCAA	Amido solúvel	Ciclohexamida /Vancomicina
NM (Nigrosine-Stewart´s)	Glicerol	Nigrosina /Nistatin
Nutriente	-	-
Nutriente modificado	Dextrose/Sacarose/Amido	Sulfato de estreptomioicina/chlorothalonil/ benomyl
PCA	Glicose	-
PTSA *	-	-
SIM	-	-
SPA c/ tetrazólio	Dextrose/Sacarose	Tetrazólio (solução a 1%)
SPA s/ tetrazólio	Dextrose/Sacarose	-
SX	Amido	Metil violeta/Verde de metila
Tirosina	-	Solução tirosina a 5%
TSA	-	-
TSI	Lactose/Dextrose/D+glicose	Vermelho de fenol
Uréia	D+glicose	Vermelho de fenol
XCP1	Amido	Cristal violeta/Cephalexin 5-Fluorouracil/Tobramycin Cycloheximide
XCS *	Lactose/D (+) trealose	Tobramicina 80mg, Ampicilina 20mg, Vancomicina 10mg, Ciclohexamida 100mg
YM	Manitol	-
YG	Glicerol	Vermelho congo

*: meios de cultura recomendados para o desenvolvimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (*Xam*).

Para avaliar o desenvolvimento de *Xam* em diferentes carboidratos, foram preparadas soluções estéreis nas concentrações a 10%. Utilizando placas descartáveis de ELISA, cada poço recebeu o meio base adicionado de azul de bromotimol e o carboidrato em estudo. Com o auxílio de palitos de madeira estéreis foi semeado o isolado de referência IB 1153, cultura pura em 48 horas. Foram realizadas 5 repetições para cada carboidrato em estudo. Em seguida, as placas de ELISA foram incubadas em estufa bacteriológica por 24/48h a 28 °C. Após este período foi realizada a leitura e interpretação dos resultados.

Foram comparados os seguintes carboidratos: açúcar cristal (como sacarose), sendo o amido solúvel, a arabinose, a celobiose, a dextrose, a frutose, a galactose, o glicerol, a glucose, a lactose, a maltose, o manitol, a mannose, a sacarose, o sorbitol, a trehalose e a xilose, substâncias P.A. da marca Merck e Synth.

A sensibilidade de *Xam* foi avaliada utilizando os seguintes antibióticos, ampicilina (Cilion – ARISTON), cefalexina (Keflex – LILLY), cloranfenicol (ALLERGAN), eritromicina (LUPER), estreptomicina (Purex – INLAB), gentamicina (ALLERGAN), kanamycina (GIBCO), kazugamicina (NUCLEAR), neomicina (Purex – INLAB), novobiocina (Purex – INLAB), tetraciclina (BRISTL-MYERS SQUIBB), tobramicina (LILLY – ABL) e vancomicina (EUROFARMA) nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mg/mL, tendo como testemunha o nível zero de antibiótico.

As diluições dos antibióticos foram realizadas com diferentes substâncias, em função de suas necessidades, ou seja,

cloranfenicol diluído em etanol a 90%; ampicilina, eritromicina, estreptomicina, kanamicina, neomicina, novobiocina, tetraciclina e vancomicina diluídos em água; tobramicina e cefalexina usados comercialmente; kazugamicina utilizou-se comercialmente cloridrato de kazugamicina a 20g/L;

As soluções estoque de antibióticos foram esterilizadas por filtração em seringa descartável acoplada a um filtro com membrana de 0,22 μ m (Millipore) e colocados em frascos estéreis escuros e mantidos em refrigeração por sete dias.

A sensibilidade de *Xam* frente ao uso de fungicidas, foi comparada usando o Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (VETEC) e Ciclohexamida (SIGMA), nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg/mL, tendo como testemunha o nível zero de fungicida.

As diluições dos fungicidas também foram realizadas de acordo com suas necessidades, o sulfato de cobre foi diluído em água destilada estéril e o ciclohexamida diluído em etanol a 70%.

As soluções estoque de fungicidas foram preparadas com água destilada estéril e depois esterilizadas por filtração em seringa descartável acoplada a um filtro com membrana de 0,22 μ m (Millipore) e colocados em frascos estéreis, de cor escura, e mantidos em refrigeração por sete dias.

3.4 Teste de sensibilidade aos antibióticos e fungicidas

A realização dos testes de sensibilidade foram efetuados utilizando-se o meio 523 Kado & Heskett (1970) em estado sólido e líquido.

Para o teste de sensibilidade em meio sólido, manteve-se o meio em banho-maria a ± 41 °C para que permanecesse no estado líquido até o momento de ser adicionado o antibiótico e o fungicida e assim, obter a concentração desejada do ingrediente ativo no meio de cultura. Os meios foram vertidos em placas de Petri esterilizadas e identificadas e, após solidificar, permaneceram em estufa bacteriológica por 24h. Foram realizadas três repetições tanto para o teste com os antibióticos como para os testes com os fungicidas, mais a testemunha.

