



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TALITA VIGO LONGHI

**HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS E SOBREVIVÊNCIA DE  
*Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, AGENTE CAUSAL DA  
ESTRIA BACTERIANA DO MILHO**

---

Londrina  
2022

TALITA VIGO LONGHI

**HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS E SOBREVIVÊNCIA DE  
*Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, AGENTE CAUSAL DA  
ESTRIA BACTERIANA DO MILHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Agronomia da Universidade Estadual de  
Londrina, para a obtenção do título de Doutora em  
Agronomia.

Orientadora: Dra. Maria Isabel Balbi - Peña  
Coorientador: Dr. Rui Pereira Leite Júnior

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L854h Longhi, Talita Vigo.  
Hospedeiros alternativos e sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, agente causal da estria bacteriana do milho / Talita Vigo Longhi.  
- Londrina, 2022.  
97 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Balbi-Peña.  
Coorientador: Rui Pereira Leite Júnior.  
Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2022.  
Inclui bibliografia.

1. Bacteriologia - Tese. 2. Patogenicidade - Tese. 3. Hospedeiros - Tese. 4. Sobrevivência - Tese. I. Balbi-Peña, Maria Isabel . II. Pereira Leite Júnior, Rui . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

TALITA VIGO LONGHI

**HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS E SOBREVIVÊNCIA DE  
*Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, AGENTE CAUSAL DA ESTRIA  
BACTERIANA DO MILHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Agronomia da Universidade Estadual de  
Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Pesq. Dr. Rui Pereira Leite Junior  
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná –  
IDR-Paraná

Prof<sup>o</sup>. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Pesq. Dr<sup>a</sup>. Michele Regina Lopes da Silva  
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná –  
IDR-Paraná

Pesq. Dr. Adriano Augusto De Paiva Custodio  
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná –  
IDR-Paraná

Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcelo Giovanetti Canteri  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 01 de junho de 2022.

*"A meus amados pais, Inácio e  
Sirlene, meu irmão João Rafael e  
esposo Paulo,  
inspirações da minha vida"*  
*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças e saúde para seguir em frente;

Aos meus pais, que amo incondicionalmente, Inácio Longhi e Sirlene de Fátima Vigo Longhi, que sempre me deram imenso apoio e confiança em todas as horas. Obrigada por acreditarem nos meus sonhos;

Ao meu irmão, João Rafael Vigo Longhi e à minha cunhada Daniele Silva Longhi, quero demonstrar todo o meu carinho;

Em especial ao Paulo Abarca Carmezini, pelo amor, pelo carinho, pela amizade, pela compreensão, pela paciência e pelo companheirismo durante toda a realização deste trabalho. Obrigada por estar comigo em mais uma importante etapa da minha vida;

A minha orientadora Dra. Maria Isabel Balbi-Peña pela oportunidade, por todo empenho, pela dedicação, pelos ensinamentos e pela paciência nesta orientação;

Ao meu coorientador Dr. Rui Pereira Leite Júnior, pela preciosa amizade, excelente recepção e acolhida, pela confiança, pela dedicação, pelo incentivo, pelos ensinamentos, pela paciência e pela grande contribuição na realização deste trabalho;

A pesquisadora Dra. Michele Regina Lopes da Silva, pela delicadeza de sua amizade, pelo exemplo de luta e de determinação, pelos ensinamentos, pelas correções e pelos conselhos;

A todos meus familiares, pelo reconhecimento, pela amizade e pelo suporte oferecido sempre que necessário;

As minhas amigas confidentes, Michele Pelisson, Vanessa Bocato e Rafaela Murari por sempre torcerem pelo meu sucesso e me apoiarem nos momentos mais difíceis;

Aos amados amigos do laboratório Renata Rodrigues Robaina, Deived Uilian de Carvalho, Maria Aparecida da Cruz, por toda ajuda, pelo incentivo, pelo carinho e pela amizade;

E ao grande e amado amigo Israel Aurora, nosso “braço direito do laboratório”, que me ajudou infinitas vezes, obrigada;

Agradeço de coração ao Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná IAPAR-EMATER (IDR-Paraná) e aos seus colaboradores, Cícero de Sá, Vanessa Sugahara, Amanda Morais, Maria Aparecida Matos e aos demais servidores e estagiários pelo apoio técnico, tornando possível a realização deste estudo;

Aos professores, funcionários e alunos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) que contribuíram na minha educação e formação profissional e em especial ao Gabriel Shimizu;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UEL e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária pela concessão de bolsas contribuíram significativamente na minha formação e execução do doutorado;

Ao Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves, Dr. Adriano Augusto de Paiva Custodio, Dr. Marcelo Giovanetti Canteri, Dra. Débora Cristina Santiago, Dra. Sandra Cristina Vigo pelas contribuições nas revisões e avaliação do presente trabalho.

Muito obrigada!!!

LONGHI, Talita Vigo. **Hospedeiros alternativos e sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, agente causal da estria bacteriana do milho.** 2022. 97 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2022.

