

**HYANAMEYKA EVANGELISTA DE LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE ISOLADOS  
DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* E AVALIAÇÃO DE  
MEIOS SEMI-SELETIVOS PARA A SUA DETECÇÃO.**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-graduação  
em Fitopatologia, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L732c  
2008

Lima, Hyanameyka Evangelista de, 1980-  
Caracterização morfológica e bioquímica de isolados de  
*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e avalia-  
ção de meios semi-seletivos para a sua detecção /  
Hyanameyka Evangelista de Lima. – Viçosa, MG, 2008.  
x, 57f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.  
Orientador: José Rogério de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 44-54.

1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* -  
Morfologia. 2. *Clavibacter michiganensis* subsp.  
*michiganensis* - Cultura e meios de cultura.  
3. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* -  
Metabolismo. 4. Plantas - Inoculação. I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.35

**HYANAMEYKA EVANGELISTA DE LIMA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE ISOLADOS  
DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* E AVALIAÇÃO DE  
MEIOS SEMI-SELETIVOS PARA A SUA DETECÇÃO.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 22 de fevereiro de 2008.

---

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro  
(Co-orientador)

---

Dr. Carlos Alberto Lopes  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Rosângela D'Arc de L. Oliveira

---

Prof. Olinto Liparini Pereira

---

Prof. José Rogério de Oliveira  
(Orientador)

À Deus,  
aos meus amados pais, Ivo e Creuza, pelo apoio e incentivo,  
aos meus queridos irmãos, Keylla e Igo pelo estímulo,  
à minha sobrinha Bruna, pelos sorrisos e carinhos  
e aos amigos, sempre presentes em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste curso que muito contribuiu para minha formação profissional.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro durante toda a execução deste trabalho.

Ao professor José Rogério de Oliveira, pela amizade, atenção, interesse, incentivo e por toda a orientação durante a realização deste trabalho.

Ao professor Reginaldo da Silva Romeiro, pelas dicas sempre úteis ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao pesquisador Carlos Alberto Lopes (Embrapa-Hortaliças), pela disposição em ajudar, pelo envio de isolados bacterianos para a realização da pesquisa e pelas valiosas sugestões para aperfeiçoamento do manuscrito.

Ao professor Olinto Liparini Pereira e à professora Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, pelas sugestões apresentadas, pela atenção e pela disponibilidade em participar da banca de defesa da dissertação.

À técnica de laboratório Maria Sueli de Oliveira Cardoso, pela amizade, pela ajuda e pelo compartilhamento de sua experiência.

Aos companheiros de Fitopatologia, Gisele, Lila, André, Leandro e Alexandre, pela amizade, pelo auxílio e pelo convívio agradável.

Aos amigos Alexandre Alonso, Adelião e Cláudia, pela ajuda e amizade durante esses anos.

As amigas de República, Jéssica e Roseli, pela agradável convivência, amizade e apoio.

À todos os colegas de laboratório, principalmente ao Nadson, Fumiko e Ivanete pela amizade e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Fabrício de Ávila Rodrigues pela amizade e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Dagô, Jésus, Camilo, Bruno, Rita, Bráz, Eloy e Délio.

Aos meus pais, Ivo e Creuza, pelo carinho, apoio, ajuda, confiança e pelo referencial de dedicação, honestidade e perseverança.

Aos meus irmãos Keylla e Igo, pela torcida, ajuda e incentivo em todos os momentos.

À minha grande amiga Shéridan, por não ser só uma amiga, e sim uma irmã.

A todos os amigos e familiares de Boa Vista, que sempre torceram e acreditaram em mim.

À Deus, pelo dom da vida, pela saúde, força, coragem e pelas oportunidades que tem me proporcionado durante todo o decorrer da minha vida.

## **BIOGRAFIA**

Hyanameyka Evangelista de Lima, filha de Ivo Pereira de Lima e Creuza Evangelista, nasceu em 07 de julho de 1980, na cidade de Boa Vista, Roraima.

Ingressou em março de 2000, no curso de Agronomia da Universidade Federal de Roraima (UFRR), graduando-se em Engenharia Agrônômica em agosto de 2005. Em maio de 2006, iniciou o curso Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de dissertação em fevereiro de 2008.

## ÍNDICE

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Cancro bacteriano do tomateiro .....	3
2.2. Sintomatologia .....	4
2.3. Etiologia e taxonomia .....	5
2.4. Epidemiologia .....	6
2.5. Sobrevivência de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	9
2.6. Controle .....	10
2.7. Detecção em sementes de tomate .....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1. Local de realização da pesquisa .....	15
3.2. Origem e cultivo dos isolados de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) .....	15
3.3. Comprovação da fitopatogenicidade e reisolamento .....	15
3.3.1. Preparo do inóculo .....	15
3.3.2. Inoculação artificial .....	16
3.3.3. Reisolamento .....	17
3.4. Preservação dos isolados .....	17
3.4.1. Repicagem tubo a tubo .....	17
3.4.2. Preservação sob óleo mineral .....	17
3.5. Origem das mudas e amostras de sementes .....	18
3.6. Reação de hipersensibilidade .....	18



3.7. Crescimento dos isolados de Cmm nos meios semi-seletivos e determinação do índice de repressão (IR). .....	18
3.7.1. Determinação do índice de supressão (IS) dos meios semi-seletivos .....	19
3.8. Descrição das características morfológicas das colônias em diferentes meios....	20
3.8.1. Meio YDC.....	20
3.8.2. Meios semi-seletivos e 523 .....	20
3.9. Teste diagnósticos .....	20
3.9.1. Reação de Gram com base na solubilidade em KOH .....	20
3.9.2. Produção de catalase .....	21
3.9.3. Produção de oxidase.....	21
3.9.4. Produção de urease.....	21
3.9.5. Formação de levana.....	22
3.9.6. Hidrólise de amido .....	22
3.9.7. Hidrólise de esculina .....	22
3.9.8. Produção de H <sub>2</sub> S .....	23
3.9.9. Liquefação de Gelatina .....	23
3.9.10. Produção de ácidos a partir de diferentes fontes de carbono .....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4.1. Comprovação da fitopatogenicidade dos isolados .....	25
4.2. Reação de hipersensibilidade .....	25
4.3. Crescimento dos isolados de Cmm e determinação do índice de repressão (IR) dos meios semi-seletivos.....	26
4.4. Determinação do índice de supressão (IS) dos meios semi-seletivos .....	29
4.5. Descrição das características morfológicas das colônias em diferentes meios....	31
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
APÊNDICE.....	55

## RESUMO

LIMA, Hyanameyka Evangelista de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Caracterização morfológica e bioquímica de isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e avaliação de meios semi-seletivos para sua detecção.** Orientador: José Rogério de Oliveira. Co-orientadores: Reginaldo da Silva Romeiro e Carlos Alberto Lopes.

Seis meios semi-seletivos utilizados para detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), desenvolvidos em outras localidades e relatados na literatura, foram avaliados quanto à sua eficácia em permitir o crescimento de 20 isolados de *Cmm*, provenientes de diferentes regiões do Brasil. Quando as substâncias antimicrobianas foram excluídas dos meios semi-seletivos, houve crescimento dos isolados de *Cmm* em todos os meios básicos. Quando da adição desses compostos, apenas os meios MB1M, D<sub>2</sub>ANX e KBT permitiram o crescimento dos isolados, indicando, que os isolados brasileiros apresentam sensibilidade a alguns compostos antimicrobianos usados nos meios semi-seletivos. Devido os meios SCM, mSCM e CNS terem reprimido o crescimento de todos os isolados de *Cmm*, estes não devem ser utilizados em estudos epidemiológicos no Brasil, tais como detecção em lotes de sementes. Avaliou-se a supressividade nos meios MB1M, D<sub>2</sub>ANX e KBT, sendo que todos foram mais eficientes que o meio padrão (meio 523) em suprimir o crescimento de contaminantes associados a sementes e folhas de tomateiro, em todas as amostras testadas. Realizou-se, também, a caracterização morfológica das colônias de cada isolado de *Cmm* nesses três meios semi-seletivos e no meio padrão. Houve variação no tamanho, cor e tempo necessário para formação das colônias nos diferentes meios. Porém, as características típicas das colônias, como forma circular, superfície elevada, textura lisa e bordos inteiros foram as mesmas para todos os isolados, em todos os meios. Assim, o formato de colônias é uma característica estável para a identificação do patógeno. Os testes diagnósticos realizados permitiram verificar a variabilidade

bioquímica e fisiológica entre os isolados brasileiros, bem como em relação a outros isolados relatados na literatura. Algumas características se mostraram consistentes e devem, portanto, ser utilizadas na confirmação da identidade de isolados, após a comprovação da fitopatogenicidade. Estudos de reação de hipersensibilidade (HR) foram conduzidos em três espécies de plantas não-hospedeiras de *Cmm*, como: *Mirabilis jalapa*, *Phaseolus vulgaris* e *Coffea arabica*. Reações típicas de HR foram observadas somente em *Mirabilis jalapa* e *Phaseolus vulgaris*.

## ABSTRACT

LIMA, Hyanameyka Evangelista de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008. **Morphological and biochemical characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of semi-selective media for its detection.** Adviser: José Rogério de Oliveira. Co-advisers: Reginaldo da Silva Romeiro and Carlos Alberto Lopes.

Six semi-selective media used for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), developed elsewhere and reported in international literature, were evaluated for their efficacy to recover 20 Cmm isolates collected in different regions of Brazil. From these, only MB1M, D2ANX, and KBT allowed the growth of Cmm isolates, thus indicating differential resistance of Brazilian isolates to the antimicrobials used in the semi-selective media. Because they restrict the pathogen, the media SCM, mSCM and DCNS cannot be used for epidemiological studies in Brazil, such as detection on seed lots. MB1M, D2ANX and KBT also proved to be suppressive to contaminants associated with three tomato seed samples and two tomato leaf samples. The morphological characterization of colonies of each isolated was performed in these semi-selective media in comparison with the 523 media (Kado & Heskett, 1970). There was variation in the size, color and necessary time for formation of the colonies in the different semi-selective media. However, the typical characteristics of the colonies, as circular form, raised surface, smooth texture and smooth edges had been same for all the isolates, in all the semi-selective media. Thus, the format of colonies is a solid characteristic for the identification of Cmm. The biochemical tests proved to be useful to detect variability among the Brazilian isolates, as well among other isolates reported in the literature. The characteristics which showed consistency could be recommended for confirmation of the identity of Cmm isolates. In a complementary study, hypersensitivity reaction (HR) of all 20 Cmm isolates were positive on *Mirabilis jalapa* and *Phaseolus vulgaris*, but not on *Coffea arabica*.

## 1. INTRODUÇÃO

O cancro bacteriano do tomateiro, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al. 1984, é uma doença que ocorre com maior frequência em tomateiro com hábito de crescimento indeterminado (cultura estaqueada), sendo uma das mais importantes na cultura do tomate (*Solanum lycopersicon*) (Silva & Vale, 2007). As sementes contaminadas são consideradas como a mais importante fonte de inóculo, devido à capacidade de sobrevivência e transmissão da bactéria pela semente (Fatmi *et al.*, 1991; Santos *et al.*, 1997). O controle está fundamentado na adoção de um conjunto de medidas preventivas, pois poucas são as informações sobre cultivares resistentes à doença e não existe um produto químico que a controle eficientemente (Gartemann *et al.*, 2003; Kronka, 2004; Umesha, 2005; Lopes & Quezado-Duval, 2007). Portanto, uma das medidas mais eficazes no controle do cancro bacteriano é a utilização de sementes livres do patógeno.

Diversas metodologias são relatadas e podem ser usadas na detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes e outras partes propagativas de plantas (Saettler *et al.*, 1989). A escolha do método de detecção depende de sua eficiência na recuperação do patógeno alvo, bem como de sua reprodutibilidade e da disponibilidade de tempo e material necessário para a realização do mesmo, além de mão-de-obra treinada e custo. Alguns demandam longo período de tempo para serem concluídos, enquanto outros necessitam de materiais e equipamentos caros, nem sempre disponíveis na maioria dos laboratórios.

Os meios semi-seletivos são meios de cultura que tem como finalidade permitir o crescimento de determinados microrganismos em detrimento de contaminantes e são mais fáceis de serem desenvolvidos do que os meios seletivos, uma vez que é muito difícil suprimir completamente o crescimento de microrganismos contaminantes, especialmente outras bactérias. Os meios seletivos e semi-seletivos constituem uma alternativa viável para a detecção de patógenos em sementes, uma vez que têm

mostrado boa eficiência na recuperação desses microrganismos, são de fácil preparo e armazenáveis por longo tempo. Além disso, é uma metodologia de baixo custo e que demanda pouco espaço físico em laboratório (Silva, 2002). Diversos meios semi-seletivos foram desenvolvidos visando a detecção de *Cmm* em sementes de tomateiro.

A caracterização morfológica das colônias também é um aspecto importante que auxilia na detecção, pois características próprias das colônias são utilizadas para diferenciar *Cmm* de outras bactérias que crescem nos meios semi-seletivos. Porém, alguns microrganismos saprófitas, que apresentam morfologia semelhante, poderão confundir o avaliador. Assim, características morfológicas não podem ser empregadas como único critério para a identificação do gênero ou espécie de fitobactérias. Por isso, outros critérios, como propriedades fisiológicas e nutricionais, devem ser utilizados na identificação. Outra alternativa para diferenciar microrganismos contaminantes que crescem nos meios semi-seletivos da bactéria alvo é a utilização de plantas não-hospedeiras para estudo de reações de hipersensibilidade (HR), uma vez que bactérias saprófitas, usualmente, não incitam HR (Romeiro, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *Cmm* por meio de testes bioquímicos, indução de HR em plantas não hospedeiras e características morfológicas das colônias em meios semi-seletivos e padrão, bem como comparar a eficiência dos meios semi-seletivos para a detecção de *Cmm*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Cancro bacteriano do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicon*) pertence à família Solanaceae e é a olerícola mais disseminada em todo o mundo. Em 2005, a produção mundial de tomate foi superior a 122 milhões de toneladas (Silva & Vale, 2007). A China, maior produtor de tomate do mundo, produziu, em 2006, 32,5 milhões de toneladas (FAO, 2006). No Brasil, o tomate é a segunda hortaliça em importância econômica, sendo superada apenas pela cultura da batata, que no ano de 2006 ocupou 140.754 ha, enquanto o tomate ocupou 54.931 ha, sendo este cultivado praticamente em todos os Estados, sendo os Estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais os maiores produtores, responsáveis por aproximadamente 67% da produção nacional de tomate. O Brasil colheu mais de 3,3 milhões de toneladas, o que lhe garantiu a nona posição no ranking mundial, com aproximadamente 3% da produção (Silva & Vale, 2007; IBGE, 2007). Porém, a cultura do tomate está sujeita a várias doenças que podem limitar a sua produção. O cancro bacteriano do tomateiro (CBT) causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* 1984 (Cmm), é considerada a principal bacteriose do tomateiro devido às perdas econômicas substanciais provocadas em todo o mundo (Fatmi & Schaad, 1988; Gartemann *et al.*, 2003). O CBT tem sido encontrado nas áreas de maior produção de tomate do mundo, ocasionando perdas de 50 a 80% da produção (Chang *et al.*, 1992).

No Brasil, o primeiro relato do CBT ocorreu em 1976, no Estado de São Paulo, e, após dois anos, a doença assumiu grande importância para a cultura, causando perdas de 40 a 50% na produção (Maffia *et al.*, 1980). A doença já se encontra disseminada em quase todas as regiões produtoras de tomate, provocando perdas de até 50% da produção em condições ambientais favoráveis, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Theodoro & Maringoni, 2000). A doença ocorre com maior frequência

em tomateiro estaqueado, cuja condução requer manejo mais intensivo das plantas, comparativamente ao tomateiro rasteiro (Lopes & Quezado-Duval, 2005).