O semeio do isolado de referência, previamente preparado, nas placas de Petri com antibiótico e fungicida em diferentes concentrações foi concomitante. Utilizou-se o método de estrias para obtenção de colônias isoladas, após o semeio, as placas foram levadas à estufa bacteriológica a 28 °C por 78h. O crescimento de colônias isoladas foi considerado como sensibilidade aos produtos e, considerado teste positivo.

Para o teste de sensibilidade em meio líquido, frascos de erlenmeyers contendo 25mL de meio, receberam volume de antibiótico e fungicida para obter a concentração desejada do ingrediente ativo.

Em cada erlenmeyer preparado na concentração desejada, foi pipetado 0,5 mL de uma suspensão pura de *Xam*, previamente

cultivada em 24h, mantida em tipo “shaker” e com agitação orbital constante a temperatura de 28 °C.

Foram realizadas três repetições e a testemunha com meio 523, sem antibiótico e branco sem bactéria. Estes frascos de erlenmeyers foram incubados em estufa tipo “shaker” e com agitação orbital constante a temperatura de 28 °C por 48h.

A sensibilidade da bactéria aos produtos nas concentrações foi determinada a partir do turvamento do caldo (crescimento bacteriano positivo), sendo posteriormente efetuado o semeio em placas com meio 523, para confirmação do crescimento bacteriano. Quando não ocorreu turvamento do caldo, este foi especificado como crescimento bacteriano negativo.

3.5 Elaboração de meio semi-seletivo para detecção de *Xam*

Para elaboração do meio semi-seletivo foram realizadas várias combinações com os dados obtidos. Os antibióticos e o fungicida, selecionados neste estudo, fizeram parte da composição dos meios em confecção.

O meio 523 foi usado como padrão comparativo e denominado de Meio 1.

O meio padrão utilizado, meio 523, foi adicionado de amido solúvel, suplementado com os antibióticos e o fungicida, e nomeado de Meio 2.

O terceiro meio (Meio 3) foi o PTSA (VAN VUURDE, 1999), entretanto, foi retirada de sua composição original a tirosina e, adicionado os antibióticos e o fungicida.

O quarto meio (Meio 4) foi confeccionado a base de sacarose, extrato de levedura, amido solúvel e cloreto de sódio, na tentativa de com esses compostos, pudessem suprir as necessidades de fatores de crescimento e sais minerais. A este meio preparado também foi suplementado de antibióticos e o fungicida.

Essa série de meios de cultivo tem sua composição especificada na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição básica dos meios de cultura, juntamente com os antibióticos e fungicida preparados para o cultivo de *Xam*.

Preparações	Meio de cultura	Composição	Antibióticos e o fungicida
Meio 1	Meio 523	MgSO ₄ .7H ₂ O K ₂ HPO ₄ Extrato de levedura Caseína ácida hidrolisada Dextrose Ágar	Ampicilina Cefalexina Ciclohexamide
Meio 2	Meio 523	MgSO ₄ .7H ₂ O K ₂ HPO ₄ Extrato de levedura Caseína ácida hidrolisada Dextrose Amido solúvel Ágar	Ampicilina Cefalexina Ciclohexamide
Meio 3	PTSA	Peptona Amido solúvel NaCl Ágar	Ampicilina Cefalexina Ciclohexamide
Meio 4	-	Extrato de levedura Amido solúvel Sacarose NaCl Ágar	Ampicilina Cefalexina Ciclohexamide

3.6 Extração de *Xam* em sementes de algodão

A extração de *Xam* em sementes de algodão seguiu a técnica de incubação destas sementes por aproximadamente 18h e depois realizada centrifugação.

Foram pesadas três sub amostras de 87g de sementes de cada amostra de algodão sem línter, equivalente a mil sementes, em erlenmeyers esterilizados. Em seguida, foi realizada a desinfestação superficial das sementes. Esta desinfestação consistiu em:

- a) Adicionar álcool 70% as sementes, por cinco minutos;
- b) Adicionar hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos;
- c) Lavar as sementes com água destilada estéril por cinco vezes; Este procedimento foi realizado para cada amostra.

Após foi adicionado, a cada repetição, 200mL de solução salina estéril. Estas amostras foram incubadas por aproximadamente 18h a 4 °C em estufa incubadora “shaker”, com agitação orbital a 120rpm (AGOSTINI, 2004).