## RESUMO

A estria bacteriana do milho, causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xv*) é uma doença emergente, relatada inicialmente na África do Sul e posteriormente, no continente Americano em 2016, e no Brasil em 2018. Informações sobre a biologia e ecologia do patógeno, bem como sobre aspectos epidêmicos e de manejo da doença, ainda são escassas. Em vista disso, este estudo teve por objetivos identificar espécies potenciais hospedeiras de *Xv* e a capacidade de sobrevivência da bactéria em solo sob condições controladas e a campo, e em resíduos culturais de milho a campo. No estudo da identificação de plantas hospedeiras foram incluídas 52 espécies de plantas mono e dicotiledôneas, envolvendo anuais cultivadas e de adubação verde, forrageiras e de pastagens e invasoras que ocorrem em lavouras de milho ou que fazem sucessão e rotação com o milho. A colonização epifítica de *Xv* em plantas assintomáticas e a colonização patogênica da bactéria foram confirmadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em espécies que apresentaram assintomáticas e sintomáticas de infecção bacteriana. Somente dez espécies de plantas, todas pertencentes à família Poaceae, apresentaram sintomas de infecção bacteriana nas folhas: *Avena sativa* (aveia branca), *Avena strigosa* (aveia preta), *Hordeum vulgare* (cevada), *Oryza sativa* (arroz), *Brachiaria brizantha* (braquiária brizantha), *Digitaria horizontalis* (capim-colchão), *Digitaria insularis* (capim-amargoso), *Echinochloa colonum* (capim-arroz), *Eleusine indica* (capim-pé-de-galinha) e *Sorghum orundinaceum* (falso-massambará). A colonização epifítica por *Xv* foi constatada em 43 espécies assintomáticas. De acordo com as imagens de MEV, os espécimes de aveia, aveia preta e milho apresentaram células e agregados de *Xv* distribuídos na superfície foliar e, em fraturas de tecido foi observada a colonização de regiões intercelulares na câmara subestomática. As espécies assintomáticas sorgo, centeio e milheto, foi constatada pequena quantidade de células bacterianas na superfície foliar, e nas fraturas de milheto, não foi observada a colonização pela bactéria. No estudo de sobrevivência de *Xv* em solo foi investigada em dois tipos de solo, arenoso e argiloso, mantidos nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, em condições de laboratório. A sobrevivência da bactéria em condições de campo foi estudada em solo argiloso infestado artificialmente. Por outro lado, a capacidade de sobrevivência em resíduos de cultura de milho infectados com a bactéria foi investigada utilizando resíduos mantidos na superfície do solo e incorporados ao solo na profundidade de 20 cm. Sob condições controladas, a bactéria sobreviveu por períodos que variaram de quatro a 40 dias, sendo quatro dias em solo arenoso mantido a 30 °C e 40 dias em solo argiloso mantido na temperatura de 20 °C. Os resultados obtidos nos estudos em condições de laboratório evidenciaram que a *Xv* possui capacidade de sobreviver por maior período de tempo em solo argiloso. Entretanto a bactéria apresentou capacidade de sobreviver por um período maior em temperatura de 20° C do que em temperaturas mais elevadas, independentemente do tipo de solo. Em relação aos estudos sob condições de campo, a sobrevivência de *Xv* como células livres em solo foi de apenas 48 horas e em resíduos culturais de milho foi por até 15 dias em amostras mantidas na superfície do solo. Nas amostras de resíduos culturais de milho incorporados ao solo, a bactéria foi detectada apenas no momento da instalação do experimento. A sobrevivência de *Xv* associada a resíduos culturais de milho pode ser influenciada pela incorporação ou não do material vegetal ao solo.

**Palavras-chave:** epifitismo, colonização epifítica, microscopia eletrônica de varredura, patogenicidade, tempo de sobrevivência, *Zea mays*.

LONGHI, Talita Vigo. **Alternative hosts and survival of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, causal agent of the bacterial leaf streak of maize.** 2022. 97 p. Thesis (Doctorate in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina. 2022.

## ABSTRACT

Corn bacterial leaf streak, caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*) is an emerging disease, initially reported in South Africa and subsequently in the American continent in 2016, and in Brazil in 2018. Information on the biology and ecology of the pathogen, as well as epidemic and management aspects of the disease, is still scarce. In view of this, the main objectives of this study were to identify potential host species of *Xvv* and the ability of the bacterium to survive in soil under controlled conditions and in the field, and in corn crop residues in the field. In the study of host plant identification, 52 species of mono and dicotyledonous plants were included, involving cultivated and green manure annuals, forages and pastures and weeds that occur in corn crops or that make succession and rotation with corn. Epiphytic colonization of *Xvv* in asymptomatic plants and pathogenic colonization of the bacteria were confirmed by scanning electron microscopy (SEM) in species that presented asymptomatic and symptomatic bacterial infection. Only ten plant species, all belonging to the Poaceae family, showed symptoms of bacterial infection on the leaves: *Avena sativa*, *Avena strigosa*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Brachiaria brizantha*, *Digitaria horizontalis*, *Digitaria insularis*, *Echinochloa colonum*, *Eleusine indica*, e *Sorghum orundinaceum*. Epiphytic colonization by *Xvv* was observed in 43 asymptomatic species. According to the SEM images, the oat, black oat and corn specimens showed cells and aggregates of *Xvv* distributed on the leaf surface and, in tissue fractures, the colonization of intercellular regions in the substomatic chamber was observed. Asymptomatic sorghum, rye and millet species showed a small amount of bacterial cells on the leaf surface, and in millet fractures, colonization by the bacteria was not observed. In the study of survival of *Xvv* in soil, it was investigated in two types of soil, sandy and clayey, maintained at temperatures of 20, 25 and 30 °C, under laboratory conditions. Survival of the bacteria under field conditions was studied in artificially infested clayey soil. On the other hand, the survivability of maize crop residues infected with the bacteria was investigated using residues kept on the soil surface and incorporated into the soil at a depth of 20 cm. Under controlled conditions, the bacteria survived for periods ranging from four to 40 days, four days in sandy soil kept at 30 °C and 40 days in clayey soil kept at a temperature of 20 °C. The results obtained in studies under laboratory conditions showed that *Xvv* has the ability to survive for a longer period of time in clayey soil. However, the bacteria showed the ability to survive for a longer period at a temperature of 20 °C than at higher temperatures, regardless of the type of soil. Regarding the studies under field conditions, the survival of *Xvv* as free cells in soil was only 48 hours and in corn crop residues it was for up to 15 days in samples maintained on the soil surface. In samples of corn crop residues incorporated into the soil, the bacteria was detected only at the time of installation of the experiment. The survival of *Xvv* associated with maize crop residues can be influenced by the incorporation or not of plant material in the soil.