## 2.2. Sintomatologia

*Cmm* pode colonizar o tomateiro tanto de forma localizada quanto sistêmica, resultando em sintomas bem distintos, que podem variar com diversos fatores, como idade da planta, sítio de infecção, suscetibilidade de cultivares e condições ambientais (Gleason *et al.*, 1993; Lopes & Quezado-Duval, 2005). A infecção localizada prevalece no verão, quando as chuvas são mais abundantes e favorecem a disseminação da bactéria de uma planta para outra. O sintoma mais comum, é a queima das folhas, que se inicia normalmente pelas bordas. Os sintomas iniciais nos folíolos variam desde encharcamento, seguido de necrose, até pequenas elevações de forma circular, com centro esbranquiçado, formando pequenas pústulas de 1 a 2 mm de diâmetro. No pecíolo e nas nervuras dos folíolos afetados, observam-se às vezes, pequenos fendilamentos (microcancros), com exsudação pouco perceptível. Na superfície dos frutos, os sintomas apresentam-se como lesões circulares, com halos esbranquiçados, com 1 a 3 mm de diâmetro, que se rompem formando um tecido suberificado escuro e saliente no centro, sendo este sintoma tipicamente conhecido como “olho-de-perdiz” ou “olho-de-pássaro” e, quando ocorrem em grande número, provocam a deformação dos frutos. (Robbs, 1985; Moura & Oliveira, 1996; Lopes & Quezado-Soares, 1997; Kronka, 2004).

A murcha é o sintoma mais característico da infecção sistêmica, sendo comum o murchamento unilateral dos folíolos ou da planta, resultante de uma colonização unilateral dos feixes vasculares, causada pela invasão sistêmica da bactéria na planta (Robbs, 1985; Lopes & Quezado-Soares, 1997; Lopes & Quezado-Duval, 2007). A manifestação dos sintomas de murcha das folhas intensifica-se a partir do início da frutificação, quando os frutos ainda verdes, mesmo sem sintomas, se desprendem facilmente das plantas afetadas devido à infecção dos pedúnculos, onde se formam pequenos cancos (Kronka, 2004; Lopes & Quezado-Duval, 2005). Estrias amareló-claras para marrom se desenvolvem ao longo do caule doente e na base dos pecíolos, que escurecem gradualmente (Robbs, 1985; Lopes & Quezado-Soares, 1997; Lopes & Quezado-Duval, 2007). A bactéria invade sistemicamente a planta e passa a se multiplicar nos feixes vasculares; Com o progresso da enfermidade, a colonização se estende para o tecido parenquimatoso circunvizinho. Profundas alterações histológicas



se sucedem, o parênquima é empurrado para fora, rachando o caule e expondo o cancro, que revela a extensa necrose da medula e do córtex. Embora o cancro tenha aspecto de uma típica lesão de filoplano, na verdade ele tem origem de uma infecção sistêmica (Romeiro, 2005; Agrios, 1997; Gleason *et al.*, 1993). A colonização sistêmica pode ocorrer desde a germinação da semente até a planta adulta e, de modo geral, os sintomas se manifestam em condições de campo, um mês após o transplante ou mais tarde (Galli & Tokeshi, 1979). Em plântulas originadas de sementes infectadas pela bactéria, ocorrem lesões esbranquiçadas e salientes nas folhas cotiledonares (Robbs, 1985). Quando o solo está contaminado com *Cmm*, a bactéria penetra na planta através de ferimentos nas raízes ou na haste, e então encontra o caminho para o xilema (Gartemann *et al.*, 2003).

### 2.3. Etiologia e taxonomia

O cancro bacteriano do tomateiro, causado pela bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* (1984), é uma doença muito contagiosa e destrutiva para a cultura do tomate, tanto em casa de vegetação como no campo (Utkhede & Koch, 2004). Esta doença foi observada pela primeira vez em casa de vegetação, em Michigan, Estados Unidos da América, em 1909 por Erwin F. Smith (Gitaitis, 1991), que inicialmente nomeou a doença de “the grand rapids disease” e, posteriormente, em 1920, passou a denominá-la de cancro bacteriano (Strider, 1969).

Smith, inicialmente, nomeou o agente causal de *Bacterium michiganense* Smith 1910. Mais tarde, a bactéria foi renomeada como *Pseudomonas michiganensis* (Smith) Stevens 1913, *Aplanobacter michiganensis* (Smith) Smith 1914, *Phytomonas michiganensis* (Smith) Bergey *et al.*, 1923, *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen 1934, e *Mycobacterium michiganense* (Smith) Krasil’nikov 1941. Entretanto, *Corynebacterium michiganense* foi a nomenclatura que se tornou aceita e estabelecida, permanecendo por aproximadamente 50 anos (Gleason *et al.*, 1993; Bradbury, 1986). Na década de 1980, a bactéria foi reclassificada como pertencente ao gênero *Clavibacter*, com base em novos conhecimentos sobre a composição da parede celular, em função do seu conteúdo de ácido 2,4-diaminobutílico, do conteúdo guanina+citosina do DNA e do perfil eletroforético de proteínas, passando a ser denominada *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* 1984, pertencente ao grupo Corineforme de fitobactérias (Davis *et al.*, 1984). O gênero *Clavibacter* é representado por duas espécies, *Clavibacter toxicus* Riley & Ophel, 1992 e *Clavibacter*

*michiganensis* (Smith) Davis et. al. 1984, esta última sendo dividida em cinco subespécies, que são diferenciadas pela gama de hospedeiros (Gattermann *et al.*, 2003; ISPP, 2008).

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* é uma bactéria gram-positiva, pleomórfica, cujas células variam consideravelmente de tamanho e forma, incluindo bastonetes retos, inclinados e curvos, em forma de cunha e clava, podendo ser móveis ou imóveis (Davis *et al.*, 1984). As células podem ser encontradas reunidas, formando configurações em forma de “V” e não formam endósporos (Davis, 1986). São aeróbias estritas, catalase-positiva e oxidase-negativa (Vidaver & Davis, 1988). O tamanho da célula é variável, de acordo com o meio empregado, mas em geral a média é de 1,0 x 0,5µm (Strider, 1969). O maior constituinte da parede celular é o peptidoglicano (Davis, 1986). As colônias são geralmente pequenas, circulares e convexas (Vidaver & Davis, 1988). Quando desenvolvidas em meio nutriente-ágar, as culturas de *Cmm* são amareladas, com a região central mais escura, quando examinadas contra a luz (Davis *et al.*, 1984).

Muitos isolados de *Cmm* possuem dois plasmídeos pCM1 e pCM2 (Meletzus & Eichenlaud, 1991) e a agressividade dos isolados é maior quando estes dois plasmídeos estão presentes (Meletzus *et al.*, 1993, Dreier *et al.*, 1997, Gattermann *et al.*, 2003). *Cmm* produz exopolissacarídeos e as enzimas endoglucanases, metilesterases da pectina, poligalacturonases e xilanases, todas provavelmente envolvidas na patogenicidade. O gene *celA*, presente no plasmídeo pCM1, codifica uma endoglucanase (CelA, 78kDa) necessária para o desenvolvimento dos sintomas em tomateiro. A expressão dessa proteína em isolados avirulentos, sem plasmídeos, recuperou a habilidade dos mesmos para causar murcha, o que foi reforçado pela complementação de mutantes CelA- com o gene *celA* do tipo selvagem (Jahr *et al.*, 2000).

#### **2.4. Epidemiologia**

Além do tomate, *Cmm* foi relatada infectando, em condições naturais, hospedeiros alternativos como: *Capsicum annuum*, *Solanum douglasii*, *S. nigrum* e *S. triflorum*. A bactéria também pode parasitar *Solanum americanum* (maria-pretinha), que é umas das principais plantas daninhas na cultura do tomate (Almeida *et al.*, 1996; Lopes & Quezado-Duval, 2007). Por meio de inoculação artificial: *Amaranthus retroflexus*,

*Browallia speciosa* var. major, *Brunfelsia lactea*, *Castrum purpureum*, *Chenopodium album*, *Cyphomandra*, *Datura innoxia*, *D. metel*, *D. meteloides*, *D. mollis*, *D. stramonium*, *Hyoscyamus niger*, *Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*, *N. bigelovii*, *Nierembergia* sp., *N. frutescens*, *Pisum sativum*, *Physalis betacea*, *Physalis heterophylla*, *P. longifolia*, *Salpiglossis* sp., *Schizanthus* sp., *Solanum racemigerum* (*Lycopersicon pimpinellifolium*), *Solanum ciliatum*, *S. humboldtii*, *S. dulcamara*, *S. gilo*, *S. khasianum*, *S. melongena*, *S. nigrum*, *S. mammosum*, *S. muricatum*, *S. pruniforme*, *S. tuberosum*, *S. racemiflorum*, *S. atropurpureum*, *S. aviculare*, *S. carolinense*, *S. nodiflorum*, *S. pseudocapsicum*, *S. quitoense*, *S. indicum*, *Streptosolen jamensonii*, *Zea mays*, *Xanthium saccharatum* (Volcani *et al.*, 1970; Thyr, 1971; Thyr *et al.*, 1975; Bradbury, 1986; Gitaitis, 1990; Chang *et al.*, 1992).

O tomateiro é suscetível ao cancro bacteriano em qualquer estágio de desenvolvimento da cultura. A penetração da bactéria ocorre através de aberturas naturais (estômatos e hidatódios), microferidas provocadas por atrito de folhas devido a ação dos ventos ou por ferimentos provocados por práticas culturais. Quando o solo está infestado com *Cmm*, a bactéria penetra na planta através das raízes ou haste, até chegar ao vasos do xilema, onde ocorre a colonização e a multiplicação (Gartemann *et al.*, 2003). A bactéria pode infectar a semente via elementos vasculares, o que dará início a infecções sistêmicas nos próximos cultivos (Shuster & Coyne, 1974; McGee, 1995, citado por Umesha, 2006).

O murchamento das plantas infectadas por *Cmm* não é causado por estresse hídrico, devido ao impedimento do transporte da seiva, resultante da alta colonização da bactéria e da grande quantidade produzida de exopolissacarídeo nos vasos do xilema, mas sim devido aos fatores de patogenicidade codificado nos plasmídeos (Meletzus & Eichenlaud, 1991).

As sementes também podem ser contaminadas no processo de extração dos frutos e ou durante o beneficiamento, quando em contato com sementes contaminadas. (Gleason *et al.*, 1991; Miguel, 1997). Bryan (1930), citado por Tsiantos (1987), relatou que *Cmm* permanece viável por oito meses nas sementes contaminadas durante o processo de beneficiamento.

As sementes são o principal veículo de disseminação de *Cmm*, por proporcionar um meio eficiente de introdução da bactéria nos estádios iniciais de cultivo, ou em

regiões geográficas onde ela ainda não ocorre, podendo levar à disseminação da bactéria a longa distância (Shuster & Coyne, 1974). Sementes do tomateiro infestadas ou infectadas por *Cmm* constituem a principal fonte primária de inóculo em campos de produção de tomate (Chang *et al.*, 1992). A bactéria pode estar presente tanto externamente como internamente na semente, sendo que a associação se dá com o tegumento, o embrião e outras partes (Leben, 1981). Em sementes infectadas por *Cmm*, a bactéria está presente internamente, entre o tegumento e o embrião, mantendo uma íntima associação, o que faz a probabilidade de transmissão ser elevada (Robbs, 1985; Machado, 1988).

A percentagem de transmissão por sementes, mesmo sendo da ordem de 1%, torna-se altamente significativa, podendo resultar em 100% de infecção no campo, quando se usa o processo de transplante (Strider, 1969). Por conseguinte, para a produção de sementes certificadas, 1% de sementes infectadas em campos de produção pode resultar em epidemia, até mesmo em condições desfavoráveis, e nessas condições, a poda do topo acarreta infecção sistêmica latente, implicando em perda total de produção (Hadas *et al.*, 2005; Strider, 1969). Adicionalmente, Chang *et al.* (1991a) relatam que a ocorrência de 0,01% a 0,05% de sementes de tomateiro infectadas por *Cmm* é capaz de iniciar uma epidemia em uma lavoura de tomate. Portanto, a detecção do agente causal do cancro bacteriano em lotes de sementes tem significativa importância, tanto para as empresas produtoras de sementes quanto para os agricultores (Thyr, 1969).

*Cmm* também pode ser disseminada em campos de produção de tomate por meio das gotas de chuvas, irrigação por aspersão, do maquinário, da poda, amarração, colheita e da pulverização de pesticida (Chang *et al.*, 1991b; Gleason *et al.*, 1991; Kronka, 2004).

As condições favoráveis ao desenvolvimento da doença são: baixa intensidade luminosa, temperaturas entre 24 °C a 28°C, pH alcalino, solos pobres ou que receberam adubações químicas excessivas e alta umidade do solo, estando o ótimo de umidade do solo entre 40% e 80% da capacidade de campo (Galli & Tokeshi, 1979; Tokeshi & Carvalho, 1980; Robbs, 1985).

## 2.5. Sobrevivência de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

A sobrevivência de *Cmm*, em campo, depende das condições ambientes e da presença de um hospedeiro para manter as necessidades mínimas do seu metabolismo (Chang *et al.*, 1992). Pesquisas realizadas por Dreier (2004) mostraram que a ocorrência desta doença em quase todas as casas de vegetação em regiões produtoras de tomate na Turquia é devido à presença de alta umidade relativa e da falta de aplicações de bactericidas de proteção.

Além de *Cmm* sobreviver em plantas hospedeiras e sementes, a bactéria também pode sobreviver em restos culturais e por um período curto como célula-livre no solo e como epífita ou residente em plantas invasoras (Robbs, 1985; Chang *et al.*, 1992).

Segundo Goto (1992), *Cmm* é capaz de sobreviver por sete a oito meses, em condições de ar seco, na superfície de estacas de madeira, caixas e arames. E por até 15 meses em solo e em restos de culturas de tomateiro enterrados ou expostos na superfície do solo, sendo a sobrevivência maior quando os restos culturais ficam expostos na superfície do solo do que quando enterrados. Isto mostra que o ambiente do solo pode interferir na sobrevivência de *Cmm*, no qual, potenciais antagonistas podem estar associados à diminuição do patógeno e com a decomposição dos restos culturais (Chang *et al.*, 1991b).

Fatmi & Schaad (2002), ao analisarem estudos de diversos autores, mostraram que os dados de sobrevivência de *Cmm* no solo divergem devido às diferenças entre os locais de estudo e os métodos de detecção utilizados. Em todos os casos citados, a prevalência ou a existência de *Cmm* no solo não foi baseada no isolamento do organismo, mas em observações de ocorrência da doença em plantas de tomate em plantios subsequentes.

Estudos realizados por Miguel (1997) mostraram que *Cmm* pode sobreviver associada a estacas de bambu por até 100 dias, no interior de casa de vegetação e em ambiente externo, sendo efetivamente transmitida para plantas de tomate durante esse período. Esta sobrevivência, pouco convencional, também pode ocorrer em máquinas, implementos e outros equipamentos usados na produção agrícola, contribuindo para o longo tempo de sobrevivência do patógeno nas áreas de produção.