O líquido presente nas amostras foi colocado em tubos esterilizados, apropriados para centrifuga e realizada a centrifugação a 3000G em centrifuga modelo ALC PK 131R, por 30 min a 4 °C. O líquido do sobrenadante presente nos tubos foi dispensado, e o sedimento precipitado no fundo do tubo, foi ressuspendido adicionando-se 5 mL de solução salina esterilizada, formando uma suspensão. A qual foi considerada como a suspensão inicial (10^0).

Em câmara de fluxo laminar, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) da suspensão inicial. Realizou-se a semeadura em superfície, de uma alíquota de 0,2 mL da suspensão inicial (10^0) e de cada uma das diluições, nos meios de cultura

recomendados em literatura para o desenvolvimento de *Xam* e os desenvolvidos neste estudo.

Este inóculo foi depositado no centro da superfície do ágar, evitando tocar a ponta da pipeta no meio, mantendo-a, entretanto o mais próximo possível. O inóculo foi espalhado com alça de Drigalsky por toda a superfície do ágar até absorção completa do inóculo. Os meios foram incubados com as placas invertidas, em estufa bacteriológica a 28 °C, por um período de 48 a 72 horas. Após este período foram realizadas observações e registros para verificação do crescimento de *Xam* nos diferentes meios de cultura.

3.7 Preservação dos isolados

Os isolados em estudo foram preservados em tubos de ensaio com rosca contendo meio 523 de Kado, como forma de garantir a manutenção de sua viabilidade no decorrer dos trabalhos. Todos os isolados foram mantidos por repicagens periódicas, com intervalos de dois meses, em meio 523 de Kado, em estado sólido e inclinado. Estes foram armazenados a temperatura de 4 °C na bacterioteca no Laboratório de Fitobacteriologia. Os isolados também foram preservados em Gx + PVP e mantidos a 4 °C e em temperatura ambiente.

3.8 Confirmação da identidade dos isolados de *Xam*

Os isolados oriundos das sementes foram submetidos aos testes bioquímicos, de patogenicidade, de HR e através do BIOLOG® (Biolog System), conforme protocolo estabelecido pelo fabricante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se os resultados do semeio (Figura 1 a 8), do isolado de referência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (*Xam*), IB 1153, em diferentes meios de cultura (Tabela 4), a cerca de sua morfologia, estão descritas na Tabela 6. Sua morfologia foi, sempre, como esperada, normal, no sentido em que se observaram, uma totalidade de 100% para colônias de forma circular, elevação convexa, margem inteira e lisa, opacidade e presença de odor.

A coloração da colônia apresentou variação, onde prevaleceu a cor incolor, creme, rósea, azulada, esverdeada e vermelha, e esta ficava caracterizada pela presença de componentes como, corante, antibiótico ou do carboidrato presente na composição do meio de cultura. As observações foram analisadas após crescimento das colônias (48-72h) em estufa bacteriológica a 28 °C.

Quando analisados a composição dos meios de culturas empregados, observa-se que a incorporação de corantes alterou significativamente a coloração das colônias, possivelmente ocorrendo sua absorção. Isto causou uma interferência significativa com o marcador biológico, que é a cor amarela típica da maioria das espécies. Todavia, isto restringiu a utilização de corantes juntamente ao meio semi-seletivo que se idealiza.

Tabela 6 – Descrição morfológica das colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, IB 1153, nos diferentes meios de cultura utilizados.

Meios – Agar	Forma	Elevação	Margem	Cor	Opacidade	Odor
Almeida & Berian*	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
Bile Esculina	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
BPLS	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Vermelha	Opaca	Presente
BSA	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Creme	Opaca	Presente
Columbia	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarelo	Opaca	Presente
Citrato	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Verde	Opaca	Presente
Levine – BEM	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Vermelho	Opaca	Presente
Fenilalanina	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Incolor	Opaca	Presente
FS	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Incolor	Opaca	Presente
Gelatina	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Creme	Opaca	Presente
GYCA	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
GPA	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Rosa	Opaca	Presente
MacConkey	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
523+trealose	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
523+tetrazólio	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Vermelho	Opaca	Presente
523+verm. Fenol	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Vermelho	Opaca	Presente
523+sacarose	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarelo	Opaca	Presente
523+dextrose	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarelo	Opaca	Presente
Milk Tween	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
MYP c/ gema ovo	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela queimada	Opaca	Presente
NSCAA	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
NM	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
NM	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Preta	Opaca	Presente
Nutriente	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
Nutriente modif.	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
PCA	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
PTSA *	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
PTSA s/ tirosina	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
PTSA modif.	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Rósea	Opaca	Presente
Meio SX	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Rósea	Opaca	Presente
SPA s/ tetrazólio	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Creme	Opaca	Presente
Tirosina	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Creme	Opaca	Presente
TSA	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Incolor c/ centro ferrugem	Opaca	Presente
Uréia	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
XCP1	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Verde	Opaca	Presente
XCS *	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
YM	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
YG	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
MYP s/ gema ovo	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
MLCB	Circular	Convexa	Inteira-lisa	Amarela	Opaca	Presente
LIA	Pouco crescimento					
SIM	Pouco crescimento					
TSI	Pouco crescimento					

*: meios de cultura recomendados para o desenvolvimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (*Xam*).