**Keywords:** epiphytism, epiphytic colonization, scanning electron microscopy, pathogenicity, survival time, *Zea mays*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** Sintomas da estria bacteriana do milho. (A) Lesões iniciais no formato de pequenas pontuações encharcadas. (B) Lesões alongadas, estreitas, e com bordas onduladas e restritas às regiões internervais. (C) Lesões mais evoluídas e necróticas. .... 22
- Figura 2.2** Ciclo da estria bacteriana do milho causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* proposto por Ortiz-Castro et al. (2020), adaptado por Longhi. .... 23
- Figura 3.1** Temperaturas máximas (Tmax), mínimas (Tmin) e médias (Tmed) (°C) e umidade relativa do ar (UR) (%) em casa de vegetação semi-climatizada no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná-IAPAR-EMATER, Londrina, PR, Brasil, durante os períodos de (A) fevereiro a novembro de 2019 e de (B) fevereiro a outubro de 2021 ..... 333
- Figura 3.2** Sintomas em plantas inoculadas com o isolado RL1 de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*) 15 DAI. (A) arroz cv. IPR 117 com pontuações avermelhadas restritas às regiões internervais; (B) aveia cv. IPR Afrodite com pontuações amareladas nas folhas evoluindo para clorose; (C) aveia cv. IPR Esmeralda com pontuações amareladas nas folhas evoluindo para clorose; (D) aveia preta cv. IPR 161 com pontuações amareladas nas folhas evoluindo para clorose; (E) cevada cv. BRS Cauê com pontuações amarelo-palha ao longo das nervuras; (F) milho cv. IPR 164 com estrias com margens onduladas nas folhas; (G) milho branco cv. IPR 127 com estrias com margens onduladas nas folhas. Fotos: Antônio Alberto dos Santos e próprio autor..... 44
- Figura 3.3** Sintomas em plantas forrageiras e plantas daninhas inoculadas com o isolado RL1 de *Xvv* observados 15 DAI. (A) braquiária Brizantha com sintomas de estria; (B) braquiária Marandu com sintomas de estria; (C) capim amargoso com sintomas de clorose; (D) capim pé-de-galinha com sintomas de estria; (E) capim arroz com pontuações avermelhadas; (F) capim colchão com pontuações avermelhadas; (G) falso-massambará com pontuações vermelhas no limbo foliar. Fotos: Antônio Alberto dos Santos e próprio autor..... 45
- Figura 3.4** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície foliar e de fraturas de folhas das aveias aos 15 dias após a inoculação com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*). (A) cv. IPR Afrodite com agregado de células de *Xvv* em estômato; (B) cv. IPR Afrodite com colonização do mesófilo foliar por *Xvv* havendo formação de agregados e produção de material amorfo sugerindo

exopolissacarídeos; (C) cv. IPR Esmeralda com agregado de células de *Xvv* em estômato; (D) cv. IPR Esmeralda com colonização do mesófilo foliar por *Xvv* havendo formação de agregados e produção de material amorfo sugerindo exopolissacarídeos; (E) aveia preta cv. IPR161 com agregado de células de *Xvv* em estômato; (F) aveia preta cv. IPR161 com colonização do mesófilo foliar por *Xvv* havendo formação de agregados e produção de material amorfo sugerindo exopolissacarídeos.....47

**Figura 3.5** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície adaxial e fraturas de folhas de milho e arroz aos 15 dias após a inoculação com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*). (A) milho cv. IPR164 com aglomerado de células de *Xvv* em abertura de estômato; (B) milho cv. IPR164 com agrupamento de células de *Xvv* no mesófilo foliar coberto por material amorfo sugestivo de exopolissacarídeos; (C) arroz cv. IPR 117 com células de *Xvv* colonizando região próxima à estômato; (D) arroz cv. IPR 117 com estrutura interna do mesófilo foliar, sem evidências da presença de células bacterianas.....48

**Figura 3.6** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de plantas assintomáticas de sorgo cv. BRS 658, centeio cv. IPR 89, e milheto cv. IPR Santa Tereza do Oeste aos 15 dias após a inoculação com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*). (A) superfície adaxial do sorgo cv. BRS 658 com células de *Xvv* dispersas na epiderme; (B) superfície adaxial do centeio cv. IPR 89 com células de *Xvv* dispersas na epiderme; (C) agregados de células de *Xvv* demonstrando morfologia alterada, indicando morte celular na superfície adaxial de milheto cv. IPR Santa Tereza do Oeste; (D) fraturas mostrando a estrutura interna do mesófilo foliar, sem evidências de colonização bacteriana em milheto cv. IPR Santa Tereza do Oeste.....49

**Figura 4.1** Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* isolado RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> em solo arenoso e argiloso, mantidos em temperaturas de 25 e 30 °C no primeiro experimento.....65

**Figura 4.2** Análise de Kaplan-Meier para a sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* isolado RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> em função do tempo (dias) após a infestação de solos arenoso e argiloso mantidos nas temperaturas de 25 e 30 °C no primeiro experimento. O teste Log-Rank foi utilizado para as comparações.....66