## 2.6. Controle

O sucesso do controle do cancro bacteriano do tomateiro está fundamentado na adoção de um conjunto de medidas de caráter preventivo (Gartemann *et al.*, 2003; Umesha, 2005; Lopes & Quezado-Duval, 2007), pois, como geralmente o controle curativo é pouco eficiente e muitas vezes, economicamente inviável, as medidas preventivas são os melhores métodos a serem utilizados no controle das doenças causadas por bactérias fitopatogênicas (Romeiro, 2005). Desta forma, o controle inicia-se com o plantio de sementes ou mudas sadias. Se a cultura for afetada, devem-se incinerar restos culturais, estacas e mourões. Caso se deseje reaproveitar as estacas, bandejas de semeadura, madeiramento e implementos, estes podem ser desinfestados com hipoclorito de sódio ou com outro desinfestante (Strider, 1969; Tokeshi & Carvalho, 1980; Gitaitis, 1991; Kurozawa & Pavan, 1997; Miguel, 1997). Deve-se preferir utilizar fitilhos descartáveis em substituição às estacas (Lopes & Quezado-Duval, 2007). Recomenda-se também fazer aração profunda após a colheita, para enterrio e decomposição acelerada de restos culturais, controlar plantas daninhas e plantas de tomates voluntárias (Gleason *et al.*, 1993) e ter cuidados com a qualidade da água de irrigação, evitando-se, sempre que possível, a irrigação por aspersão (Kurozawa & Pavan, 1997). Além disso, a rotação de culturas, preferencialmente com gramíneas, que não são hospedeiras deste patógeno, por períodos prolongados (pelo menos dois anos), diminui a concentração de inóculo no solo, podendo com o decorrer dos anos eliminar essa bactéria do local (Kurozawa & Pavan, 1997; Lopes & Quezado-Duval, 2005).

Fungicidas à base de cobre e antibióticos têm sido recomendados para o controle do CBT (Lopes & Quezado-Duval, 2005). Entretanto, a baixa eficiência e a possibilidade do surgimento de populações bacterianas resistentes a estes produtos tem levado à procura de novas alternativas para o controle da doença, tais como a resistência sistêmica adquirida, utilizando o indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM). Trabalhos realizados por Baysal *et al.* (2003) confirmaram que o ASM induz resistência em tomateiro, pois plantas de tomate tratadas com ASM três dias antes da inoculação com *Cmm* tiveram a severidade da doença reduzida em até 76,3%. A inibição da multiplicação do patógeno na planta coincidiu com o aumento da atividade de peroxidases e quitinases. Kronka (2004) aplicando o ASM em plantas de tomateiro antes da inoculação com *Cmm* verificou que a redução da doença foi superior nestas

plantas, quando comparadas com plantas tratadas com produtos tradicionais, como fungicidas protetores e antibióticos.

Estudos realizados por Utkhede & Koch (2004), demonstraram a eficiência de alguns tratamentos biológicos no controle do cancro bacteriano do tomateiro em casas de vegetação. Nestes estudos, plantas de tomateiro foram tratadas com *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* (RootShield<sup>®</sup>), lisoenzimas, vermicomposto e *Rhodosporidium diobovatum*, os quais foram efetivos no controle de *Cmm*. Umesha (2006) tratando sementes de tomate com *Pseudomonas fluorescens*, obteve sementes de melhor qualidade, reduzindo com isso a incidência da doença no campo.

Algumas variedades de tomate têm sido relatadas como possuidoras de grau intermediário de resistência ao cancro bacteriano, porém poucas são aceitas comercialmente (Gleason *et al.*, 1993; Lopes & Quezado-Duval, 2007).

## **2.7. Detecção em sementes de tomate.**

Para a detecção de *Cmm* em sementes de tomate, os seguintes métodos têm sido utilizados: isolamento direto ou indireto em meios semi-seletivos (Valarini, 1995; Waters & Bolkan, 1992; Hadas *et al.*, 2005; Gross & Vidaver, 1978; Dhanvantari, 1987; Fatmi & Schaad, 1988, Shirakawa & Sasaki, 1988), inoculação em plantas indicadoras (Gitaitis, 1990), técnicas sorológicas (Kaneshiro *et al.*, 2006; Léon *et al.*, 2006) e testes de DNA (Patrik & Rainey, 1999; Santos *et al.*, 1997).

Diversos meios semi-seletivos foram desenvolvidos nas últimas décadas, visando à detecção de *Cmm* em sementes de tomate, tecidos de plantas e solo. O desenvolvimento de meios semi-seletivos representa um avanço significativo para as indústrias de sementes e tomate. Muitos programas de certificação de sementes, testes de laboratórios e indústrias de sementes utilizam vários meios simultaneamente. A eficiência dos meios depende do tipo de amostra analisada (Gleason *et al.*, 1993). Segundo Caflin *et al.* (1987), os meios usados para detecção devem ser baratos, possuir em sua composição reagentes comuns de laboratório, fáceis de preparar, armazenáveis por longo tempo sem alterações e evitar ao máximo o crescimento de contaminantes durante os testes.

O isolamento do patógeno em meios semi-seletivos pode ocorrer de forma direta ou indireta. No isolamento direto, sementes desinfestadas superficialmente são

depositadas em um meio semi-seletivo (Saettler *et al.*, 1989) e, após o período de incubação, observa-se o crescimento de colônias da bactéria alvo. Já o isolamento indireto, utiliza-se o método de extração de microrganismos associados às sementes, no qual, as sementes são moídas ou incubadas inteiras em água ou tampão. Essa suspensão é, então, diluída e transferida para placas de Petri, contendo um meio semi-seletivo (Silva, 2002; Romeiro, 2001). Os meios semi-seletivos são mais fáceis de serem desenvolvidos do que os meios seletivos, uma vez que é muito difícil evitar o aparecimento de contaminações, especialmente por outras bactérias. Dentre os meios semi-seletivos usados para o isolamento de *Cmm* estão: MB1M (Valarini, 1995), mSCM (Waters & Bolkan, 1992), D<sub>2</sub>ANX (Hadas *et al.*, 2005), CNS (Gross & Vidaver, 1979), KBT (Dhanvantari, 1987) e SCM (Fatmi & Schaad, 1988).

Valarini (1995), utilizando um meio semi-seletivo desenvolvido a partir do meio MB<sub>1</sub> (MB<sub>1</sub>M), obteve um melhor crescimento de *Cmm*, menor efeito de repressividade do patógeno e maior efeito de supressividade de saprófitas.

O meio SCM, desenvolvido por Fatmi & Schaad (1988), permitiu detectar, a partir de uma única semente infectada pela bactéria, tão pouco quanto 50 UFC de *Cmm* em amostras de 10.000 sementes, mostrando a alta sensibilidade do meio. Waters & Bolkan (1992) modificaram o meio SCM (mSCM), o qual permitiu o crescimento de *Cmm* em 5-9 dias, com as colônias apresentando características fáceis de serem distinguidas de saprófitas.

Chun (1982), citado por Hadas *et al.* (2005), desenvolveu o meio semi-seletivo D<sub>2</sub>ANX para detecção de *Cmm* em sementes de tomate, o qual permitiu um bom crescimento da bactéria e a supressividade de saprófitas, facilitando assim a detecção e a identificação da bactéria.

Gross & Vidaver (1979) desenvolveram um meio para o isolamento de *Cmm* de solo e de partes da planta, denominado de meio CNS. Entretanto, Fatmi & Schaad (1988) consideraram este meio pobre para o crescimento de *Cmm*, embora de acordo com Hadas *et al.* 2005, ele ainda seja bastante utilizado, pelo fato de inibir outras bactérias.

Dhanvantari, (1987) modificou o meio King B (KBT) e mostrou que o meio KBT foi mais seletivo para *Cmm* do que o meio King B. Além disso, quando o meio KBT foi



comparado com o SCM, houve um crescimento mais rápido da bactéria no meio KBT do que no meio SCM.

O método de inoculação em plantas indicadoras é simples, tem baixo custo e não exige equipamentos nem treinamentos sofisticados. Geralmente o inóculo consiste de culturas isoladas em meios artificiais ou de suspensão obtida por imersão de sementes, com ou sem assepsia, em água destilada esterilizada ou meios líquidos, sob condições variadas (Valarini, 1990).

Diversos métodos de inoculação em plântulas e plantas adultas têm sido utilizado, visando diferenciar as colônias obtidas nos meios de culturas utilizados na detecção de *Cmm* em sementes, plantas ou solo, para confirmar a patogenicidade dos isolados e diferenciá-las de saprófitas. Strider & Konsler (1965), inocularam uma suspensão bacteriana por atomização e observaram manchas brancas em folhas cotiledonares de tomateiros aos cinco dias após emergência, seguindo-se a murcha e a morte das plântulas. Ramos (1978) conseguiu 66% de infecção 10 dias após a inoculação, quando utilizou a técnica de inoculação por ferimento, cujas primeiras folhas verdadeiras de plântulas de tomate com 12 dias de emergência foram cortadas e o corte inoculado por pincelamento com suspensão bacteriana. Kronka (2004) comparou diferentes métodos de inoculação e observou o método que apresentou maior índice da doença foi o da inoculação por aspersão na parte aérea da planta, na concentração  $10^8$  UFC/ml.

Entretanto, em virtude do diagnóstico do cancro bacteriano nem sempre ser fácil, devido os sintomas variarem de acordo com a condição ambiental, com a cultivar, com a idade da planta e com o tipo de invasão, torna o método não muito seguro, uma vez que o patógeno pode estar presente na planta sem causar sintomas (Lopes & Quezad-Duval, 2007). Além disso, este método exige muito espaço em casa de vegetação e tempo.

Gitaitis (1990) inoculou diversas plantas não-hospedeiras para indução de hipersensibilidade (HR), visando diferenciar *Cmm* de outras bactérias que crescem nos meios semi-seletivos. A identificação dos isolados com base apenas no aspecto visual das colônias é passível de erros, visto que alguns saprófitas apresentam morfologia semelhante a *Cmm*. Todos os isolados que induziram HR em *Mirabilis jalapa* L. causaram, também, os sintomas típicos do cancro bacteriano em plantas de tomate e tinham as características morfológicas de *Cmm*. Os isolados de *Erwinia herbicola*,

*Pseudomonas fluorescens* e saprófitas com morfologia similar a *Cmm* falharam em induzir HR em *M. jalapa* e não foram patogênicos ao tomate. O autor concluiu que a inoculação de isolados suspeitos em *M. jalapa* é uma maneira rápida e precisa de se confirmar a identidade dos mesmos quando da detecção de *Cmm*.

Dentre as técnicas sorológicas utilizadas para a detecção de *Cmm* em sementes estão a imufluorescência, ELISA e a separação imunomagnética (Veena & Van Vuurde, 2002; Kaneshiro *et al.*, 2006; Léon *et al.*, 2006). Entretanto, estes testes apresentam limitações, pois a viabilidade do patógeno não é determinada (Gleason *et al.*, 1993)

Diversos trabalhos têm sido realizados utilizando a técnica de PCR para a detecção de *Cmm* em lotes de sementes, pois esta técnica, além de rápida e sensível, tem-se demonstrado extremamente útil para a detecção do patógeno em lotes de sementes com baixos níveis de infecção (Dreier *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1997; Pastrok & Rainey, 1999; Burokiené, 2006). Santos *et al.* (1997) utilizando esta técnica, conseguiram detectar até 40 UFC/mL em soluções extraídas de lotes de sementes contaminadas com *Cmm*. Esta é, porém, uma técnica cara, que exige treinamento especializado para utilizá-la e não está, portanto, disponível em todos os laboratórios de detecção. Além disso, existe a possibilidade de ocorrer contaminação cruzada durante o processamento das amostras e esta ser “captada” pelo teste, o qual é muito sensível. É importante lembrar que, como nos testes sorológicos, a PCR também não discrimina entre células vivas e mortas do patógeno, podendo gerar resultados falsos positivos (Gartemann *et al.*, 2003).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Local de realização da pesquisa

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Patologia de Sementes e em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, no período de março de 2007 a fevereiro de 2008.

#### 3.2. Origem e cultivo dos isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*)

Foram obtidos isolados de diversos estados brasileiros (Tabela 1), de forma a assegurar uma maior representatividade do patógeno no país. Um dos isolados faz parte da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Outros 17 isolados do patógeno foram obtidos por doação da EMBRAPA Hortaliças - DF e dois outros isolados obtidos foram adquiridos do Instituto Biológico de Campinas - SP.

O meio de cultura utilizado para a repicagem e o preparo de inóculo foi o meio 523 de Kado & Heskett (1970). As culturas foram incubadas a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , para crescimento.

#### 3.3. Comprovação da fitopatogenicidade e reisolamento

##### 3.3.1. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado utilizando-se o meio 523 fundente, o qual foi vertido em placas de Petri de 90 mm e, após a solidificação, procedeu-se ao semeio de 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de células de *Cmm*, previamente incubadas em meio líquido, a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. As placas semeadas com os isolados foram, então, mantidas em incubação a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Após esse período, as células bacterianas foram

ressuspendidas em solução salina (NaCl a 0,85%) estéril e as suspensões tiveram sua concentração ajustada ao espectrofotômetro para  $OD_{550}=0,1$ , o que corresponde a  $10^8$  UFC/mL, aproximadamente (Romeiro, 2001).

Tabela 1- Isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizados para caracterização morfológica e bioquímica e avaliação dos meios semi-seletivos.

N <sup>o</sup>	Código	Origem	Instituição
1	UFV-1	Viçosa-MG	UFV/MG
7	Cmm 7	Ceilândia - DF	EMBRAPA-Hortaliças
10	Cmm 10	Brasília - DF	EMBRAPA-Hortaliças
15	UnB 815	INCRA - DF	EMBRAPA-Hortaliças
16	Cmm 16	Brazlândia - DF	EMBRAPA-Hortaliças
19	Cmm 19	Luziânia - GO	EMBRAPA-Hortaliças
23	Cmm 23	Croatá - CE	EMBRAPA-Hortaliças
25	Cmm 25	Morrinhos - GO	EMBRAPA-Hortaliças
26	Cmm 26	Cristalina - DF	EMBRAPA-Hortaliças
29	Cmm 29	Taquara - DF	EMBRAPA-Hortaliças
33	Cmm 33	Lapa - PR	EMBRAPA-Hortaliças
34	Cmm 34	Lapa - PR	EMBRAPA-Hortaliças
35	Cmm 35	Venda Nova - ES	EMBRAPA-Hortaliças
37	Cmm 37	Araucária - PR	EMBRAPA-Hortaliças
38	Cmm 38	Araucária - PR	EMBRAPA-Hortaliças
40	Cmm 40	S. Francisco Paula - RS	EMBRAPA-Hortaliças
41	Cmm 41	Araucária - PR	EMBRAPA-Hortaliças
43	Cmm 43	Alexandre Gusmão - DF	EMBRAPA-Hortaliças
497	IBSBF 497	-	IBSBF-SP
1516	IBSBF 1516	-	IBSBF-SP

### 3.3.2. Inoculação artificial

A fitopatogenicidade dos isolados de *Cmm* utilizados foi comprovada por meio de inoculação artificial em tomateiro, cultivar Santa Clara.

Duas metodologias foram adotadas para inoculação: 1. infiltração da suspensão bacteriana nos espaços intercelulares da folha, com o uso de seringa hipodérmica fina (Klement, 1964) e, 2. introdução de palitos de madeira previamente esterilizados e imersos em suspensão de inóculo, na haste da planta (Romeiro, 2001). A inoculação foi realizada quando as plantas de tomate estavam com três a quatro folhas verdadeiras e posteriormente, todas as plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação, realizando-se observações diárias para acompanhar o aparecimento dos sintomas. O ensaio foi conduzido com três repetições, utilizando-se como testemunha, plantas inoculadas com solução salina (NaCl a 0,85%).