Fig.1

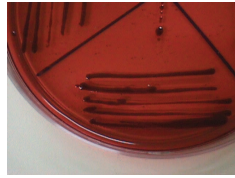


Fig. 2

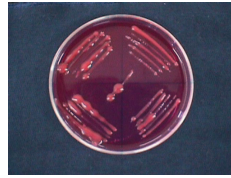


Fig.3

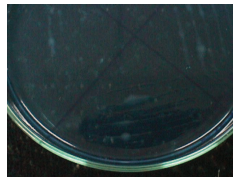


Fig.4

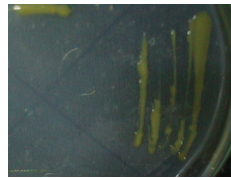


Fig.5



Fig. 6

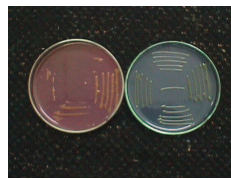


Fig. 7



Fig. 8



Fotos by Soares (2005). Fotos com os meios de cultura utilizados em microbiologia geral, semeados com o isolado, IB 1153. Fig. 1: Ágar Levine-EMB. Fig. 2: Ágar BPLS. Fig. 3: Ágar Citrato. Fig. 4: Ágar SIM. Fig. 5: Ágar MYP. Fig. 6: Ágar TSI (esquerda) e Ágar LIA (direita). Fig. 7: Ágar GYCA. Fig. 8: Ágar FS.

As informações sobre a utilização de carboidratos por *Xam* encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Diferentes carboidratos utilizados por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Malvacearum*, isolado IB 1153 para seu crescimento.

Carboidrato	<i>Xam</i>
Açúcar cristal	+
Amido solúvel	+
Arabinose	-
Celobiose	+
Dextrose	+
Frutose	- ¹
Galactose	-
Glicerol/glicerina	+
Glucose	+
Lactose	- ¹
Maltose	+
Manitol	+
Mannose	+
Sacarose	+
Sorbitol	+
Trehalose	+
Xilose	-

Legenda: +: com crescimento / -: não houve crescimento

-¹: pouco crescimento

A Tabela 8 apresenta os diferentes antibióticos e suas concentrações e a Tabela 9, apresenta os fungicidas e suas respectivas concentrações.

Conforme as Tabelas 8 e 9, em quase todas as séries de antibióticos e fungicidas testados, no meio 523, em estado sólido, ocorreu um crescimento muito reduzido, o que demonstra que os mesmos são sensíveis à concentração empregada.

Tabela 8 – Diferentes concentrações de antibióticos empregados para o desenvolvimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, isolado de referência IB 1153.

Antibióticos	Concentrações (mg/L)									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Ampicilina	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefalexina	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estreptomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kanamicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazugamicina	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-
Neomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Novobiocina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tobramicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Resistente (R); Sensível (-); * = crescimento de fungos;

Tabela 9 – Diferentes concentrações de fungicidas empregados para o desenvolvimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*, isolado de referência IB 1153.

Fungicida	Concentrações (mg/L)							
	10	25	50	100	150	200	250	300
Sulfato de cobre	R	-	-	-	-	-	-	-
Ciclohexamide	R	R	R	R	-	-	-	-

Legenda: Resistente (R); Sensível (-);

Quando os antibióticos e fungicidas foram testados individualmente ao meio 523 de Kado, nas concentrações selecionadas, não houve resistência e sensibilidade ao crescimento do isolado de referência, IB 1153. Para os antibióticos ampicilina nas concentrações de 10 e 20mg e cefalexina nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 verificou-se resistência.

Esse isolado ainda apresentou resistência para sulfato de cobre (10mg/L) e a ciclohexamide, sendo que para este o valor máximo foi de 100mg/L. Com estes inibidores bacterianos e fúngicos

foi realizado as diferentes combinações e concentrações, até se obter uma dosagem de substâncias que não interferisse no desenvolvimento do isolado IB 1153 de *Xam*.

Com a incorporação conjunta dos antibióticos, ampicilina a 10mg e de cefalexina a 50mg, ao meio 523, verificou-se 100% de inibição do crescimento de *Xam*. A redução da concentração de cefalexina e o aumento de ampicilina foram gradativamente até chegar em uma concentração onde ambas juntas não inibissem o crescimento de *Xam*.