<b>Figura 4.3</b>	Sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> isolado RL1 <sup>Rif+</sup> em solos arenoso e argiloso mantidos em temperaturas de 20, 25 e 30 °C no segundo experimento.....	68
<b>Figura 4.4</b>	Gráficos de Kaplan-Meier da sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> isolado RL1 <sup>Rif+</sup> em função do tempo (dias) após a infestação artificial em solos arenoso e argiloso mantidos a 20, 25 e 30 °C no segundo experimento. O teste de Log-Rank foi utilizado para as comparações. ....	69
<b>Figura 4.5</b>	Sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> isolado RL1 <sup>Rif+</sup> em solos arenoso e argiloso mantidos em temperaturas de 20, 25 e 30 °C no terceiro experimento.....	70
<b>Figura 4.6</b>	Gráficos de Kaplan-Meier da sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> isolado RL1 <sup>Rif+</sup> em função do tempo (dias) após a infestação artificial em solos arenoso e argiloso mantidos a 20, 25 e 30 °C no terceiro experimento. O teste de Log-Rank foi utilizado para as comparações. ....	71
<b>Figura 4.7</b>	Sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> isolado RL1 <sup>Rif+</sup> em solo sob condições de campo em quatro experimentos conduzidos na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR. Brasil, nos anos de 2020 e 2021. ....	74
<b>Figura 4.8</b>	Sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> isolado RL1 <sup>Rif+</sup> em resíduos culturais de milho mantidos na superfície e incorporados ao solo sob condições de campo em experimentos conduzidos na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR. Brasil, no primeiro (I) e segundo experimento (II) do ano 2020.....	75
<b>Figura 4.9</b>	Precipitação (mm), temperaturas mínima, máxima e média (°C), umidade relativa do ar (%) durante o período em que foi avaliada a sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> associada a resíduos de cultura de milho em experimentos conduzidos na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR. Brasil. As setas indicam os momentos de amostragem para avaliação em ambos os experimentos (I e II). ....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> Hospedeiros sintomáticos e assintomáticos de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> relatados na literatura. ....	299
<b>Tabela 3.1</b> Patogenicidade e colonização epifítica de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> , agente causal da estria bacteriana do milho, em plantas anuais cultivadas e de adubação verde. ....	38
<b>Tabela 3.2</b> Patogenicidade e colonização epifítica de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> , agente causal da estria bacteriana do milho, em plantas forrageiras e de pastagens .....	39
<b>Tabela 3.3</b> Patogenicidade e colonização epifítica de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> , agente causal da estria bacteriana do milho, em plantas invasoras .....	40
<b>Tabela 3.4</b> Período máximo de recuperação em dias após inoculação (DAI) e unidades formadoras de colônia (Log <sub>10</sub> UFC g <sup>-1</sup> ) de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> ( <i>Xvv</i> ), agente causal da estria bacteriana do milho em plantas cultivadas, de adubação verde, forrageiras, pastagens e invasoras.....	41
<b>Tabela 4.1</b> Características físicas dos solos utilizados no estudo da sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> sob condições controladas. ....	59
<b>Tabela 4.2</b> Características químicas dos solos utilizados no estudo da sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> sob condições controladas. ....	599
<b>Tabela 4.3</b> Temperatura média (Tmed), precipitação pluviométrica (PREC) umidade relativa (UR) e de umidade do solo (US), durante os períodos experimentais de avaliação da sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> isolado RL1 <sup>Rif<sup>+</sup></sup> em solo sob condições de campo conduzidos na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR. Brasil, nos anos de 2020 e 2021.....	72
<b>Tabela 4.4</b> Sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> em resíduos de cultura de milho mantidos na superfície e incorporados ao solo a 20 cm de profundidade, no primeiro (I) e segundo (II) experimentos no ano de 2020, conduzidos na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR. Brasil. ....	74

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1	A CULTURA DO MILHO ( <i>ZEAMAYS</i> ) NO BRASIL .....	16
2.2	DOENÇAS DO MILHO .....	17
2.3	ESTRIA BACTERIANA DO MILHO .....	18
2.3.1	Agente Causal .....	18
2.3.2	Histórico da Ocorrência da Doença .....	20
2.3.3	Sintomatologia .....	21
2.3.4	Ciclo da Doença .....	22
2.3.5	Danos Econômicos Potenciais .....	24
2.3.6	Medidas de Manejo .....	25
2.4	SOBREVIVÊNCIA DE <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> .....	26
2.5	PLANTAS HOSPEDEIRAS DE <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> .....	27
<b>3</b>	<b>ARTIGO A IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS HOSPEDEIRAS DE</b> <b><i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>, AGENTE CAUSAL DA ESTRIA</b> <b>BACTERIANA DO MILHO</b> .....	<b>30</b>
3.1	RESUMO .....	30
3.2	INTRODUÇÃO.....	31
3.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	32
3.3.1	Origem e Cultivo das Espécies Vegetais .....	32
3.3.2	Isolado de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> e Inoculação das Plantas .....	33
3.3.3	Determinação da Patogenicidade em Diferentes Plantas e da Sobrevivência Epifítica de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> .....	34
3.3.4	Teste da PCR para <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> .....	35
3.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	35
3.4	RESULTADOS.....	36
3.4.1	Patogenicidade e Colonização Epifítica de Plantas Cultivadas, Adubação Verde, Forrageiras, de Pastagens e Invasoras por <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> .....	36
3.4.2	Exame por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Plantas Colonizadas por <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> .....	46