Após o aparecimento dos sintomas foi realizado o teste de exsudação em gota para confirmar a etiologia bacteriana das lesões.

### **3.3.3. Reisolamento**

A fim de eliminar diferenças de tempo de isolamento e número de repicagens entre os isolados de *Cmm* procedeu-se ao reisolamento dos mesmos utilizando-se o método-padrão de isolamento de fitobactérias (Romeiro, 2001). Colônias típicas de *Cmm* (amarelas, elevadas, lisas, circulares e com bordos regulares) foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio 523 de Kado & Heskett (1970) inclinado e tiveram a sua pureza e a patogenicidade confirmadas.

### **3.4. Preservação dos isolados**

Após a confirmação da pureza e da patogenicidade dos isolados, estes foram preservados por dois métodos, a fim de garantir a manutenção de sua viabilidade no decorrer dos trabalhos.

#### **3.4.1. Repicagem tubo a tubo**

Todos os isolados foram mantidos por repicagens periódicas, com intervalos de dois meses, em meio YDC (Yeast extract - dextrose - CaCO<sub>3</sub>), composto de extrato de levedura (10g), dextrose (glucose) (20g), carbonato de cálcio (20g), ágar (17g) e H<sub>2</sub>O destilada (1000mL) (Király *et al.*, 1970; Tuite., 1969).

#### **3.4.2. Preservação sob óleo mineral**

Os isolados de *Cmm* foram cultivados em tubos contendo meio YDC, a 28±1°C, por 48 horas. Terminado o período de incubação, procedeu-se à adição de óleo mineral Nujol® (Ind. Quim. E Farm. Shering S. A.). O óleo foi previamente autoclavado a 121°C e 15lb de pressão, por 15 minutos, e previamente à sua adição aos tubos, permaneceu em estufa a 60°C, por 24 horas, para remoção da água acumulada no Erlenmayer onde o óleo foi autoclavado e mantido. O óleo foi adicionado assepticamente a cada tubo, até 1-2 cm de altura acima do meio. Os tubos contendo os isolados semeados e cobertos com óleo foram mantidos em geladeira a 4°C. As culturas, quando necessárias, foram recuperadas pela transferência de uma pequena porção da suspensão para meio 523 líquido (Silva, 2002).

### **3.5. Origem das mudas e amostras de sementes**

Para a realização dos experimentos executados neste trabalho, foram utilizadas mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cultivar Catuaí, provenientes do Viveiro de Café do DFP/UFV e sementes de maravilha (*Mirabilis jalapa* L.), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola e de tomate (*Solanum lycopersicon*) das cultivares Santa Clara, Santa Cruz Kada, Super Marmande e San Marzano, adquiridas de empresas comercializadoras de sementes.

### **3.6. Reação de hipersensibilidade**

Para a realização do teste de reação de hipersensibilidade, foram utilizadas diferentes plantas-teste, não-hospedeiras de *Cmm*, como: maravilha, feijoeiro e cafeeiro. O ensaio foi conduzido com quatro repetições. O inóculo utilizado foi preparado conforme descrito anteriormente (item 3.3.1.). A inoculação foi efetuada nas plantas de feijão, maravilha e café, quando estas apresentavam um estágio de desenvolvimento de 14 dias, dois meses e seis meses de idade, respectivamente. A metodologia adotada para a inoculação das plantas foi o de injeção, introduzindo-se as células bacterianas diretamente no interior do tecido foliar da planta com auxílio de seringa hipodérmica estéril (Romeiro, 2001) e como testemunha, plantas foram infiltradas com solução salina (NaCl a 0,85%). Posteriormente, todas as plantas foram mantidas em casa de vegetação, realizando-se a avaliação dos sintomas 24 horas após a inoculação.

### **3.7. Crescimento dos isolados de *Cmm* nos meios semi-seletivos e determinação do índice de repressão (IR).**

Foram testados seis meios semi-seletivos (MB1M, mSCM, D<sub>2</sub>ANX, CNS, KBT e SCM) desenvolvidos para a detecção de *Cmm*, conforme apresentado no Apêndice. Os meios semi-seletivos foram preparados conforme especificado nos trabalhos originais de elaboração dos mesmos. O meio 523 (Kado & Heskett, 1970) foi adotado como meio padrão para cultivo dos isolados.

O índice de repressão (IR) foi determinado, de forma a verificar a inibição de crescimento do organismo alvo para cada meio semi-seletivo. Os 20 isolados de *Cmm* foram cultivados em meio 523 a 28±1°C por 48 horas. Após o período de incubação, células do organismo teste foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) estéril,

acrescida de 0,5% de Tween 80. A suspensão foi então diluída em série (1:100), também em solução salina estéril contendo 0,5% de Tween 80. Posteriormente, semeou-se 10 µl de cada diluição, utilizando-se uma alça calibrada em cada meio semi-seletivo, bem como no meio 523. As placas contendo os isolados foram mantidas em incubadora a 28±1°C, de 2 a 10 dias. O período de incubação variou conforme o meio e o isolado. Após o período de incubação, realizou-se a contagem do número de colônias de *Cmm* em cada meio. Foram utilizadas quatro repetições de cada uma das diluições em todos os meios semi-seletivos e no meio 523 (padrão). Outro ensaio foi realizado seguindo os mesmos procedimentos, porém, sem a adição dos compostos antimicrobianos nos meios semi-seletivos, a fim de verificar se o meio básico proporcionava o crescimento dos isolados de *Cmm*.

Após a quantificação, determinou-se o índice de repressão (IR), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$IR = \frac{\text{média UFC*/ ml meio 523} - \text{média UFC/ ml meio semi-seletivo}}{\text{média UFC/ ml meio 523}} \times 100$$

\*UFC = número de unidades formadoras de colônias.

### **3.7.1. Determinação do índice de supressão (IS) dos meios semi-seletivos**

Foi determinado, também, o índice de supressão (IS) para cada meio semi-seletivo, de forma a se verificar a inibição de crescimento de organismos contaminantes. Para isto, foram utilizadas três amostras de sementes comerciais de tomate cv. Santa Cruz Kada, cv. Super Marmande e cv. San Marzano e duas amostras de folhas frescas de tomateiro, provindas de casa de vegetação e campo. Foi retirada uma sub-amostra de 2.000 sementes de cada lote e 5 g de cada amostra de folhas, que foram colocadas em Erlenmeyers contendo 50mL e 100mL de PBS (tampão fosfato 0,1M, Ph 7,2, em NaCl 0,85%) estéril, respectivamente, e mantidas à 4°C por 3 horas. Após o período de incubação, as amostras foram colocadas sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. A seguir, procedeu-se à filtração em gaze de algodão para retenção das sementes e impurezas maiores. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 10.000g por 15 minutos. O sedimento resultante para cada amostra foi ressuscitado em 6,0 mL de solução salina 0,85%. Realizou-se uma diluição em série (1:100), também em solução salina estéril contendo 0,5% de Tween 80. Posteriormente, semeou-se 10 µl de

cada diluição, utilizando-se uma alça calibrada, em cada meio semi-seletivo, bem como no meio 523. As placas contendo os isolados foram mantidas em incubadora a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 48-72 horas. Após esse período, avaliou-se o crescimento da microbiota associada às sementes e folhas de tomateiro. O ensaio foi realizado com quatro repetições. O índice de supressão foi determinado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{IS} = \frac{\text{média UFC/ ml meio 523} - \text{média UFC/ ml meio semi-seletivo}}{\text{média UFC/ ml meio 523}} \times 100$$

### **3.8. Descrição das características morfológicas das colônias em diferentes meios**

#### **3.8.1. Meio YDC**

Os isolados de *Cmm* foram cultivados em tubos contendo o meio YDC, inclinado, a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas, para a avaliação da coloração de cada isolado.

#### **3.8.2. Meios semi-seletivos e 523**

Todos os isolados de *Cmm* foram cultivados em placas contendo meios semi-seletivos (MB1M, D<sub>2</sub>ANX e KBT) e no meio padrão (523) a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas. Para a caracterização morfológica das colônias, foram observadas as seguintes características: cor, tamanho, forma, textura, superfície, elevação e margens. O ensaio foi conduzido com quatro repetições.

### **3.9. Teste diagnósticos**

Diversos testes foram realizados a fim de identificar e diferenciar *Cmm* de outras bactérias. Para a realização dos testes diagnósticos, os isolados foram multiplicados em meio 523 líquido, a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Todos os ensaios foram conduzidos com três repetições.

#### **3.9.1. Reação de Gram com base na solubilidade em KOH**

Com o auxílio de uma alça de repicagem, transferiu-se uma pequena quantidade de células bacterianas para uma lâmina de microscopia, contendo uma gota de solução



de KOH a 2%. O material foi homogeneizado por 10 segundos. A bactéria foi considerada gram-positiva quando a preparação não se tornou viscosa (Ryu, 1940).

### **3.9.2. Produção de catalase**

A partir de culturas de *Cmm*, em meio 523, sólido, retirou-se uma pequena quantidade de células, que foram misturadas a peróxido de hidrogênio a 3%. A produção de bolhas de gás na preparação é considerada como resultado positivo, indicando a produção da enzima catalase pelo isolado testado (Schaad *et al.*, 2001).

### **3.9.3. Produção de oxidase**

Neste teste, os isolados foram cultivados em meio 523, sólido, a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Após este período, com o auxílio de uma pinça, tiras de papel filtro estéreis foram imersas em uma solução de tetrametil parafenilendiamino dihidroclorato a 1%. Posteriormente, coletou-se uma pequena quantidade de células da bactéria com auxílio de um bastão de vidro, o qual foi friccionado no papel tratado. No caso de resultado positivo para o teste, o papel apresenta cor roxa, num intervalo de tempo entre 10 segundos. Para resultado negativo, após 60 segundos, o papel continua na cor branca (Schaad *et al.*, 2001).

### **3.9.4. Produção de urease**

Preparou-se meio líquido com os seguintes ingredientes:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,5g),  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (0,5g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2g), NaCl (5g), extrato de levedura (1g), vermelho de cresol (16mg) e  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (800mL), posteriormente adicionou-se 4mL deste meio em tubos de ensaio, sendo em seguida submetido a autoclavagem a  $121^{\circ}\text{C}$  e 15lb de pressão, por 20 minutos. Após a autoclavagem, adicionaram-se 1 mL de uma solução de uréia (20g de uréia em 180mL de água destilada), previamente esterilizada por filtração. Os isolados de *Cmm* foram repicados para os tubos, e em seguida incubados a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , até o crescimento da bactéria. As bactérias capazes de produzir urease, provocam aumento do pH, deixando o meio de cultura com coloração rosa, obtendo-se resultado positivo para este teste. Já, para aquelas que não produzem esta enzima, o meio apresenta cor avermelhada, da mesma coloração do tubo controle. Como controle, tubos com o meio, porém sem a solução de uréia, foram mantidos sem a bactéria, nas mesmas condições (Schaad *et al.*, 2001).

### **3.9.5. Formação de levana**

Este teste foi realizado para verificar se a bactéria em estudo ao utilizar a sacarose como fonte de carbono produz a enzima levana sucrose, responsável pela produção de levana, que é uma substância capsular (extracelular). O meio Nutriente ágar com 5% de sacarose foi preparado para a realização do teste, com a seguinte composição: 3g de extrato de levedura, 5g de peptona, 50g de sacarose, 15g de ágar e 1000ml de água destilada. O pH do meio foi ajustado para 7,0, autoclavado e distribuídos em placas de Petri. Após o resfriamento do meio, os isolados de *Cmm* foram repicados para as placas e incubados a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , até o crescimento da bactéria. Para resultado positivo, as bactérias capazes de produzir a enzima apresentam-se brancas, convexas e mucóides, indicando a formação de levana (Schaad *et al.*, 2001).

### **3.9.6. Hidrólise de amido**

O meio utilizado para este teste foi o EPGA, com a seguinte composição: 3g de extrato de levedura, 7g de peptona, 15g de amido, 15g de glicose, 20g de ágar e 1000ml de água destilada. Após a autoclavagem, o meio foi vertido em placas de Petri. Após o resfriamento do meio, os isolados de *Cmm* foram repicados para as placas e incubados a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , até o crescimento da bactéria. Foi preparada uma solução de lugol, diluindo-se 0,8g de iodo e 2g de iodeto de potássio em 100mL de água destilada. Após o crescimento das colônias, colocou-se o lugol sobre o meio para verificar se houve ou não hidrólise do amido. Uma descoloração em torno das colônias que se contrasta com o restante do meio, apresentando coloração roxo-escura é considerado como resultado positivo, indicando que a bactéria produz a enzima amilase, sendo capaz de digerir o amido (Fahy & Hayward, 1983).

### **3.9.7. Hidrólise de esculina**

Para este teste, preparou-se o seguinte meio: 0,5g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0,5g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5g  $\text{NaCl}$ , 5g de extrato de levedura, 0,5g de citrato de ferro e amônio, 1g de esculina em 1000mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. O pH foi ajustado para 6,8 e adicionou-se 5mL do meio em tubos de ensaio, que em seguida foram autoclavados. Os isolados foram repicados para os tubos com auxílio de uma alça de platina, e incubados a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , por até 28 dias, para verificar se a bactéria tinha capacidade de hidrolisar a esculina. Como controle, tubos sem a bactéria foram mantidos na mesma condição. Para

resultado positivo, uma mudança na coloração do meio, para uma coloração marrom-escuro ou preta é observada no tubo em que ocorrer a hidrólise da esculina. Não ocorrendo mudança na coloração do meio, o resultado é considerado negativo, indicando que a esculina não foi hidrolisada (Schaad, 1988).

### **3.9.8. Produção de H<sub>2</sub>S**

Os isolados foram repicados para tubos com meio líquido contendo 5mL do meio K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5g), NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5g), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2g), NaCl (5g), extrato de levedura (5g), peptona (0,5g) e H<sub>2</sub>O destilada (1000mL). Posteriormente, tiras de papel filtro previamente esterilizadas e umedecidas em uma solução de acetato de chumbo a 10%, foram colocadas nos tubos 5mm acima do meio, presas ao tampão de algodão que os vedava. Os tubos foram mantidos em incubadora por até 14 dias, a 28±1°C. A presença de H<sub>2</sub>S é indicada pelo escurecimento do papel (Schaad *et al.*, 2001).

### **3.9.9. Liquefação de Gelatina**

Adicionou-se 120g de gelatina em 1000mL de água destilada e o pH foi ajustado para 7.0. Posteriormente, 10mL do meio de gelatina foi adicionado a cada tubos de ensaio, que foram autoclavados e imediatamente resfriados. Com uma alça de repicagem, uma pequena quantidade de células bacterianas de cada isolado, foi repicada para o centro do tubo, perfurando-se levemente com a alça. Em seguida, os tubos foram incubados a 28±1°C, onde foram mantidos por até 21 dias. Tubos sem a bactéria também foram mantidos sob as mesmas condições, como forma de controle. Para a avaliação, os tubos foram previamente mantidos em geladeira a 5°C por cerca de 30 minutos. Os tubos contendo isolados capazes de digerir a gelatina apresentaram o meio liquefeito após o período em refrigeração, sendo considerado como resultado positivo (Schaad *et al.*, 2001).