A concentração de ampicilina variou de 10mg a 25mg e a variação de cefalexina foi de 30mg a 50mg. Sendo então, a combinação selecionada, 10mg de ampicilina e 30mg de cefalexina, ideal para ser adicionada o meio semi-seletivo para o desenvolvimento de *Xam*.

A sensibilidade foi avaliada pela sua compatibilidade, indicada pelo crescimento abundante na placa de Petri, o que designa que *Xam* suporta o produto na concentração testada. O crescimento de colônias de *Xam* demonstra resistência frente ao antibiótico e ao fungicida testado.

Os fungicidas Sulfato de cobre e a ciclohexamida também foram comparados. O Sulfato de cobre foi de 5mg a 15mg e a ciclohexamida de 75mg a 100mg.

A incorporação conjunta dos fungicidas, sulfato de cobre e ciclohexamida nas concentrações de 10mg e 100mg, respectivamente, também apresentou 100% de inibição do crescimento de *Xam*. A partir desses dados foi adotada a incorporação individualmente de

ciclohexamide, por ser este, o mais comumente citado e utilizado como inibidor de fungos.

De acordo com a necessidade de trabalhar-se com um meio de cultura mais acessível e que utiliza menos componentes na rotina laboratorial, os meios preparados, para o cultivo de *Xam*, foram comparados e testados. Desta forma, o meio de cultura semi-seletivo idealizado e indicado, ficou constituído de: 10g sacarose, 10g extrato de levedura, 10g amido solúvel, 5g cloreto de sódio, 10 mg de ampicilina, 30 mg de cefalexina e 100mg de ciclohexamide, o qual foi designado pela sigla SYA, onde “S” referente ao start (amido solúvel), “Y” referente a yeast extract (extrato de levedura) e “A” referente ao ágar-ágar.

O meio 523 (Figura 9-esquerda) e o meio semi-seletivo idealizado SYA, o surgimento das primeiras colônias foi em torno de 30h, no entanto, no meio 523 ocorreu à presença de contaminantes. O meio citado pelos autores Almeida & Beriam (2003), (Figura 10-esquerda) levou em torno de 72 a 96h, para o crescimento das primeiras colônias do isolado de referência. Entretanto, o meio XCS (Tabela 10 e 11) (SCHAAD et al., 2001) (Figura 11-esquerda) não apresentou crescimento de colônias.

Na Tabela 10 encontram-se os resultados das contagens das unidades formadoras de colônias nos meios de cultura recomendados e elaborados. Pode-se observar que as contagens foram elevadas, por tratar-se de um ensaio realizado com cultura pura, o isolado de referência IB 1153. No teste de plaqueamento por diluição foi possível verificar o poder de recuperação de *Xam* em meio semi-

seletivo, o número de colônias (UFC) foi estatisticamente igual ao número de UFC do meio de cultura padrão.

Para a detecção de *Xam* pelo método de extração por incubação foram testados e comparados os meios recomendados (Tabela 4) e os meios elaborados (Tabela 5). Em ambos os meios empregados, todos apresentaram crescimento de colônias, no entanto, não foi possível detectar o patógeno por meio da extração, possivelmente devido à perda de viabilidade da bactéria na semente. Outros protocolos de extração devem ser testados.

O meio semi-seletivo SYA apresentou o crescimento de colônias características de *Xam*, mas em quantidades diferentes, sendo que, as colônias ficaram com uma coloração mais saliente e brilhante quando comparados aos demais. A presença de contaminantes foi sensivelmente baixa devido à ação dos antibióticos e o fungicida (Figura 9, 10, 11 e 12 – direita).

Fig. 9

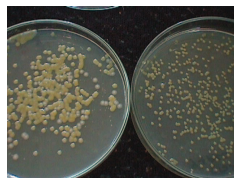


Fig. 10

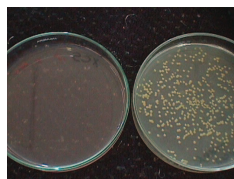
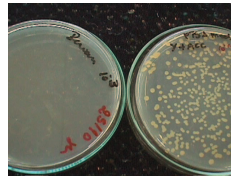


Fig. 11

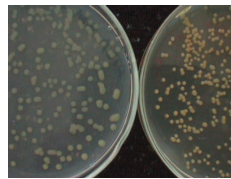


Fig. 12

Fotos by Soares (2005). Fotos com os meios de cultura recomendados para o desenvolvimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (esquerda) e meio semi-seletivo idealizado, SYA (direita). Fig. 9: meio 523 e SYA. Fig. 10: Almeida & Berian e SYA. Fig. 11: XCS e SYA. Fig. 12: PTSA e SYA.

Tabela 10 – Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* nos meios de cultura recomendados (1 ao 4) e os elaborados (Meio 1 ao Meio 4), usando o isolado IB 1153.