3.5	DISCUSSÃO.....	49
3.6	CONCLUSÕES .....	54
<b>4</b>	<b>ARTIGO B SOBREVIVÊNCIA DE <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> EM SOLO E RESÍDUOS CULTURAIS DE MILHO .....</b>	<b>55</b>
4.1	RESUMO .....	55
4.2	INTRODUÇÃO.....	56
4.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	57
4.3.1	Obtenção e Manutenção de Isolado de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> Resistente à Rifampicina .....	57
4.3.2	Sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> em Solo como Células Livres sob Condições Controladas .....	58
4.3.3	Sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> em Solo sob Condições de Campo .....	61
4.3.4	Sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> Associada a Resíduos de Cultura de Milho .....	62
4.4	RESULTADOS.....	63
4.4.1	Sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> em Solo sob Condições Controladas .....	63
4.4.2	Sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> em Solo sob Condições de Campo .....	71
4.4.3	Sobrevivência de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> Associada a Resíduos de Cultura de Milho .....	73
4.5	DISCUSSÃO.....	76
4.6	CONCLUSÕES .....	80
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>81</b>
	<b><u>REFERÊNCIAS .....</u></b>	<b>82</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é uma das culturas de maior importância econômica dentro do cenário de produção agrícola mundial, e tem se destacado pela versatilidade de uso de seus grãos e subprodutos (CONAB, 2019). Além de ser utilizado na alimentação humana, o milho é a principal fonte de energia dentro do processo de nutrição animal e é uma importante matriz energética na produção de biocombustíveis como o etanol (CONAB, 2019). O crescimento da produção mundial de milho tem sido bastante expressivo visto que, nas últimas 20 safras, esta produção aumentou mais de 50%, passando de 601,7 milhões de toneladas na safra de 2000/2001 para estimados 1,20 bilhões de toneladas em 2021/2022 (FIESP, 2021), sendo o cereal mais produzido no mundo (FAO, 2019).

O milho pode ser acometido por diversas doenças que ocasionam perdas significativas na produção. Dentre as mais de 30 doenças relatadas na cultura no Brasil, a estria bacteriana do milho foi recentemente reportada no País (LEITE JÚNIOR et al., 2019a). Entretanto, o primeiro relato da estria bacteriana do milho foi na África do Sul em 1949 (DYER, 1949), sendo recentemente relatada em importantes regiões produtoras do cereal nas Américas do Norte e do Sul, incluindo os Estados Unidos da América e a Argentina, além do Brasil (BRODERS et al., 2017; DAMICONE et al., 2018; JAMANN et al., 2019; KORUS et al., 2017; PLAZAS et al., 2018; LEITE JÚNIOR et al., 2019a). Há relatos da ocorrência epidêmica da estria bacteriana em regiões dos estados do Colorado, Kansas e Nebraska nos EUA, com incidências da doença acima de 90% e níveis de severidade superiores a 50% (BRODERS et al., 2017).

O agente causal da estria bacteriana é a *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xv*) (LANG et al., 2017). A *Xv* é uma bactéria gram-negativa com células em forma de bastonete, móvel, não fluorescente e não fermentativa que produz colônias mucoides e amarelas em meio de cultura caldo nutriente de levedura (NBY) (KORUS et al., 2017) e ágar nutriente (AN) (PLAZAS et al., 2018, LEITE JÚNIOR et al., 2019a). Além do milho, a *Xv* já foi relatada como um patógeno de cana-de-açúcar, de sorgo, de palmeiras e de bambu (VAUTERIN et al., 1995; QHOBELA et al., 1990).

Os sintomas da doença no milho são lesões lineares de coloração amarela intensa a marrom com margens onduladas e localizadas nas regiões entre as nervuras (LANG et al., 2017). Com base em outras doenças de plantas causadas por *Xanthomonas* spp., o agente causal da estria bacteriana provavelmente sobrevive em resíduos de culturas e hospedeiros alternativos, e pode ser disseminada pelo vento, pela chuva e pela água de irrigação (BRODERS et al., 2017). Os hospedeiros alternativos, como as plantas invasoras e de milho voluntárias,

podem servir como fontes de inóculo primário e exsudados bacterianos de lesões de folhas podem servir de inóculo secundário durante a estação de crescimento (BRODERS et al., 2017; LEITE JÚNIOR et al., 2019b; HARTMAN et al., 2020; ORTIZ-CASTRO et al., 2020).

Devido às implicações de uma doença emergente em importantes regiões produtoras de milho do Brasil e à falta de informações sobre o agente causal e o manejo da doença por ela causada, os objetivos gerais deste estudo foram determinar as principais espécies de plantas hospedeiras da *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, considerando plantas cultivadas e invasoras, e examinar a sobrevivência da bactéria em solo e em resíduos culturais. O presente estudo teve como objetivos específicos: (i) investigar se plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, anuais cultivadas, forrageiras e invasoras que ocorrem na cultura do milho ou que fazem sucessão e rotação com o milho, são hospedeiras alternativas de *Xv*, (ii) avaliar a sobrevivência de *Xv* no solo em condições controladas e de campo; e (iii) verificar a sobrevivência do *Xv* associada à resíduos culturais de milho sob condições de campo. Estes resultados fortalecem estudos futuros e fornecem apoio ao manejo da estria bacteriana do milho.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DO MILHO (*Zea mays*) NO BRASIL

O milho (*Zea mays* L.) pertence à tribo Maydeae, subfamília Panicoideae, família Poaceae (antiga família das gramíneas), ordem Poales, classe Liliopsida, divisão Magnoliophyta. É uma espécie alógama e monoica, com ciclo anual, porte robusto e ereto, destinada principalmente à produção de grãos. Esse cereal possui metabolismo fotossintético C4, elevado potencial produtivo e ampla adaptação à diferentes condições de ambiente (TAIZ; ZIEGER, 2013; KERBAUY, 2012).