### **3.9.10. Produção de ácidos a partir de diferentes fontes de carbono**

Neste trabalho, foram testados adonitol, arabinose, dextrose, dulcitol, D-sorbitol, D-xilose, galactose, glicerol, inulina, lactose, levulose, maltose, manitol, manose, melobiose, rafinose, ramnose, sacarose, sorbitol e trealose, para verificar quais, seriam utilizadas como fonte de carbono pelos isolados de *Cmm*. Para isto, foi preparado o meio C (Dye, 1968) líquido, contendo a seguinte composição: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5g),

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (0,5g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2g), NaCl (5g), extrato de levedura (1g), e  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (1000mL). Foi preparada uma solução de azul de bromocresol a 1,5% em etanol, da qual 0,7mL foi adicionada aos 1000mL do meio de Dye e em seguida ajustou-se o pH do meio para 6,8. Após isto, adicionou-se 4,5mL do meio em cada tubo de ensaio, que em seguida foram autoclavados. Após o resfriamento do meio, em condições assépticas, 0,5mL de cada fonte que foram previamente esterilizadas por tindalização em autoclave com a válvula aberta por 1hora, durante três dias consecutivos, foi adicionado aos tubos, com auxílio de uma micropipeta. Posteriormente, procedeu-se à repicagem de cada isolado de *Cmm* para os tubos. Como controle, tubos sem a bactéria, contendo cada tipo de açúcar foram mantidas sob as mesmas condições. A avaliação foi realizada até 28 dias após a incubação, a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . A coloração amarela do meio indica produção de ácidos e a ausência de mudança na coloração do meio caracteriza um resultado negativo quanto à capacidade do isolado produzir ácidos a partir da fonte de carbono testada (Schaad *et al.*, 2001).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

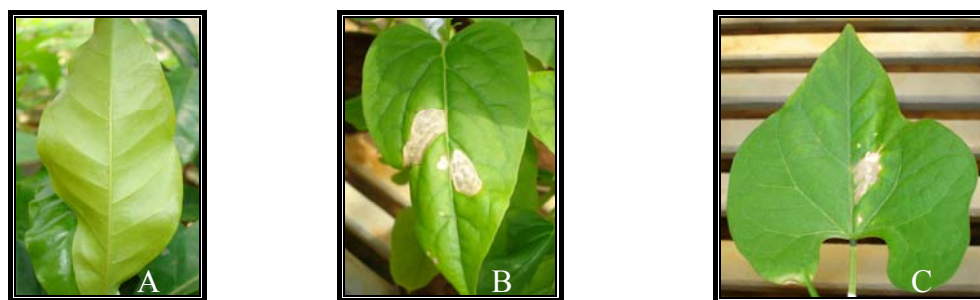
### 4.1. Comprovação da fitopatogenicidade dos isolados

A fitopatogenicidade de todos os isolados em estudo foi confirmada pela ocorrência de sintomas do cancro bacteriano, bem como pela observação da exsudação bacteriana nos tecidos doentes, ao microscópio. Quando as plantas foram inoculadas pelo método de injeção, observou-se um amarelecimento nos tecidos foliares, mas quando inoculadas pelo método do palito ocorreu o escurecimento dos vasos, resultando em murchamento das folhas e dos folíolos. Das duas metodologias utilizadas para inoculação, a primeira foi a que resultou em sintomas mais rápidos, pois dez dias após a inoculação os mesmos já eram visíveis. Enquanto que nas plantas inoculadas pelo segundo método, os sintomas só foram observados 21 dias após a inoculação. Desta forma, o reisolamento foi feito a partir dos tecidos de plantas inoculadas pelo método de injeção da suspensão bacteriana nos tecidos foliares.

### 4.2. Reação de hipersensibilidade

O café não apresentou reação de hipersensibilidade a qualquer dos isolados de *Cmm*, não se mostrando, portanto, como boa planta-teste (Figura 1A). Entretanto, todos os isolados induziram, em menos de 24 horas, lesões necróticas, escuras, típicas da reação de hipersensibilidade, quando infiltradas em folhas de maravilha e feijoeiro (Figuras 1B e 1C). De acordo com Romeiro (2001), embora alguns autores afirmem, de forma mais ou menos abrangente, que a reação de hipersensibilidade ocorre desde que a associação bactéria-planta seja do tipo incompatível, tem-se verificado que há muitas exceções. Este fato tem sido observado por diversos autores, ou seja, algumas fitobactérias foram capazes de incitar HR em algumas, mas não em todas as plantas não-hospedeiras testadas (Romeiro *et al.*, 1988; Gomide, 1989; Romeiro & Lima Junior, 1998; Romeiro *et al.*, 1993; Romeiro *et al.*, 1994).

A habilidade de bactérias fitopatogênicas em induzir HR em plantas não-hospedeiras é uma ferramenta útil para se testar de maneira rápida a patogenicidade de isolados bacterianos. Diversos trabalhos citam o uso de maravilha como planta teste para indução de HR por *Cmm*. Gitaitis (1990) testou isolados de *Cmm* e de outras bactérias que apresentavam similaridade morfológica, na indução de HR em plantas de maravilha, e verificou que apenas *Cmm* foi capaz de induzir HR nessas plantas. Umesha (2006) também utilizou maravilha na indução de HR e obteve resultado positivo para todos os isolados de *Cmm* testados. Desta forma, a utilização de plantas de maravilha em testes de HR é uma ferramenta a mais na detecção, bem como na diferenciação de *Cmm* de outras bactérias que apresentam morfologia semelhante, com a vantagem de ser um teste cuja resposta é rápida. Plantas de feijoeiro também são úteis, já que estas também responderam de maneira hipersensível, podendo assim, fazer parte de uma gama de plantas indicadoras no teste de HR. Isto é particularmente útil para a confirmação da identidade de isolados de *Cmm* obtidos em meios semi-seletivos, quando da detecção deste patógeno em sementes ou em outros materiais para plantio.



**Figura 1.** Plantas não-hospedeiras de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* inoculadas para indução da reação de hipersensibilidade (HR). **A.** Folha de café - HR negativa; **B.** Folha de maravilha - HR positiva; **C.** Folha de feijão - HR positiva.

#### **4.3. Crescimento dos isolados de *Cmm* e determinação do índice de repressão (IR) dos meios semi-seletivos**

Todos os meios quando testados sem a adição de substâncias antimicrobianas suportaram ao crescimento dos isolados. Quando foram acrescentadas as substâncias antimicrobianas, de suas composições originais, o crescimento dos isolados foi afetado (Tabela 2). Os meios SCM, mSCM e CNS não permitiram o crescimento de qualquer dos isolados. Os isolados 15 e 1 não cresceram nos meios MB1M e KBT, respectivamente, enquanto todos os outros isolados cresceram. Já no meio D<sub>2</sub>ANX, houve crescimento de todos os isolados testados. Nos casos em que não houve o

crescimento dos isolados, as diferentes substâncias antimicrobianas presentes no meio, ou mesmo o sinergismo entre elas, parece ter sido a razão para a inibição do crescimento.

Tabela 2- Número de isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em 20, que cresceram nos meios semi-seletivos sem a adição de substâncias microbianas.

Meios	MB1M	SCM	mSCM	D <sub>2</sub> ANX	KBT	CNS
<b>Sem a adição de substâncias antimicrobianas</b>	20	20	20	20	20	20
<b>Com a adição de substâncias antimicrobianas<sup>1</sup></b>	19	0	0	20	19	0

<sup>1</sup>substâncias antimicrobianas presentes na composição original de cada meio.

Nos meios que permitiram o crescimento dos isolados, foi feita a quantificação do número de colônias de *Cmm* em cada meio, ou seja, para determinar o IR para cada meio semi-seletivo testado, em cada isolado (Tabela 3). As diluições utilizadas para os cálculos de IR nos meios básico e semi-seletivos variaram de acordo com o isolado e com o meio. Os resultados de IR mostraram que há uma variação muito grande dos meios para um mesmo isolado e entre os isolados. Os meios SCM, mSCM e CNS proporcionaram 100% de IR para todos os isolados testados. Estes dados confirmaram resultados de Valarini (1995) que verificou que alguns isolados de *Cmm* provenientes do Brasil não cresceram nos meio SCM e mSCM. Entretanto, diversos trabalhos, utilizando os mesmos meios, demonstraram alta eficiência na recuperação do patógeno. Fatmi & Schaad (1988) elaboraram o meio SCM e testaram 34 isolados de *Cmm*, dos quais, apenas três isolados não foram capazes de crescer no meio, devido ao ácido nalidíxico (30mg/L), ácido bórico (1.5g/L) e ao telurito de potássio (10mg/L). No entanto, os mesmos autores testaram o meio CNS, o qual inibiu o crescimento de vários isolados, devido este meio conter 10g/L de LiCl. Hadas *et al.* (2005), testando os meios CNS, D<sub>2</sub>ANX e mSCM, com 23 isolados de *Cmm*, verificaram que nove isolados atingiram um IR= 100% no meio CNS, um isolado no meio D<sub>2</sub>ANX e um no meio mSCM. O fato de 20 isolados de *Cmm* testados no presente trabalho não crescerem nos meios SCM, mSCM e CNS, mostra a existência de variabilidade genética entre os isolados provenientes do Brasil e os de outros países no que se refere à sensibilidade a compostos antimicrobianos. Variações entre isolados, tanto na sensibilidade a uma mesma substância, bem como a diferentes tipos de substâncias antimicrobianas, são

conhecidas (Baker, 1970; Lacaz, 1975). Verniere *et al.* (1992), por exemplo, estudaram a sensibilidade/resistência de 65 isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* a 63 diferentes antibióticos e verificaram que os resultados permitiam agrupar os isolados em relação à origem geográfica. Já Wruck (2001) não verificou uma relação entre resistência/sensibilidade a antibióticos e a origem geográfica ou hospedeiro original de diferentes isolados de *X. campestris* pv. *campestris*.

Já os meios MB1M, D<sub>2</sub>ANX e KBT atingiram 42.16, 56.59 e 67.89% respectivamente, dos valores de IR médio de todos os isolados testados (Tabela 3). O meio MB1M apresentou o melhor desempenho para promover o crescimento de *Cmm*, pois o IR desse meio foi menor do que os demais. No entanto, houve inibição total do crescimento do isolado 15. O mesmo meio foi utilizado em trabalho realizado por Valarini (1995), o qual verificou que houve inibição do crescimento de um dos quatro isolados de *Cmm* testados. Além disso, o meio KBT também inibiu o crescimento de um outro isolado (tabela 3), o qual foi capaz de crescer no meio MB1M e D<sub>2</sub>ANX, apresentando 39.55 e 99.94% do IR, respectivamente. Há que se considerar que os isolados de *Cmm* testados são provenientes de diferentes regiões geográficas e que, portanto, alguma variabilidade ocorra entre eles. Silva (2002) estudou o comportamento de 48 isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, provenientes de diferentes regiões do Brasil, em relação a 43 compostos antimicrobianos testados. Alguns apresentaram alta sensibilidade, enquanto outros se mostraram insensíveis a uma mesma substância.

Desta forma, é indicado o uso de pelo menos dois meios quando se visa a detecção de *Cmm*, podendo ser utilizado o meio D<sub>2</sub>ANX, o qual foi eficiente em permitir o crescimento de todos os isolados testados, com o meio MB1M, que apresentou o menor IR, ou mesmo com o meio KBT. No entanto, o meio KBT alcançou valores de IR > 77% em mais da metade dos isolados testados. Segundo Oliveira (1995), a ocorrência de um alto IR não invalida a utilização de um meio, pois a detecção do patógeno ainda é possível. Considerando-se um valor médio de IR = 50%, os meios MB1M, D<sub>2</sub>ANX e KBT possibilitaram 60, 35 e 25% dos resultados abaixo desse valor médio, respectivamente.

Em todos os meios semi-seletivos, o crescimento dos isolados foram retardados em comparação ao meio padrão (Tabela 3). Isto, provavelmente, se deve à composição



do meio e à presença dos compostos antimicrobianos ou mesmo suas concentrações no meio.

Tabela 3- Índice de repressão (%) para 20 isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em seis meios semi-seletivos. Os valores representam o percentual de repressão no crescimento do isolado quando comparado ao meio 523.

Isolados	Meio						
	MB1M	SCM	mSCM	D <sub>2</sub> ANX	KBT	CNS	523
1	39,55	100	100	29,81	100	100	0
7	43,68	100	100	56,91	52,1	100	0
10	52,57	100	100	24,32	77,31	100	0
15	100	100	100	99,94	98,53	100	0
16	9,09	100	100	64,5	15,9	100	0
19	20,89	100	100	6,79	17,91	100	0
23	48,21	100	100	1,63	84,12	100	0
25	11,81	100	100	36,84	80,51	100	0
26	40,4	100	100	6,32	98,11	100	0
29	83,15	100	100	48,14	99,55	100	0
33	99,89	100	100	78,23	99,98	100	0
34	69,04	100	100	53,58	91,43	100	0
35	12,68	100	100	82,36	99,52	100	0
37	64,85	100	100	88,43	84,42	100	0
38	8,16	100	100	55,2	42,85	100	0
40	99,43	100	100	92,4	86,82	100	0
41	14,81	100	100	99,1	18,51	100	0
43	16,95	100	100	51,61	60,89	100	0
497	54,35	100	100	63,97	52,3	100	0
1516	11,64	100	100	91,8	29,26	100	0
Média do IR (%)	42,16	100	100	56,59	67,89	100	0
Dias p/ formação de colônias	3 a 10	-	-	2 a 7	3 a 9	-	2 a 3

#### 4.4. Determinação do índice de supressão (IS) dos meios semi-seletivos

Os índices de supressão calculados para os meios semi-seletivos encontram-se na tabela 4. Os meios semi-seletivos não inibiram totalmente o crescimento da microbiota associada às sementes e folhas de tomateiro das cinco amostras testadas, tendo sido a amostra 1 proveniente de uma mistura de lotes de sementes de tomate do cultivar ‘Santa

Cruz Kada', a amostra 2 do 'Super Marmande' e a amostra 3 do 'San Marzano'. Já as amostras 4 e 5, são provenientes de folhas de tomateiro, coletadas em campo e em casa de vegetação, dos cultivares 'Cereja' e 'Santa Clara', respectivamente. Não foi observado crescimento fúngico, enquanto o crescimento de bactérias foi bastante reduzido. Todos os meios semi-seletivos suprimiram o crescimento de contaminantes quando comparados ao meio básico nas cinco amostras (Tabela 4). O fato de os meios semi-seletivos não terem inibido totalmente o aparecimento de contaminantes era esperado, pois em diversos trabalhos utilizando estes meios, ocorreu crescimento de microrganismos contaminantes (Dhanvantari, 1987; Valarini, 1995; Hadas *et al.*, 2005). Dhanvantari (1987), utilizando o meio KBT para detecção de *Cmm* em sementes de tomate, observou apenas 1% de crescimento de outras bactérias. De acordo com Caflin (1987), é muito difícil desenvolver um meio que restrinja o crescimento de todos os contaminantes da diversa microbiota que usualmente se encontra associada às sementes. Resultados semelhantes foram encontrados com meios semi-seletivos desenvolvidos para a detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em sementes de pepino (Moura, 1992), *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomate (Oliveira, 1995) e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão (Silva, 2002).

A amostra 5 apresentou, de maneira geral, menor crescimento de contaminantes em todos os meios quando comparada com a amostra 4. Isto se deve, provavelmente, à grande exposição das plantas da amostra 4 a organismos contaminantes em relação à amostra 5. As folhas da amostra 4 são de plantas coletadas em campo, enquanto as folhas da amostra 5 são provenientes de casa-de-vegetação. Já em relação às amostras das sementes, a amostra 3 apresentou menor crescimento de contaminantes em todos os meios testados, quando comparada com as amostras 1 e 2. Assim, a microbiota associada a cada lote de sementes ou amostras de tecidos vegetais é característica e varia em função do local de produção e das condições ambientes. Comparados ao meio padrão, o meio KBT, de maneira geral, foi o que apresentou maior supressividade, em relação aos outros meios, para quase todas as amostras. Este meio apresentou, também, uma alta repressividade. Provavelmente, os mesmos fatores que levaram a esta alta repressão dos isolados de *Cmm* influenciaram o crescimento dos contaminantes. Os meios MB1M e D<sub>2</sub>ANX, foram os que apresentaram melhores resultados quanto à repressividade do crescimento de *Cmm*. Entretanto, o mesmo não foi observado para a supressividade, pois estes meios apresentaram menores IS quando comparados ao meio

padrão e ao meio KBT. Apesar de terem permitido o crescimento do patógeno alvo, permitiram também o crescimento de contaminantes, embora de forma bem reduzida.