Meios de cultura recomendados	UFC/mL⁻¹*
2 – Van Vuurde (1999); PTSA	2,28 x 10 ¹⁴ a
1 – Almeida & Berian (2003); NA	1,68 x 10 ¹⁴ a b
4 – Meio 523 – Kado (testemunha)	1,62 x 10 ¹⁴ a b
3 – Schaad et al., (2001); XCS	Sem crescimento c
Meios de cultura elaborados	UFC/mL⁻¹*
Meio 1 – 523 Kado (+ antibióticos + fungicida)	4,58 x 10 ¹⁴ a
Meio 4 – Semi-seletivo SYA	2,42 x 10 ¹⁴ a
Meio 3 – PTSA (sem tirosina + antibióticos + fungicida)	2,25 x 10 ¹⁴ a
Meio 2 – 523 Kado (+ amido + antibióticos + fungicida)	1,64 x 10 ¹⁴ a b

*: Teste F (análise de variância) com 95% de confiança.

A avaliação da sensibilidade dos meios, frente à colonização do microrganismo desejado e a resistência à colonização de microrganismos interferentes, foi através do teste ecométrico.

O teste ecométrico consiste em preparar placas de Petri com o meio em teste e o meio de referência. Dividir as placas em quadrantes conforme a figura abaixo:

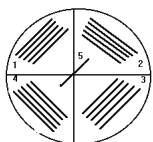


Figura 13. Divisão da placa em quadrantes com suas respectivas estrias.

A partir de cada cultura em caldo, com alça calibrada de 1µl, traçar 5 estrias em cada quadrante, e uma estria central de forma progressiva sem carregar nem flambar a alça. Incubar as placas por tempo e temperatura desejados. Cada estria se dá um valor de 0,2 (precisão do método). Este valor se multiplica pelo número de estrias nas quais se observou crescimento.

Para tanto, utilizou-se o Cálculo do Índice de Crescimento Absoluto (ICA) e o Índice de Crescimento Relativo (ICR), e os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 11 e 12 respectivamente. Utilizou-se um isolado de *Pseudomonas* sp para auxiliar no teste, como sendo o microrganismo não desejado empregado para realizar o teste de seletividade.

O ICA para os meios de cultura foi de 89%, somente o ágar XCS não apresentou um ICA considerado satisfatório, 11%, pois não houve crescimento em todos os quadrantes da placa de Petry.

Tabela 11 – Cálculo do Índice de Crescimento Absoluto (ICA).

Qtd	Meios de cultura	ICA
1	Almeida & Berian (2003); NA	5
2	Van Vuurde (1999); PTSA	5
3	Schaad et al., (2001); XCS	0,6
4	Meio 523 – KADO (testemunha)	5
5	Meio 523 – KADO (+ antibióticos + fungicida)	5
6	Meio 523 – KADO (+ amido + antibióticos + fungicida)	5
7	PTSA (sem tirosina + antibióticos + fungicida)	5
8	Meio semi-seletivo SYA (amido + extrato levedura + NaCl + antibióticos + fungicida)	5

Quanto ao ICR pode ser observado uma variação entre ICA-ME (índice de crescimento absoluto, dos meios em estudo) e o ICA-MR (índice de crescimento absoluto, meios referências) no que refere-se a produtividade e seletividade. A partir dos valores obtidos pelo teste ecométrico, pode ser ressaltado que o meio SYA apresenta boa reprodutividade, valor cinco, e sua seletividade foram satisfatórios, uma vez que a literatura cita valores >2 e o encontrado neste trabalho foi de 1,8.

Tabela 12 – Cálculo do Índice de Crescimento Relativo (ICR).

Autores (meios de cultura)	ICR		
	ICA-ME	ICA-MR	
		Reprodutividade	Seletividade
	Isolado não desejado		Isolado desejado
Almeida & Berian (2003); NA	5	1,4	2
Van Vuurde (1999); PTSA	5	1,2	2
Schaad et al., (2001); XCS	0	0	0
Meio 523 – KADO testemunha	5	2	5
Meio 523 – KADO modificado	5	1,8	5
Meio 523 – KADO modificado	5	1,8	5
PTSA	5	1,8	5
Meio semi-seletivo SYA	5	1,8	5
Ágar SIM	4	-	-
Ágar TSI	3,6	-	-
Ágar MYP	3,6	-	-
Ágar MacConkey	4	-	-
Ágar Baird Parked	1,4	-	-
Ágar YG	3	-	-
Ágar BSA	3	-	-
Ágar citrato	1,6	-	-
Ágar BPLS	5	-	-

Legenda: ICA-ME: índice crescimento absoluto no meio de estudo;

ICA-MR: índice crescimento absoluto no meio de referência;

Produtividade: em meio não seletivo o ICA = 4;

Seletividade: meio seletivo com isolado não desejado >2;

Meio seletivo com isolado desejado <3,5;

Isolado desejado: *Xam*, IB 1153;

Isolado não desejado: *Pseudomonas* sp.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção de *Xam* pela semeadura em placas de Petry, utilizando o meio 523 como testemunha, com o isolado de referência IB 1153 e o meio semi-seletivo SYA, mostrou-se eficiente, permitindo seu isolamento e com baixo índice de contaminantes. Desta forma, poderia se fazer uso deste meio para a detecção de *Xam*.