A sua origem e domesticação ocorreram na América Central e no México (UDRY; DUARTE, 2000; SOARES, 1998), mas, posteriormente, o seu cultivo expandiu por praticamente todo o mundo. É considerado uma das *commodities* agrícolas mais importantes, seja do ponto de vista econômico ou social. É o principal produto destinado à alimentação animal, com destaque para as cadeias produtivas de carne, incluindo suínos, aves e bovinos, e de leite (CONTINI et al., 2020). O milho é a base alimentar da população de vários países e é também utilizado na produção de combustíveis renováveis como o etanol (CONTINI et al., 2020). Destaca-se por ser o grão mais produzido e consumido mundialmente, com uma produção de 1.208,7 milhões de toneladas e o consumo deve alcançar 1.195,9 milhões de toneladas na safra agrícola 2021/2022 (USDA, 2020/FIESP, 2022). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, com produção estimada de 112,902 milhões de toneladas do grão em uma área de 20.944 milhões de hectares na safra 2021/2022 (FIESP, 2022). Os Estados Unidos da América (EUA) é o primeiro e a China o segundo produtor mundial de milho, com produções de 382,6 e 272,6 milhões de toneladas, respectivamente (FIESP, 2021).

A produção brasileira de milho pode ser dividida em três safras: A primeira safra (safra de verão) é semeada preferencialmente de setembro a dezembro com colheita de janeiro a maio; enquanto a segunda safra (safrinha), tendo como principais regiões produtoras o Centro Oeste e o estado do Paraná, é semeada após a cultura de verão de janeiro a março com colheita de maio a agosto. Também a terceira safra, que é uma nova tendência de produção na região chamada de Sealba (Sergipe, Alagoas e nordeste da Bahia), além de Roraima e Pernambuco, semeada entre os meses de maio e junho com colheita de setembro a novembro, e que possui um calendário de produção semelhante ao do hemisfério norte (CONAB, 2020). Na safra 2021/2022, estima-se que a primeira safra de milho alcance aproximadamente 24 milhões de toneladas, cerca de 22% da produção nacional; a produção estimada da segunda safra deve ser

de 86,259 milhões de toneladas, aproximadamente 76,40% da produção do país, e a terceira safra com produção de 1,86 milhões de toneladas, representando 1,64% da produção nacional (FIESP, 2022).

As principais regiões produtoras do Brasil, são o Centro-Oeste, o Sul e o Sudeste, com cultivo em pequenas, médias e grandes propriedades (CONAB, 2021). A região Centro-Oeste tem liderado tanto em área cultivada, quanto em produtividade e produção, e seus principais estados produtores são o Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás. Esta região possui uma área estimada de 10.524,1 milhões de hectares, produtividade média de 6.109 Kg ha<sup>-1</sup>, e produção de 64.294,1 milhões de toneladas (CONAB, 2021). A região Sul possui a segunda maior área cultivada de milho do País, com 4.255,7 milhões de hectares e a segunda maior produção com 26.487,9 milhões de toneladas (CONAB, 2021). O Paraná é o segundo maior estado produtor do Brasil, com área de 3.080,6 milhões de hectares e produção estimada de 17.585,1 milhões de toneladas (CONAB, 2021).

## 2.2 DOENÇAS DO MILHO

A produção de milho no Brasil aumentou principalmente, com a entrada de novas tecnologias, e conseqüentemente a tecnificação dos agricultores. Essas tecnologias estão relacionadas ao desenvolvimento de novas cultivares, manejo da cultura entre outras. Nos últimos anos devido à necessidade do produtor obter alta produtividade para garantia de rentabilidade para se manter na atividade agrícola, estimulou e acarretou a expansão das fronteiras agrícolas, à ampliação das épocas de semeadura, os cultivos antecipados irrigados, e a substituição dos plantios da safra de verão, para a safrinha, no qual, corresponde a 76% da produção nacional, (CARVALHO et al., 2016), o qual têm propiciado o surgimento de novos problemas relacionados às doenças. Existem mais de 30 doença bióticas relatadas em milho no Brasil, causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides (CARVALHO et al., 2016).

Entre as doenças que afetam a parte aérea do milho, estão a cercosporiose (*Cercospora zeina*), a ferrugem polysora (*Puccinia polysora*), a ferrugem comum (*P. sorghi*), a ferrugem tropical ou ferrugem branca (*Physopella zea*), a mancha foliar de *Exserohilum turcicum*, a mancha de *Bipolaris maydis*, a mancha de *B. zeicola*, a mancha foliar de diplodia (*Stenocarpella macrospora*), a antracnose foliar do milho (*Colletotrichum graminicola*), a mancha branca (*Pantoea ananatis*) (CARVALHO et al., 2016), o mosaico comum (*Sugarcane mosaic virus*) (CARVALHO et al., 2016), e as doenças sistêmicas associadas à mollicutes, como o enfezamento vermelho (*Candidatus Phytoplasma asteris*) e o enfezamento pálido

(*Spiroplasma kunkelli*) (CARVALHO et al., 2016). Essas doenças são consideradas importantes para a cultura no Brasil pelas reduções elevadas na produtividade e pela ampla ocorrência nas principais regiões produtoras de milho (CARVALHO et al., 2016).