Tabela 4- Índice de supressão (%) de contaminantes em amostras de lotes de sementes e folhas de tomateiro em meios semi-seletivos, em relação ao crescimento de microrganismos contaminantes no meio 523.

Meios	Índice de Supressão (%)				
	*Amostra 1	*Amostra 2	*Amostra 3	*Amostra 4	*Amostra 5
<b>MBIM</b>	38,88	83,33	80,00	91,92	99,92
<b>D2ANX</b>	100	33,33	80,00	80,12	99,66
<b>KBT</b>	88,88	100	100	94,4	99,38

\*1 sementes de tomate do cultivar ‘Santa Cruz Kada’

\*2 sementes de tomate do cultivar ‘Super Marmande’

\*3 sementes de tomate do cultivar ‘San Marzano’

\*4 folhas retiradas de plantas de tomate do cultivar ‘cereja’, cultivadas em campo

\*5 folhas retiradas de plantas de tomate do cultivar ‘Santa Clara’ cultivadas em casa de vegetação

#### 4.5. Descrição das características morfológicas das colônias em diferentes meios

##### 4.5.1. Meio YDC

Neste meio, só foi avaliada a coloração das colônias, que se apresentaram amarelas para todos os isolados em meio YDC, quando incubadas a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 48-72 horas. Este resultado era esperado, conforme descrito por Schaad *et al.* (2001) e Hadas *et al.* (2005).

##### 4.5.2. Meios semi-seletivos e meio 523

Como não houve crescimento dos isolados nos meios SCM, mSCM e CNS, não foi possível fazer a caracterização da morfologia das colônias nos mesmos. Logo, os meios utilizados para a caracterização morfológica foram os meios 523 (padrão), MB1M, D<sub>2</sub>ANX e KBT. Houve variação na coloração e tamanho das colônias para os mesmos isolados e entre isolados, nos quatro meios testados. No meio 523 (Tabela 5), as colônias apresentaram três tonalidades de cor amarela: amarelo-claro, amarelo e amarelo intenso e em todos os isolados, as colônias apresentaram forma circular, textura lisa, superfície elevada e bordos regulares, ou seja, bordos inteiros (Figuras 2-A e 2-B). As colônias variaram de tamanho, entre 1,11 a 1,99mm, com uma média de 1,62mm. Para a formação das colônias foram necessários de dois a três dias.

Tabela 5 - Características morfológicas das colônias de isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* observadas no meio 523

Morfologia das colônias	Isolados de <i>Cmm</i>																			
	1	7	10	15	16	19	23	25	26	29	33	34	35	37	38	40	41	43	497	1516
<b>Pigmentação</b> <sup>I</sup>	a.c	a.i	a.i	a.	a.i	a.i	a.i	a.i	a.i	a.i	a.	a.i	a.i	a.c	a.	a.	a.	a.i	a.i	a.i
<b>Forma</b> <sup>II</sup>	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.
<b>Textura</b> <sup>III</sup>	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
<b>Superfície</b> <sup>IV</sup>	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.
<b>Bordos</b> <sup>V</sup>	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.
<b>Tamanho (mm)</b> <sup>VI</sup>	1,90	1,65	1,53	1,97	1,53	1,55	1,50	1,11	1,65	1,58	1,33	1,26	1,94	1,99	1,94	1,45	1,56	1,91	1,51	1,70
<b>Dias para formação das colônias</b> <sup>VII</sup>	3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

<sup>I</sup> a.c, colônias com coloração amarelo clara; a., colônias amarelas; a.i., amarelo intenso.

<sup>II</sup> cir., colônias com formato circular.

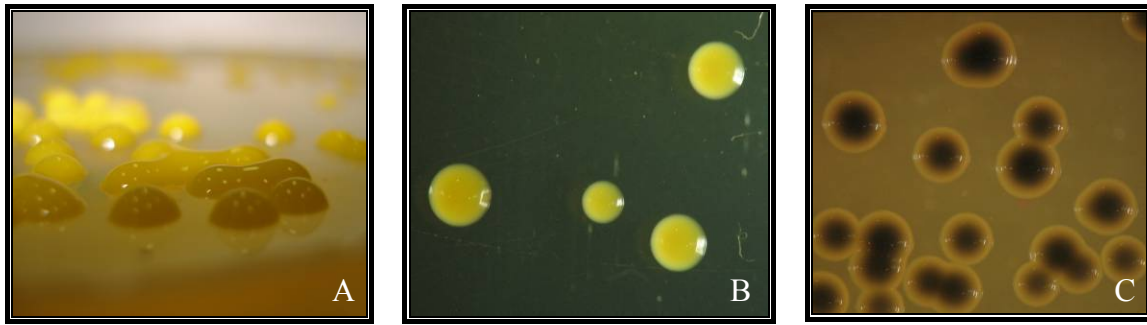
<sup>III</sup> lisa, colônias com textura lisa.

<sup>IV</sup> elev., colônias que apresentaram superfície elevada.

<sup>V</sup> reg. colônias que apresentaram bordos regulares.

<sup>VI</sup> média do tamanho em mm de quatro colônias em quatro repetições

<sup>VII</sup> número de dias para a formação das colônias.



**Figura 2.** Morfologia de colônias de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* observada com lente macro (A) e ao microscópio estereoscópico, em aumento de 20x (B e C). A e B - meio 523; C - meio MB1M.

Nos meios MB1M, D<sub>2</sub>ANX e KBT, as características da forma, textura, superfície e bordos, não variaram das observadas no meio 523. Entretanto, nos meios MB1M (Figura 2-C) e KBT, houve alteração na coloração das colônias devido a presença de telurito de potássio na composição do meio (Apêndice). Antoniou *et al.* (1995), utilizando o meio semi-seletivo SMC, para avaliar a existência de células viáveis de *Cmm* após a solarização do solo, observaram uma coloração caracteristicamente preta das colônias, diferindo da coloração nos meio convencionais de cultivo. O mecanismo pelo qual o telurito de potássio altera a coloração de colônias bacterianas é ainda controverso. Mougél *et al.* (2001) avaliaram o desenvolvimento de novos meios com telurito de potássio, modificados para análise direta de populações dos Biovares 1 e 2 de *Agrobacterium* do solo. A bactéria cresceu satisfatoriamente e apresentou a coloração preta. Segundo o autor, a típica cor preta ocorre devido ao acúmulo intracelular de cristais de telúrio metálico. Entretanto, as demais características das colônias foram mantidas. Sant'ana & Azeredo (2005), utilizando o meio ABP para isolamento de *Staphylococcus aureus*, observaram mudança da coloração das colônias, produzindo colônias pretas e atribuíram isto à redução do telurito de potássio à telureto de potássio. Nos meios MB1M e KBT, os quais contêm telurito de potássio em suas composições, as colônias apresentaram-se cinzas com centro preto, apenas cinza e cinza claro. Quando as colônias estavam maiores, um halo cinza-amarelado era observado em volta das mesmas.

No meio MB1M (Tabela 6), foram observadas colônias apresentando tamanho, entre 0,40 a 1,45mm, com uma média de 0,98mm e foram necessários de três a dez dias para a sua formação. Já no meio KBT (Tabela 7), o tamanho das colônias variou de 0,74 a 1,39mm, com uma média de 1,12mm, sendo necessários três a nove dias para que fossem formadas. Quando o mesmo meio foi utilizado por Dhanvantari (1987), as colônias variaram de 1,00 a 1,5mm, e foram necessários seis dias para a sua formação.

Tabela 6 - Características morfológicas das colônias de isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* observadas no meio MBIM

Morfologia das colônias	Isolados de <i>Cmm</i>																			
	1	7	10	15	16	19	23	25	26	29	33	34	35	37	38	40	41	43	497	1516
<b>Pigmentação</b> <sup>I</sup>	c.e	c.e	c.e	-	c.	c.e	c.e	c.e	c.	c.e	c.c	c.e	c.	c.e	c.e	c.c	c.e	c.e	c.	c.e
<b>Forma</b> <sup>II</sup>	cir.	cir.	cir.	-	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.
<b>Textura</b> <sup>III</sup>	lisa	lisa	lisa	-	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
<b>Superfície</b> <sup>IV</sup>	elev.	elev.	elev.	-	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.
<b>Bordos</b> <sup>V</sup>	reg.	reg.	reg.	-	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.
<b>Tamanho (mm)</b> <sup>VI</sup>	1,45	1,19	1,06	-	0,40	0,76	0,91	0,81	1,00	0,95	1,13	1,06	0,65	1,02	1,36	0,91	0,95	1,05	0,96	1,00
<b>Dias para formação das colônias</b> <sup>VII</sup>	4	4	4	-	5	7	9	9	9	7	7	10	5	5	5	3	6	5	5	5

<sup>I</sup> c.e, colônias com coloração cinza com centro preto; c., colônias cinzas; c.c., cinza claro.

<sup>II</sup> cir., colônias com formato circular.

<sup>III</sup> lisa, colônias com textura lisa.

<sup>IV</sup> elev., colônias que apresentaram superfície elevada.

<sup>V</sup> reg. colônias que apresentaram bordos regulares.

<sup>VI</sup> média do tamanho em mm de quatro colônias em quatro repetições

<sup>VII</sup> número de dias para a formação das colônias.

Tabela 7- Características morfológicas das colônias de isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* observadas no meio **KBT**

Morfologia das colônias	Isolados de <i>Cmm</i>																			
	1	7	10	15	16	19	23	25	26	29	33	34	35	37	38	40	41	43	497	1516
<b>Pigmentação</b> <sup>I</sup>	-	c.e	c.e	c.e	c.	c.e	c.	c.e	c.	c.	c.e	c.e	c.	c.e	c.e	c.e	c.e	c.	c.	c.
<b>Forma</b> <sup>II</sup>	-	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.
<b>Textura</b> <sup>III</sup>	-	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
<b>Superfície</b> <sup>IV</sup>	-	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.
<b>Bordos</b> <sup>V</sup>	-	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.
<b>Tamanho (mm)</b> <sup>VI</sup>	-	1,33	1,08	1,20	1,04	1,20	1,10	0,83	1,11	1,01	1,25	1,05	0,74	1,23	1,11	1,16	1,20	1,00	1,25	1,39
<b>Dias para formação das colônias</b> <sup>VII</sup>	-	4	4	9	4	7	7	7	8	6	7	8	6	5	6	3	5	5	4	4

<sup>I</sup> c.e, colônias com coloração cinza e centro preto; c., colônias cinzas; c.c., cinza claro.

<sup>II</sup> cir., colônias com formato circular.

<sup>III</sup> lisa, colônias com textura lisa.

<sup>IV</sup> elev., colônias que apresentaram superfície elevada.

<sup>V</sup> reg. colônias que apresentaram bordos regulares.

<sup>VI</sup> média do tamanho em mm de quatro colônias em quatro repetições

<sup>VII</sup> número de dias para a formação das colônias.

No meio D<sub>2</sub>ANX (Tabela 8), não houve alteração na coloração das colônias, devido a ausência do telurito de potássio na composição do mesmo. Também, não foram observadas diferenças na cor amarela das colônias. Assim, todas as colônias dos isolados foram caracterizadas como amarelas. Os tamanhos das colônias variaram de 0,81 a 1,45mm, com uma média de 1,02mm, sendo necessários de dois a sete dias para a formação das mesmas. Houve redução no tamanho das colônias dos isolados em todos os meios semi-seletivos testados. Isto, provavelmente, se deve a composição dos meios, aliado à presença de substâncias antimicrobianas nos mesmos.

Variações nas características morfológicas de colônias bacterianas são esperadas, em função, principalmente, da idade da cultura e da composição do meio de cultivo (Smimbert & Krieg, 1981; Fahy & Hayward, 1983), bem como da variabilidade natural entre os isolados. Considerando que as culturas tiveram a sua idade fisiológica padronizada, por meio da inoculação e do reisolamento (itens 3.3.2 e 3.3.3 – Material e Métodos), acredita-se que as variações observadas para um mesmo isolado é função da composição dos diferentes meios de cultura. Já, as diferenças observadas entre os 20 isolados de *Cmm* são, provavelmente, decorrentes da variabilidade inerente a cada isolado. Eichenlaub *et al.* (2006) observam que nas subespécies de *Clavibacter michiganensis*, caracteres fenotípicos tais como a pigmentação, o crescimento em diferentes meios de cultura ou o uso de diferentes fontes de carbono, é freqüentemente variável, em função do isolado ou do meio de cultura utilizado.



Tabela 8- Características morfológicas das colônias de isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* observadas no meio D<sub>2</sub>ANX

Morfologia das colônias	Isolados de <i>Cmm</i>																			
	1	7	10	15	16	19	23	25	26	29	33	34	35	37	38	40	41	43	497	1516
<b>Pigmentação</b> <sup>I</sup>	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.
<b>Forma</b> <sup>II</sup>	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.	cir.
<b>Textura</b> <sup>III</sup>	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa	lisa
<b>Superfície</b> <sup>IV</sup>	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.	elev.
<b>Bordos</b> <sup>V</sup>	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.	reg.
<b>Tamanho (mm)</b> <sup>VI</sup>	1,45	1,20	1,03	1,03	0,88	0,88	0,98	1,00	1,22	1,03	1,04	0,93	1,00	0,95	1,08	0,93	1,04	0,81	1,04	0,96
<b>Dias para formação das colônias</b> <sup>VII</sup>	4	4	3	7	3	3	2	4	3	4	4	4	5	4	3	4	5	3	4	3

<sup>I</sup> a., colônias com coloração amarela.

<sup>II</sup> cir., colônias com formato circular.

<sup>III</sup> lisa, colônias com textura lisa.

<sup>IV</sup> elev., colônias que apresentaram superfície elevada.

<sup>V</sup> reg. colônias que apresentaram bordos regulares.

<sup>VI</sup> média do tamanho em mm de quatro colônias em quatro repetições

<sup>VII</sup> 3 e 2, número de dias para a formação das colônias.

#### 4.6. Testes diagnósticos

Todos os isolados em estudo foram Gram-positivos, catalase positivos, oxidase negativos, apresentaram cor amarela em meio YDC e hidrolisaram a esculina (Tabela 9). Segundo Schaad *et al.* (2001), estas são características bioquímicas típicas de bactérias do gênero *Clavibacter*. Tais características, juntamente com outras, tais como a patogenicidade em tomateiro, a indução de HR em plantas de maravilha e feijoeiro, as características morfológicas das colônias e a não utilização de sorbitol e inulina como fonte de carbono, permitem afirmar que os isolados em estudo pertencem ao gênero *Clavibacter* e são representantes típicos de *Cmm*.

Comparando-se os resultados obtidos nesse estudo com aqueles relatados em outros trabalhos (Tabelas 9 e 11), observou-se que algumas características de *Cmm* são consistentes e independem da origem do isolado, como: reação de Gram, oxidase, catalase, formação de levana, hidrólise de esculina, urease e a utilização sacarose e não utilização de inulina e sorbitol com fonte de carbono. Tais características podem, portanto, ser consideradas típicas de *Cmm* e possuem alto valor diagnóstico na confirmação da identidade de isolados suspeitos, após a confirmação da patogenicidade. Outras características como liquefação de gelatina, hidrólise de amido e produção de H<sub>2</sub>S mostraram-se variáveis quando confrontadas com os relatos de outros autores, embora não se tenha observado variação entre os 20 isolados estudados.