Sugere-se a realização de ensaios com vários isolados de *Xam* e testar o semeio direto de sementes de algodoeiro no meio semi-seletivo idealizado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. *Principles of seed pathology* v. 2. Boca Raton, CRC Press. p. 95-152. 1987.

AGOSTINI, V. A. *Detecção e biocontrole de Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli var. fuscans (Smith) Dye em sementes de feijoeiro comum (Phaseoli vulgaris L.)*. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – FAMV, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo – RS. Setembro, 2004.

AGRIDATA. *Doenças do algodoeiro*. Disponível em: <http://www.agridata.mg.gov.br/palgodao.htm> - item. Acesso em: 28 novembro 2002.

AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. 4.ed. Florida EUA: Universidade da Florida, 635p. 1997.

ALMEIDA, I. M. G.; BERIAN, L. O. S. et al. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO. Goiânia, GO. 15 a 18 de setembro de 2003.

AMORIM, L. et al. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3ed. São Paulo. Ceres Agronômica, v. 2, 1997.

AZEVEDO, L.; SIQUEIRA, A. *Manual de quantificação de doenças de plantas*. 1998.

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

BRADBURY, J. F. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. Ferry Lane, CAB Mycological International Institute. 332 p. 1986.

BRADBURY, J. F. Genus II. *Xanthomonas* In: KRIEG, N. R. & HOLT, J. G. eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 600p. 1984.

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

CHITARRA, L. G. Fluorescence techniques to detect and to assess viability of plant pathogenic bacteria. *Tese* (Ph.D Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands – With summaries in English and Dutch. p. 1-101. 2001.

CIA, E. *Manual de Identificação e Manejo das Doenças do Algodoeiro*. In: WORKSHOP DE DOENÇAS DO ALGODOEIRO. 15 a 16 de fevereiro de 2001. Cuiabá. FACUAL, p. 17-48. 2001.

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

CIA, E.; FUZATTO, M. G. *Manejo de doenças na cultura do algodão*. In: CIA, E. et al. *Cultura do Algodoeiro*. Piracicaba. p.121-132. 1999.

CIA, E.; SALGADO, C. L. *Doenças do algodoeiro*. In: KIMATI, H.; AMORIM, L. et al. *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. v.2 São Paulo, p 34-48. 1997.

DENARDIN, N. D. et al. *Deteção e identificação de bactérias em sementes*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES. João Pessoa, In: Anais.....SNA, p.62-67. 2004.

DENARDIN, N. D. et al. *Deteção e qualificação de Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum em sementes de algodoeiro*. In: 7º SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES. Resumos e palestras. Sete Lagoas, MG. 198p. 2002.

DEZORDI, C. et al. *Meio de cultura semi-seletivo para deteção de bactéria Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum de lotes de sementes de algodão*. In: INFORMATIVO ABRATES. v.15, nº. 1, 2, 3 – Agosto. 2005.

DEZORDI, C. et al. *Avaliação da sensibilidade in vitro de isolados de Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum à produtos químicos: I –*

Fungicidas. In: VII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES. Palestras e Resumos. João Pessoa – PB. 247p. 2004.

FACUAL; Fundo de Apoio a Cultura do Algodão. *Manual de identificação e manejo das doenças do algodoeiro*. In: ANAIS DO WORKSHOP DE DOENÇAS DO ALGODÃO: IDENTIFICAÇÃO, MANEJO E CONTROLE. Cuiabá – MT. 2001.

FREIRE, E. et al. *Fluxo gênico. Análise do caso do Algodão no Brasil*. In: REVISTA BIOTECNOLOGIA CIÊNCIA E DESENVOLVIMENTO. p. 1-15. 2000.

FREIRE, E.C. et al. *Perdas estimadas na produção de algodão devido a pragas e doenças no Centro-Oeste*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO. Ribeirão Preto – Campina Grande: Embrapa Cnpa, p.1-3. 1999.

GALLI, F. *Manual de fitopatologia – doenças das plantas cultivadas*. São Paulo, Agronômica Ceres, vol. 2, 600p. 1980.

GONDIM, D. M. C. et al. *Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Estado do Paraná*. In: BOLETIM TÉCNICO, 33 COODETEC/CIRAD. 2º Ed. 104p. Cascavel – PR. 1996.