A importância de cada uma dessas doenças é variável de ano para ano e de região para região, devido às condições climáticas, do nível de suscetibilidade das cultivares semeadas e do manejo utilizado (COSTA et al., 2017). Atualmente, os enfezamentos do milho, têm se destacado entre as doenças mais preocupantes para a cultura nas últimas safras, pela alta incidência com perdas severas em diversas regiões do país (GALVÃO; SABATO; BEBENDO., 2021). Além das doenças anteriormente mencionadas, novos desafios têm surgido ao longo dos últimos anos, como a ocorrência da estria bacteriana do milho, causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. A ocorrência desta doença em importantes regiões produtoras como o Oeste e Sudoeste do Paraná merece atenção especial, pois não se conhece ainda seu real impacto na redução da produtividade da cultura.

## 2.3 ESTRIA BACTERIANA DO MILHO

### 2.3.1 Agente Causal

A estria bacteriana é uma doença foliar do milho de ocorrência recente no Brasil, causada pela bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894). Esta bactéria pertence à divisão Proteobactéria, é gram-negativa, não fermentativa e não fluorescente, estritamente aeróbica, com células móveis e em formato de bastonete (KORUS et al., 2017; VAUTERIN et al., 1995). As colônias apresentam coloração amarelada devido à presença de xantomadina, que é um pigmento amarelo característico de bactérias do gênero *Xanthomonas* (STARR; STEPHENS, 1964).

As bactérias do gênero *Xanthomonas* são patógenos hemibiotróficos que, inicialmente, se multiplicam em tecido vivo do hospedeiro, mas causam a morte de células vegetais em estágios posteriores da infecção (BUTTNER; BONAS, 2010). Estas causam doenças em mais de 400 diferentes hospedeiros vegetais, incluindo uma ampla variedade de culturas importantes, como arroz, trigo, citrus, tomate, pimenta, banana e feijão (TIMILSINA, 2020).

Em 1978, o patógeno que causava a estria bacteriana no milho foi inicialmente denominado de *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* (Dye 1978) por Young et al. (1978). Esta designação incluía tanto estirpes bacterianas que causavam a doença “Gumming” na cana-de-açúcar, como as que causavam doença em milho na África do Sul. Estudos foram realizados

com as estirpes de *X. campestris* pv. *vasculorum* isoladas de cana-de-açúcar e de palmeiras e inoculadas em milho, em sorgo e em cana-de-açúcar, e consideradas patógenicas para essas três culturas (QHOBELA; CATOLAFLIN, 1992). Por outro lado, isolados da bactéria obtidos de milho na África do Sul foram patogênicos somente para o milho e não para o sorgo ou para cana-de-açúcar (QHOBELA et al., 1990).

Outros isolados da bactéria que causavam a estria bacteriana no milho, provenientes da África do Sul, foram diferenciados de *X. campestris* pv. *holcicola*, agente causal da estria foliar bacteriana do sorgo, pela técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (QHOBELA et al., 1990; COUTINHO, 1988). Posteriormente, através da hibridização DNA-DNA e análise de perfis de ácidos graxos, a espécie *X. vasicola* foi proposta para agrupar os patovares *X. campestris* pv. *zeae*, *X. campestris* pv. *holcicola*, e *X. campestris* pv. *vasculorum*, mas alguns isolados de cana-de-açúcar foram separados em uma segunda espécie, *X. axonopodis* pv. *vasculorum* (DOOKUN et al., 2000; VAUTERIN et al., 1995). O patógeno da estria bacteriana do milho difere de outras espécies de *Xanthomonas* e patovares que infectam membros da família Poaceae. Assim, com base em testes de especificidade de hospedeiro e sintomas, o patógeno do milho foi reclassificado e renomeado como *Xanthomonas campestris* pv. *zeae* (COUTINHO; WALLIS, 1991).

Estudos mais recentes sobre filogenia com base em comparações genômicas por MLSA (análise de sequências multilocus) e testes de patogenicidade levaram à determinação de *Xv* como sendo o agente causal de duas doenças, o “Gumming” da cana-de-açúcar e a estria bacteriana do milho (ARITUA et al., 2008; COUTINHO et al., 2015; DOOKUN et al., 2000; HARRISON; STUDHOLME, 2014; KARAMURA et al., 2015; RADEMAKER et al., 2005; STUDHOLME et al., 2010; VAUTERIN et al., 1995; WASUKIRA et al., 2014). Em análises moleculares de identidade de nucleotídeos, os genomas do agente causal da estria bacteriana do milho no estado de Nebraska, nos EUA apresentaram similaridade de 99,3% com o genoma da estirpe de *Xv* da cana-de-açúcar da África do Sul (LANG et al., 2017). Os resultados dos testes de patogenicidade mostraram que todas as estirpes, independentemente da fonte, foram virulentas para o milho e para a cana-de-açúcar (LANG et al., 2017). Perez-Quintero et al., (2020), em estudos de filogenia confirmaram que todas as estirpes avaliadas de *Xv* dos EUA, da Argentina e da África do Sul, são originados de um único ancestral comum, o que demonstra um maior embasamento à atual classificação de *Xv* como o agente causal da estria bacteriana do milho.

### 2.3.2 Histórico da Ocorrência da Doença

O primeiro relato da estria bacteriana em milho foi na África do Sul em 1949 (DYER, 1949) e a doença permaneceu restrita ao continente africano até 2016. Desde o primeiro relato, a incidência, a severidade e a disseminação desta doença nas culturas de milho na África do Sul aumentaram significativamente. Coutinho e Wallis (1991) relataram que uma variedade comercial de milho teve que ser retirada do mercado devido à alta suscetibilidade à doença.