Tabela 9. Características fenotípicas de isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Testes	Característica observada <sup>I</sup>	Características de <i>Cmm</i> relatadas previamente por:						
		S. Umesha <sup>II</sup>	Wakimoto <i>et al.</i> <sup>II</sup>	*E. F. Smith <sup>II</sup>	*M.K. Bryan <sup>II</sup>	*W. Kotte <sup>II</sup>	Schaad <i>et al.</i> <sup>II</sup>	A. F. Gomide <sup>III</sup>
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	N	N	N	N	-	-
Catalase	+	+	N	N	N	N	+	+
Liquefação de Gelatina	-	W	W	W	W	-	N	N
Hidrólise de Amido	-	W	-	N	N	N	N	N
Formação de Levana	-	-	N	N	N	N	N	N
Hidrólise de Esculina	+	N	N	N	N	N	+	+
Produção de H <sub>2</sub> S	+	+	+	N	-	N	N	N
Urease	-	N	N	N	N	N	-	N

+, resultado positivo; -, resultado negativo; W, resultado fracamente positivo; N, o teste não foi realizado.

<sup>I</sup> Resultado de 20 isolados de *Cmm* obtidos no presente trabalho.

<sup>II</sup> o número de isolados de *Cmm* testados não foi informado.

<sup>III</sup> Resultado de dois isolados de *Cmm*.

\* Resultados de trabalhos citados por Wakimoto *et al.* (1968).

Os resultados referentes à produção de ácido a partir de 20 diferentes fontes de carbono (Tabela 10) foram bastante variáveis. Alguns mostraram consistência nos resultados, como para adonitol, arabinose, inulina, ramnose, sorbitol e D-sorbitol, que não foram utilizados por nenhum dos isolados testados, pois não houve produção de ácidos a partir da fonte contida no meio, apresentando assim, resultado negativo (-), enquanto outros apresentaram resultado positivo (+) para o cultivo em sacarose (Figura 4-A), D-xilose, glicerol e levulose, quando os isolados testados foram capazes de produzir ácido a partir da fonte contida no meio para o qual foram repicados, fazendo a coloração mudar de roxo para amarelo, indicando que estes foram utilizados como fonte de carbono pelos isolados. Alguns resultados indicam haver variabilidade entre os isolados de *Cmm*, pois houve uma variação na produção de ácidos a partir da mesma fonte entre os isolados (Figuras 4-B). Isto foi observado quando foram testados manitol, maltose, melobiose e rafinose, os quais apresentaram três diferentes resultados: 1. positivo (+), observado na figura 4-B.3; 2. negativo (-), como na figura 4-B.1 e 3. fracamente positivo(±) observado na figura 4-B.2. Provavelmente, os isolados que mostraram o resultado fracamente positivo, não produziram ácido em quantidade suficiente para promover a alteração de cor do meio ao utilizar aquelas fontes.

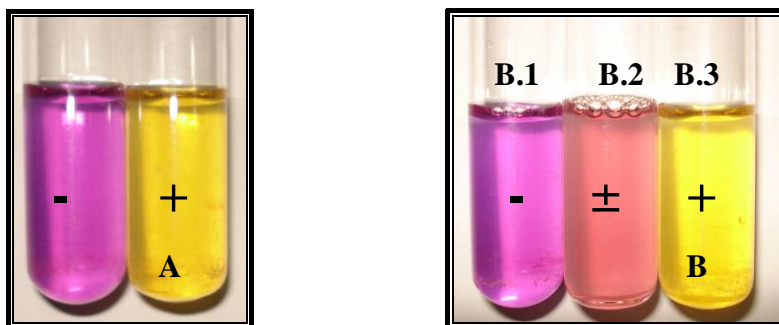


Figura 4. Produção de ácido, a partir de diferentes fontes de carbono, por isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. A-Sacarose; B – Manitol. -, reação negativa, + reação positiva, ±, reação fracamente positiva.

Já para trealose, manose, lactose, galactose, dulcitol e glicose, os resultados variaram de positivos (+) a fracamente positivos (±). Comparando-se os resultados obtidos com aqueles relatados previamente por outros autores (Tabela 11) constatou-se que também há diferenças entre os isolados estudados no Brasil com os de outros países. Porém, alguns resultados foram os mesmos relatados em outros trabalhos, como os de inulina (-), sorbitol (-) e sacarose (+). Desta forma, estes devem ser utilizados em testes de fonte de carbono em protocolos de detecção, como critério auxiliar, para a identificação e a diferenciação de *Cmm* de outras bactérias. Há que se considerar que características morfológicas não podem ser empregadas como único critério para a identificação do gênero ou espécies de fitobactérias, em virtude de outras bactérias apresentarem morfologia semelhante, o que poderá confundir o avaliador. Por isso, outros critérios como propriedades fisiológicas e nutricionais devem ser utilizados na caracterização e identificação.

Tabela 10- Produção de ácido, a partir de diferentes fontes de carbono, por isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, de isolados brasileiros.

Isolados	Produção de ácido a partir de:																			
	Adonitol	Arabinose	Glicose	Dulcitol	D-Xilose	Galactose	Glicerol	Inulina	Lactose	Levulose	Malose	Manitol	Manose	Melbiose	Rafinose	Ramnose	Sacarose	Sorbitol	D-Sorbitol	Trealose
1	-	-	+	+	+	±	+	-	±	+	±	±	+	+	+	+	+	-	-	±
7	-	-	±	+	+	±	+	-	±	+	±	+	+	+	+	-	+	-	-	+
10	-	-	+	±	+	+	+	-	±	+	±	+	+	±	-	-	+	-	-	±
15	-	-	+	+	+	±	+	-	±	+	±	±	±	±	±	-	+	-	-	±
16	-	-	±	+	+	+	+	-	±	+	±	±	+	+	±	-	+	-	-	±
19	-	-	±	±	+	+	+	-	±	+	±	±	+	±	±	-	+	-	-	±
23	-	-	±	+	+	+	+	-	±	+	±	±	+	±	-	-	+	-	-	±
25	-	-	+	+	+	+	+	-	±	+	±	±	+	+	±	-	+	-	-	±
26	-	-	±	+	+	+	+	-	±	+	±	±	+	-	-	-	+	-	-	±
29	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	±
33	-	-	+	±	+	+	+	-	±	+	±	-	+	-	±	-	+	-	-	±
34	-	-	+	+	+	+	+	-	±	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	±
35	-	-	±	±	+	+	+	-	±	+	±	+	+	+	-	-	+	-	-	±
37	-	-	+	+	+	+	+	-	±	+	+	±	+	+	+	-	+	-	-	±
38	-	-	±	+	+	+	+	-	±	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	±
40	-	-	±	±	+	+	+	-	±	+	±	-	+	-	±	-	+	-	-	±
41	-	-	+	+	+	+	+	-	±	+	+	±	+	-	+	-	+	-	-	±
43	-	-	±	±	+	+	+	-	±	+	±	-	+	-	+	-	+	-	-	±
497	-	-	±	+	+	+	+	-	±	+	±	±	+	+	+	-	+	-	-	±
1516	-	-	±	+	+	+	+	-	±	+	+	±	+	+	-	-	+	-	-	±

+, reação positiva; -, reação negativa; ±, reação fracamente positiva.

Tabela 11- Produção de ácido, a partir de diferentes fontes de carbono, por isolados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Produção de ácido a partir de:	Características de <i>Cmm</i> relatadas previamente por:								
	Fatmi & Schaad. <sup>I</sup>			Wakimoto <i>et al.</i> <sup>II</sup>	*E. F. Smith <sup>II</sup>	*M.K. Bryan <sup>II</sup>	*W. Kotte <sup>II</sup>	Schaad <i>et al.</i> <sup>II</sup>	A. F. Gomide <sup>III</sup>
Adonitol	-	-	-	N	N	N	N	N	N
Arabinose				+	N	N	N	N	N
Dulcitol	-	+	+	N	N	N	N	N	N
D-Xilose	-	-	-	N	N	N	N	N	N
Galactose				+	-	+	N	N	N
Glicerol	+	+	+	+	-	±	N	N	N
Glicose				+	+	+	+	N	N
Inulina				-	N	N	N	-	-
Lactose	-	-	-	+	-	±	N	N	N
Levulose	-	-	-	+	+	+	N	N	N
Maltose	-	-	+	+	-	+	+	N	N
Manitol				+	-	±	+	N	N
Manose				+	N	N	N	N	N
Melobiose	+	+	-	N	N	N	N	N	N
Rafinose	+	+	+	-	N	N	N	N	N
Ramnose	+	+	+	-	N	N	N	N	N
Sacarose	+	+	+	+	N	+	+	N	N
Trealose	+	+	+	N	N	N	N	N	N
Sorbitol				-	N	N	N	-	-
D-Sorbitol	+	+	+	N	N	N	N	N	N

+, reação positiva; -, reação negativa; ±, reação fracamente positiva, N, não foi testado.

<sup>I</sup> Resultado de três isolados de *Cmm*.

<sup>II</sup> o número de isolados de *Cmm* testados não foi informado.

<sup>III</sup> Resultado de dois isolados de *Cmm*.

\* Resultados de trabalhos citados por Wakimoto *et al.* (1968)

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Dentre os seis meios semi-seletivos avaliados, os meios SCM, mSCM e CNS reprimiram totalmente o crescimento de todos os isolados brasileiros de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* e, portanto, não são eficazes para testes de detecção. O meio KBT apresentou repressividade relativamente alta para quase todos os isolados e repressão total para apenas um isolado. Porém, apresentou o melhor resultado dentre os meios testados na supressão de organismos contaminantes. Já o meio MB1M apresentou uma baixa repressão de *Cmm*, mas, também, inibiu totalmente o crescimento de um dos isolados em estudo. O meio D<sub>2</sub>ANX apresentou repressividade relativamente baixa e não inibiu o crescimento de nenhum dos isolados. Assim, os meios MB1M e D<sub>2</sub>ANX foram os que apresentaram os melhores resultados, embora a supressão de contaminantes nesses meios não tenha sido a melhor, eles mostraram-se bastante promissores para uso em rotina, numa utilização conjunta. Entretanto, para a validação de um ou mais desses meios é necessário que se proceda à detecção do patógeno em sementes e outros tecidos de tomateiro naturalmente infectados. Estes dados são preocupantes, pois sugerem que a variabilidade do patógeno e a ineficácia da maioria dos meios semi-seletivos levam à resultados falsos negativos em testes de detecção, o que resultará em epidemias inesperadas.

O estudo das características morfológicas das colônias mostrou a ocorrência de variação quanto ao tamanho e cor das mesmas nos diferentes meios. Porém, as características típicas das colônias, como forma circular, superfície elevada, textura lisa e bordos inteiros foram as mesmas para todos os isolados, em todos os meios. Assim, o formato de colônias é uma característica estável para a identificação do patógeno. Observou-se, também, uma grande variação nas características bioquímicas e fisiológicas entre os isolados, bem como em relação a outros isolados relatados na literatura. Algumas características se mostraram consistentes e devem, portanto, ser utilizadas na confirmação da identidade de isolados, após a comprovação da fitopogenicidade.

A indução da reação de hipersensibilidade em plantas de maravilha e de feijoeiro se mostraram bastante promissoras para utilização em rotina, pois todos os isolados de *Cmm* testados induziram HR nestas plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.
- ALMEIDA, I.M.G., MALAVOLTA Jr., V.A. & ROBBS, C.F. Cancro bacteriano do pimentão: infecção sistêmica com transmissão por sementes. **Summa Phytopathologica**, v.22, n.2, p.112-115, 1996.
- ANTONIOU, P.P., TJAMOS, E. C. & PANAGOPOULOS, C. G. Use of soil solarization for controlling bacterial canker of tomato in plastic houses in Greece. **Plant pathology**, v.44, p.438-447, 1995.
- BAYSAL, O., SOYLU, E. M., SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Plant pathology**, v.52, p.747-753, 2003.
- BAKER, F.J. **Manual de técnica bacteriológica**. Zaragoza: Acribia, 1970. 510p.
- BRADBURY, J.F. **Guide to Plant Pathogenic Bacteria**. Ferry Lane. CAB. Mycological International Institute, 1986. p. 332.
- BUROKIENÉ, D. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. **Agronomy Research**, v. 4, p.151-154, 2006.
- CAFLIN, L.E., VIDAVER, A.K., SASSER, M. M. A semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Phytopathology**, v.77, n.5, p.730-734, 1987.
- CHANG, R.J., RIES, S.M., PATAKY, J.K. Reductions in yield of processing tomatoes and incidence of bacterial canker. **Plant Disease**, v.76, p.805-809, 1991a.



- CHANG, R. J.; RIES, S. M.; PATAKY, J. K. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. **Phytopathology**, v.81, n.10, p. 1276-1281. 1991b.
- CHANG, R.J., RIES, S.M., PATAKY, J.K. Local Sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. **Phytopathology**, v.82, p. 553-560, 1992.
- DAVIS, M.J., GILLASPIE, A. G. Jr., VIDAVER, A. K., *et al.* *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *Cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.34, p. 107-117, 1984.
- DAVIS, M.J. Taxonomy of plant-pathogenic coryneform bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 115-140, 1986.
- DHANVANTARI, B. N. Comparasion of selective media for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**, v.77, p.1694, 1987. (Abst.).
- DYE, D.W. **A taxonomic study of the genus *Ewinia*. 1. The "amylovora" group.** New Zealand Journal of Science. v. 11, p. 590-607, 1968.
- DREIER, J., BERMPOHL, A., EICHENLAUB, R. Southern hibridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**, v.85, p.462-468, 1995.
- DREIER, J., MELETZUS, D., EICHENLAUB, R. Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, p. 195-206, 1997.
- DREIER, J. Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on greenhouses-grown tomato in the Western Mediterranean region of Turkey. **Plant Disease**, v.88, p. 1048, 2004.

- EICHENLAUB, R.; GARTEMANN, K.-H & BURGER, A. *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria. In: Gnanamanickam, S.S. (Ed.). **Plant-associated bacteria**. Dordrecht, Springer, 2006. p. 385-421.
- FAHY, P.C., HAYWARD, A.C. Media and methods for isolation and diagnostic tests. In.: FAHY, P.C., PRESLEY, G.J. (Eds.) **Plant bacterial disease - a diagnostic guide**. Sidney, Academic Press, 1983. 393p.
- FATMI, M., SCHAAD, N.W. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. **Phytopathology**, v.78, p.121-126, 1988.
- FATMI, M., SCHAAD, N.W. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. **Plant Pathology**, v.51, p.149-154, 2002.
- FATMI, M., SCHAAD, N.W., BOLKAN, H.A. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. **Plant Disease**, v.75, p.383-385, 1991.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT, 2006. [on line]. Disponível na internet via WWW.URL: <http://faostat.fao.org>. Arquivo capturado em 05/05/2008.
- GARTEMANN, K.H., KIRCHNER, O., ENGEMANN, J., GRAFEN, I., EICHENLAUB, R., BURGER, A. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. **Journal of Biotechnology**. v. 106, p. 179-191, 2003.
- GALLI, F., TOKESHI, H. Doenças do tomateiro. In: MINAMI, K. , HAAG, H. P. **O tomateiro**. Campinas: Fundação Cargill, 1979. p.240-294.
- GITAITIS, R.D. Induction of a hypersensitive like reaction in four o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Plant Disease**. v.74, 58-60, 1990.