GOTO, M. *Fundamentals of bacterial plant pathogens*. San Diego: Academic Press, 342p. 1990.

HUNTER, R. E.; BRINKERHOFF, L. A. *Longevity os Xanthomonas malvacearum on and in cotton seed*. In: PHYTOPATHOLOGY v. 54, p. 617. 1964.

KADO, C. I. & HESKETT, M.G. *Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Pectobacterium, Pseudomonas and Xanthomonas*. In: PHYTOPATHOLOGY v. 60, p. 969-976. 1970.

KOBAYASHI, A. K.; VIEIRA, L. G. E. *Establishment of an in vitro system for studies on the induced resistance of cotton to*

Xanthomonas campestris pv. *malvacearum*. In: PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA. v.35, n. 4, p. 719-725. 2000.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. et al. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9ª. Edição. Editora Williams & Wilkins, 787p. 1994.

MAC FADDIN, J. S. *Biochemical test for identification of medical bacteria*. 3th ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. *Manual de práticas em fitobacteriologia*. UFRP. Recife, PE 184p. 2005.

MEHTA, Y. R. et al. *A Semi-selective agar medium to detect the presence of Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in naturally infected cotton seed. In: FITOPATOLOGIA BRASILEIRA. 30 (5). set-out. 2005.

MEHTA, Y. R.; BOLOGNINI, V. *Meio semi-seletivo para detecção da presença de Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes do algodoeiro. In: FITOPATOLOGIA BRASILEIRA. 28:240. 2003.

MEIRELLES, F. S. de. *Agricultura Orgânica*. In: INFORME DO DEPARTAMENTO ECONÔMICO. São Paulo. FAESP. 2001.

MENTEN, J. O. M. *Tratamento de sementes*. In: SOAVE, J. et al. Tratamento químico de sementes. Anais. In: IV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES. Gramado, RS. p. 3-23. 1996.

MOURA, A. B. et al. *Métodos de detecção de bactérias em sementes*. In: REVISÃO ANUAL DE PATOLOGIA DE PLANTAS – RAPP. vol. 13. p. 297-319. 2005.

NEERGAARD, P. *Seed Pathology*. London, MacMillann, v. 1. 839p. 1979.

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

PAIVA, F. de A. et al. Doenças. In: EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. Algodão tecnologia de produção. Dourados. p. 245-267. 2001.

REIS, M. E. et al. *Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas*. 4 ed. Florianópolis, Insular, 2001.

ROMEIRO, R. S.; NET, J. R. *Diagnose de enfermidades de plantas incitadas por bactérias*. UFV –Viçosa. Imprensa Universitária. 67p. 2001.

ROMEIRO, R. S. *Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária. 283p. 2000.

SAETTLER, A. W. et al. *Detection of bacteria in seed and other planting material*. Minneapolis, The American Phytopathological Society. 125p. 1995.

SCHAAD, N. W. et al. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Third Edition. ASP:St Paul, 373p. 2001.

SOAVE, J.; MORAES, S. A. *Medidas de controle das doenças transmitidas por sementes*. In: PATOLOGIA DE SEMENTES. Fundação Cargill. Campinas, SP. 1987.

TOGNI, D. A. et al. *Controle orgânico de Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum através da utilização de um produto composto de substâncias minerais*. In: FITOPATOLOGIA BRASILEIRA. v. 30. Suplemento, Agosto de 2005.

VALARINI, P. J., MENTEN, J. O. M. *Xanthomonas campestris pv. phaseoli: método para detecção em sementes de feijão*. In: FITOPATOLOGIA BRASILEIRA. v.17, p. 373-383. 1992.

VAN VUURDE, J. W. L. *Detection of Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*. ISTA/ISHI. Canadá. 1999.

VAUTERIN, L. et al. *Reclassification of Xanthomonas*. In: INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. v. 45. p. 472-489. 1995.

WATKINS, G. M. *Compendium of cotton disease*. St. Paul: APS Press, 78p.1981.

WILLIAMS, S. T. et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed. Maryland, Baltimore. 1994.

APÊNDICE**PROCEDIMENTO PARA O PREPARO DO MEIO SEMI-
SELETIVO IDEALIZADO NESTE TRABALHO**

Amido solúvel.....	10g
Extrato levedura.....	10g
Sacarose ou Dextrose.....	10g
NaCl.....	5g
Ágar	15g
H ₂ O	1000mL
Antibióticos: 100mg ciclohexamida	(2mL)
30mg cefalexina.....	(0,6mL)
10mg ampicilina.....	(0,2mL)

Preparo das soluções estoques de antibióticos:

- 5g de ciclohexamida em 10mL de etanol a 70%;
- 1000mg cefalexina em 20mL de água destilada estéril;
- 1000mg ampicilina em 20mL de água destilada estéril;