GITAITIS, R.D. Bacterial canker. In: JONES, J.B., JONES, J.P., STALL, R.E., ZITTER, T.A. (Ed.). **Compendium of tomato diseases**. St. Paul: APS Press, 1991. p. 25-26.

GLEASON, M.L., BRAUN, E.J., CARLTON, W.M. **Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes**. American Phytopathological Society Press, St. Paul, 1991, p.1519-1523.

GLEASON, M. L., GITAITIS, R. D., RICKER, M. D. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. **Plant Disease**, v.77, n.11, p. 1069-1076, 1993.

GOMIDE, A. F. Levantamento de doenças bacterianas em hortaliças na região do cinturão verde de Belo Horizonte. Viçosa, MG: UFV, 1989. 89p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1989.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 342p.

GROSS, D., VIDAVER, A. K. A selective medium for isolation of *Corynebacterium nebraskense* from soil and plant parts. **Phytopathology**, v.69, p.82-87, 1978.

HADAS, R., KRITZMAN, G., KLIETMAN, F., GEFEN, T., MANULIS, S. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. **Plant Pathology**, v.54, p.643-649, 2005.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola de tomate da safra de 2006. [on line]. Disponível na internet via WWW.URL: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza). Arquivo capturado em 05/05/2007.

ISPP - INTERNATIONAL SOCIETY FOR PLANT PATHOLOGY. Names of Plant Pathogenic Bacteria, 1864-1995 [on line]. Disponível na internet via WWW.URL: [http://www.isppweb.org/names\\_bacterial.asp](http://www.isppweb.org/names_bacterial.asp).. Arquivo capturado em 07/02/2008.

- JAHR, H., DREIER, J., MELETZUS, D., BAHRO, R., EICHENLAUB, R. The endo  $\beta$ -1,4 glucanase CelsA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. **Mol Plant-Microbe Interact.** v.13,p. 703-714, 2000.
- KADO, C. I., HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p. 969-976, 1970.
- KANESHIRO, W. S., MIZUMOTO, C. Y., ALVAREZ, A. M. Differential of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. **European Journal of Plant Pathology**, v.116, p.45-56, 2006.
- KIRÁLY, Z., KLEMENT, Z., SOLYMOŠKY, E., VOROS, J. **Methods in plant pathology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1970. 509p.
- KLEMENT, Z. Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonas. **Nature**, v.199, p.209-300, 1964.
- KRONKA, A.Z. Cancro bacteriano do tomateiro: Metodologia de inoculação, reação de genótipos do hospedeiro e eficiência de químicos sobre o controle. Piracicaba. 2004. 94p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – ESALQ. 2004.
- KUROZAWA, C., PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro. (*Lycopersicon esculentum* Mill.) In: KIMATTI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L. E. A., REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia** - Doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v.2. p.691-719.
- LACAZ, C.S. ed. **Antibióticos**. São Paulo: EDUSP, 1975. 509p.
- LEBEN, C. How plant-pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, v.65, p.633-637, 1981.
- LÉON, L., SIVERIO, F., RODRÍGUEZ, A. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. **Journal of Microbiological Methods**, v.67, p.141-149, 2006.

- LOPES, C.A., QUEZADO-DUVAL, A.M. Doenças bacterianas. In: LOPES, C.A. & ÁVILA, A.C.(Ed.). **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA-Hortaliças, 2005. 151 p.
- LOPES, C.A., QUEZADO-DUVAL, A.M. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças. In: Zambolim, L., LOPES, C.A., PICANÇO, M.C., COSTA, H.(Ed.). **Manejo Integrado de Doenças e Pragas: Hortaliças**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 626 p.
- LOPES, C.A., QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças-diagnose e controle**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1997. 70p.
- MACHADO, J. C. Patologia de sementes, fundamentos e aplicações. Brasília, DF: MEC-ESAL-FAEPE, 1988. 160p.
- MAFFIA, L.A., MARTINS, M.C.P., MATSUOKA, K. Doenças de tomateiro. **Informe agropecuário**, v.6, n.66, p.42-60, 1980.
- MELETZUS, D., EICHENLAUB, R. Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by electroporation and development of a cloning vector. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 184-190, 1991.
- MELETZUS, D., BERMPOHL, A., DREIER, J., EICHENLAUB, R. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 2131-2136, 1993.
- MIGUEL, D.S. **Estacas de bambu como fonte de inóculo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e métodos de controle para a sua desinfestação**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 37p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MOUGEL, C., COURNOYER, B., NESME, X. Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti Plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.65-74, 2001.
- MOURA, A.B. Detecção e quantificação de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em lotes de sementes de pepino. Viçosa, MG: UFV, 1992. 57p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1992.

- MOURA, A.B., OLIVEIRA, J. R. Doenças causadas por bactérias em tomateiro. **Informe agropecuário**, v.18, n.184, p.15-18, 1996.
- OLIVEIRA, J.R. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. Viçosa, MG: UFV, 1995. 98p. Tese (Doutorado em Fitopatologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- PASTRIK, K. H., RAINEY, F. A. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. **Phytopathology**, v.147, p.687-693, 1999.
- RAMOS, R. L. B. Comparação de métodos de detecção de *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen, em sementes de tomate. Viçosa, MG: UFV, 1978.48p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 1978.
- ROBBS, C.F. Doenças causadas por bactérias. **Informe agropecuário**, v.11, n.131, p.45-50, 1985.
- ROMEIRO, R. S., SOUZA, R.M., MUCHOVEJ, J.J., KIMURA, O. Soft rot of peruvian carrot due to *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in Brasil. **Plant Pathology**, v.37, p.300-302, 1988.
- ROMEIRO, R. S., MELOM L.M., OLIVEIRA, J.R. Etiologia e transmissão pela semente de uma bacteriose da cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v.5, p.221-226, 1993.
- ROMEIRO, R. S., SIMÕES, A.R., MUCHOVEJ, J.J., OLIVEIRA, J.R., SOUZA, R.M. Bacterial sudden yellow and soft rot of *Coriandrum sativum*. **Plant Pathology**, v.43, p.944-946, 1994.
- ROMEIRO, R. S., LIMA JUNIOR, V.B. Preliminary evidence for phytoalexin production by *Eucalyptus urophylla* leaves as a response to inoculation with the incompatible pathogen *Acidovorax avenae* pv. *Avenae*. **Journal of Phytopathology**, v.146, p.5-6, 1998.
- ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279p.
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 417p.

- RILEY, I. T., OPHEL, K. M. Rapid detection of corynetoxins produced by *Clavibacter toxicum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.14, p. 96–99, 1992.
- RYU, E. A simple method for differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. **Kitazato Archives of Experimental Medicine**, v. 17, p. 58-63, 1940.
- SAETTLER, A.W., SCHAAD, N.W., ROTH, D.A. **Detection of bacteria in seed**. 2 ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, 1989, 122p.
- SANT'ANA, A.S., AZEREDO, D.R.P. Comparação entre o sistema petrifilm RSA e a metodologia convencional para a enumeração de Estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciência tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.25, n.3, p. 531-535, 2005.
- SANTOS, M. S., CRUZ, L., NORSKOV, P., RASMUSSEN, O. F. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. **Seed science & technological**, v.25, p.581-584, 1997.
- SCHAAD, N. W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 2 ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, 1988. 163p.
- SCHAAD, N. W., JONES, J. B., CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3 ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, 2001. 373p.
- SHIRAKAWA, T., SASAKI, T. A selective medium for isolation of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*, the pathogen of tomato bacterial canker disease. **Japan Phytopathological Society**, v. 54, p.540-543, 1988.
- SHUSTER, M. L., COYNE, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.12, p.199-221, 1974.
- SILVA, D. J. H., VALE, F. X. R. **Tomate: Tecnologia de produção**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 356p.

- SILVA, M.R. Comparação da eficiência de meios semi-seletivos para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro. Viçosa, MG: UFV, 2002. 58p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- SMIMBERT, M.R., KRIEG, N.R. General characterization. In: GERHART, P. (Ed.). **Manual of Methods for General Bacteriology**. American Society for Microbiology. Washington, 1981. 409-443.
- STRIDER, D.L., KONSLER, T. R. Cotyledonary symptoms of bacterial canker of tomato. **Plant Disease Reporter**, v.49, n.7, p.634-635, 1965.
- STRIDER, D.L. **Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense***. North Carolina Agricultural Experiment Station, 1969. 110. (Technical Bulletin., 193).
- THEODORO, G.F., MARINGONI, A. C. Ação de produtos químicos *in vitro* e *in vivo* sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal do cancro bacteriano do tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 57, n.3, p.439-443, jul./set. 2000.
- THYR, B. D. Assaying tomato seed for *Corynebacterium michiganense*. **Plant Disease Reporter**. V. 53, p. 858-860, 1969.
- THYR, B. D. *Corynebacterium michiganense* isolated from naturally infected *Solanum triflorum*. **Plant Disease Reporter**. V. 55, n.4, p. 336-337, 1971.
- THYR, B. D., SAMUEL, M. J., BROWN P. G. New solanaceous host records for *Corynebacterium michiganense*. **Plant Disease Reporter**. V. 59, n.7, p. 595-598, 1975.
- TOKESHI, H., CARVALHO, P. C. T. Doenças do tomateiro - *Lycopersicon esculentum* Mill. In: Galli, F. (Ed.). **Manual de Fitopatologia** - doenças das plantas cultivadas. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2. p.511-552.
- TSIANTOS, J. Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. **Journal Phytopathology**, v.119, p.142-146, 1987.
- TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239p.



- UMESHA, S. Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. **Crop Protection**, v.25, p.375-381, 2006.
- UTKHEDE, R., KOCH, C. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. **Biocontrol**, v.49, p. 305-313, 2004.
- VALARINI, P.J. Métodos para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. Piracicaba: ESALQ, 1990, 167p. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Piracicaba: ESALQ, 1990.
- VALARINI, P.J. Métodos para detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, v.17, n.2, p.179-186, 1995.
- VEENA, M. S., VAN VUURDE, J. W. L. Indirect immunofluorescence colony staining method for detecting bacterial pathogens of tomato. **Journal of microbiological methods**, v.49, p.11-17, 2002.
- VERNIERE, C.; PRUVOST, O.; DUBOIS, C. COUTEAU, A.; LUISETTI, J. Variations among the strains of *Xanthomonas* isolated from citrus in the sensibility to antibiotics. **Plant Pathogenic Bacteria**, p.247-251, 1992.
- VIDAVER, A. K., DAVIS, M. J. Gram-positive bacteria. In: SCHAAD, N. W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 2.ed. St. Paul: APS Press, 1988. 164p.
- VOLCANI, Z., ZUTRA, D., COHN, R. A new leaf and fruit spot disease of pepper caused by *Corynebacterium michiganense*. **Plant Disease Reporter**, v. 54, n. 9, p. 804-806, 1970.
- WAKIMOTO, S., UEMATSU, T., MUKOO, H. Bacterial canker disease of tomato in Japan. I- Isolation and identification of the causal bacteria, and resistance of tomato against the disease. **Bulletin National of Institute of Agricultural Science of Plant Pathology and Entomology**, v.22, p.269-281, 1968.

WATERS, C. M., BOLKAN, H. A. An improved semi selective medium and method of extraction for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. **Phytopathology**, v.82, p.1072, 1992. (Abst.).

WRUCK, D.L.M. Análises bioquímica, patogênica, sorológica e molecular de isolados de *X. campestris* pv. *campestris*. Viçosa: UFV. 2001. 62p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

## APÊNDICE

### COMPOSIÇÃO DOS MEIOS SEMI-SELETIVOS

#### MB1M

(VALARINI, P.J. Métodos para detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomate. **Revista brasileira de sementes**, v.17, n.2, p.179-186, 1995).

---

Sacarose	10,0g
Caseína hidrolisada	8,0g
Extrato de levedura	4,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3g
Agar	15,0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml
<b>Após a autoclavagem, adicionou-se:</b>	
Telurito de Potássio	0,01g
Ácido bórico	1,5g
Benomyl	0,1g

---

#### SCM

(FATMI, M., SCHAAD, N. W. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. **Phytopathology**, v.78, p.121-126, 1988).

---

Sacarose	10,0g
Extrato de levedura	0,1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25g
Agar	15,0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml
<b>Após a autoclavagem, adicionou-se:</b>	
Ácido bórico	1,5g
Ciclohexamida	200mg (dissolvida em 1mL de metanol absoluto)
Ácido nalidixico	30mg (dissolvido em 1mL de 0,1M de NaOH)
Ácido nicotínico	100mg (dissolvido em 20mL de H <sub>2</sub> O destilada e estéril)
Telurito de Potássio	10mg

---

\*pH ajustado para 7.0.

---

### mSCM

(WATERS, C. M., BOLKAN, H. A. An improved semi selective medium and method of extraction for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. **Phytopathology**, v.82, p.1072, 1992).

---

Manose	10,0g
Extrato de levedura	0,1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,62g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25g
Agar	12,0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml

**Após a autoclavagem, adicionou-se:**

Ácido bórico	1,5g
Ciclohexamida	200mg (dissolvida em 1mL de metanol absoluto)
Ácido nalidixico	30mg (dissolvido em 1mL de 0,1M de NaOH)
Ácido nicotínico	100mg (dissolvido em 20mL de H <sub>2</sub> O destilada e estéril)

\*pH ajustado para 7.0.

---

### D<sub>2</sub>ANX

(HADAS, R., KRITZMAN, G., KLIETMAN, F., GEFEN, T., MANULIS, S. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. **Plant Pathology**, v.54, p.643-649, 2005).

---

Glucose	10,0g
Extrato de levedura	2,0g
Caseína ácida hidrolisada	4,0g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3g
Base trizma	1,2g
Agar	15,0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml

**Após a autoclavagem, adicionou-se:**

Ciclohexamida	100mg
Ácido nalidixico	3mg
Sulfato de Polimixina B	13mg

\*pH ajustado para 7.4.

---

**KBT**

(DHANVANTARI, B. N. Comparasion of selective media for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Phytopathology**, v.77, p.1694, 1987).

---

Proteose peptona	20,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5g
Glicerol	15,0mL
Agar	15,0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml

**Após a autoclavagem, adicionou-se:**

Telurito de Potássio	10mg
Ácido nalidixico	10mg

---

\*pH ajustado para 7.2.

---

**CNS**

(GROSS, D., VIDAVER, A. K. A selective medium for isolation of *Corynebacterium nebraskense* from soil and plant parts. **Phytopathology**, v.69, p.82-87, 1978).

---

Caldo nutriente	8,0g
Extrato de levedura	2,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5g
LiCl	10,0g
Agar	15,0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml

**Após a autoclavagem, adicionou-se:**

Ciclohexamida	4,0mL * <sup>I</sup>
Ácido nalidixico	2,50mL * <sup>II</sup>
Sulfato de Polimixina B (8.000 UI/mg)	3,2mL * <sup>III</sup>
Clorotalonil (530mg/mL)	60,0mL * <sup>IV</sup>
Glucose	5,0g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	124,0mg

**\*Soluções estoques:**

<sup>I</sup> 1g/100mL de H <sub>2</sub> O destilada e estéril	4°C
<sup>II</sup> 0,1g em 7mL de H <sub>2</sub> O destilada e estéril + 3mL de NaOH a 1N.	4°C
<sup>III</sup> 1g/100mL de H <sub>2</sub> O destilada e estéril	4°C
<sup>IV</sup> 1,2mL/58,8mL ou 0,2mL/9,8mL de H <sub>2</sub> O destilada e estéril	Temperatura ambiente

---

\*pH ajustado para 6.9.