Em 2016, pesquisadores detectaram os sintomas dessa doença em folhas de milho no estado de Nebraska, nos EUA, sendo a primeira constatação da doença na América do Norte (KORUS et al., 2017). As folhas de milho apresentando sintomas de estria bacteriana foram observados em 51 municípios no estado de Nebraska (KORUS et al., 2017; LANG et al., 2017), em seis municípios no leste do Colorado e 16 municípios no oeste do Kansas (TESSA et al., 2019). A doença atingiu proporções epidêmicas em regiões destes três estados, com vários casos de incidências da estria em níveis superiores à 90% e severidades que atingiram mais de 50% da área foliar das plantas de milho (BRODERS, 2017). Também foi identificada a doença em lavouras de milho nos estados de Iowa, Illinois, Oklahoma, Dakota do Sul, Texas, Minnesota e Wisconsin (KORUS et al., 2017; LANG et al., 2017; SMITH et al., 2018). Em 2017, a doença voltou a ocorrer em níveis significativos no leste do Colorado, Nebraska e Kansas. A ocorrência da estria bacteriana também foi constatada em 2018 e 2019 (TESSA et al., 2019). Na Argentina, a doença foi relatada mais especificamente nas províncias de Córdoba, Buenos Aires, Santa Fé, San Luis, Entre Ríos, Santiago del Estero, Corrientes, Chaco, Tucumán e Salta (BRODERS et al., 2017; PLAZAS et al., 2018).

No Brasil, a primeira suspeita da ocorrência da estria bacteriana foi no ano de 2016, em áreas experimentais de milho no município de Cafelândia, na região Oeste do Paraná, mas não foi considerado um problema para a cultura. Na safra de 2018, a incidência da doença aumentou, e foi confirmada a ocorrência de uma nova bacteriose por diagnóstico molecular e notificada oficialmente pela primeira vez no Brasil, em lavouras de milho da região Oeste do Paraná (LEITE JÚNIOR et al., 2019a).

Desde sua primeira constatação, a disseminação da doença ocorreu rapidamente entre os municípios da região Oeste do Paraná, como Assis Chateaubriand, Cascavel, Corbélia, Marechal Cândido Rondon, Nova Aurora, Nova Santa Rosa, Ouro Verde do Oeste, Palotina, Pato Bragado, Quatro Pontes, Santa Helena, Santa Tereza do Oeste, São José das Palmeiras, São Miguel do Iguçu, Toledo, Entre Rios do Oeste, Ubiratã e Vera Cruz do Oeste; da região Sudoeste do Paraná, em Francisco Beltrão; da região Centro-Oeste do Estado, como Campo

Mourão e Floresta; e da região Norte de Paraná, em Assaí, Londrina, Rolândia, Sertanópolis, Mandaguari e Marialva (LEMISKA et al., 2019; LEITE JÚNIOR et al., 2019b). A bacteriose foi constatada em pelo menos 30 diferentes híbridos comerciais de milho (LEITE JÚNIOR et al., 2019b). Do ano de 2020 até hoje, existem poucos relatos da ocorrência da doença na literatura no Brasil, no LABAC apenas um caso confirmado como estria bacteriana no estado do Paraná (Dados não divulgados).

### 2.3.3 Sintomatologia

Os sintomas iniciais da doença são caracterizados pelo aparecimento nas folhas de pequenas pontuações translúcidas e encharcadas, anasarca, que se expandem ao longo dos tecidos internervais (Figura 2.1A), formando estrias alongadas com bordas onduladas e irregulares (BRODERS, 2017). As lesões são de coloração amarela intensa a marrom, lesão necrótica, e podem coalescer e atingir grande parte do limbo foliar (Figura 2.1B e 2.1C). As lesões podem variar em quantidade, formato e tamanho, de acordo com a suscetibilidade do genótipo de milho e, sob condições de ataque severo, também podem ser observadas nas brácteas das espigas (LEITE JÚNIOR et al., 2019b). Uma característica dessas lesões é apresentar exsudação bacteriana na forma de gotículas pequenas, secas e amarelas, o que auxilia na dispersão e sobrevivência da célula bacteriana (GOTO; HYODO, 1985). Geralmente, os sintomas começam pela parte inferior da planta, nos estágios fenológicos vegetativos iniciais das plantas de milho, V4 (BRODERS et al., 2017) ou V7 (LEITE JÚNIOR et al., 2019b). À medida que a planta se desenvolve, a doença pode passar a ocorrer nas folhas superiores (BRODERS et al., 2017).

Os sintomas da estria bacteriana podem ser confundidos com os da cercosporiose do milho causada pelo fungo *Cercospora zea-maydis* (HYRE, 1943). Entretanto, os sintomas de cercosporiose são estrias que se desenvolvem paralelas às nervuras, mas tem formas predominantemente retangulares e bordas retas, o que os diferencia dos sintomas da estria bacteriana, onde as bordas das lesões são onduladas. Quando as lesões da cercosporiose são retroiluminadas, a luz não passa facilmente através das lesões, sendo mais opacas quando comparadas com as lesões translúcidas causadas por *Xvv* (JOHNSON JERRY et al., 2017).



**Figura 2.1** - Sintomas da estria bacteriana do milho. (A) Lesões iniciais no formato de pequenas pontuações encharcadas. (B) Lesões alongadas, estreitas, e com bordas onduladas e restritas às regiões internervais. (C) Lesões coalescentes e necróticas. Foto: Próprio autor.

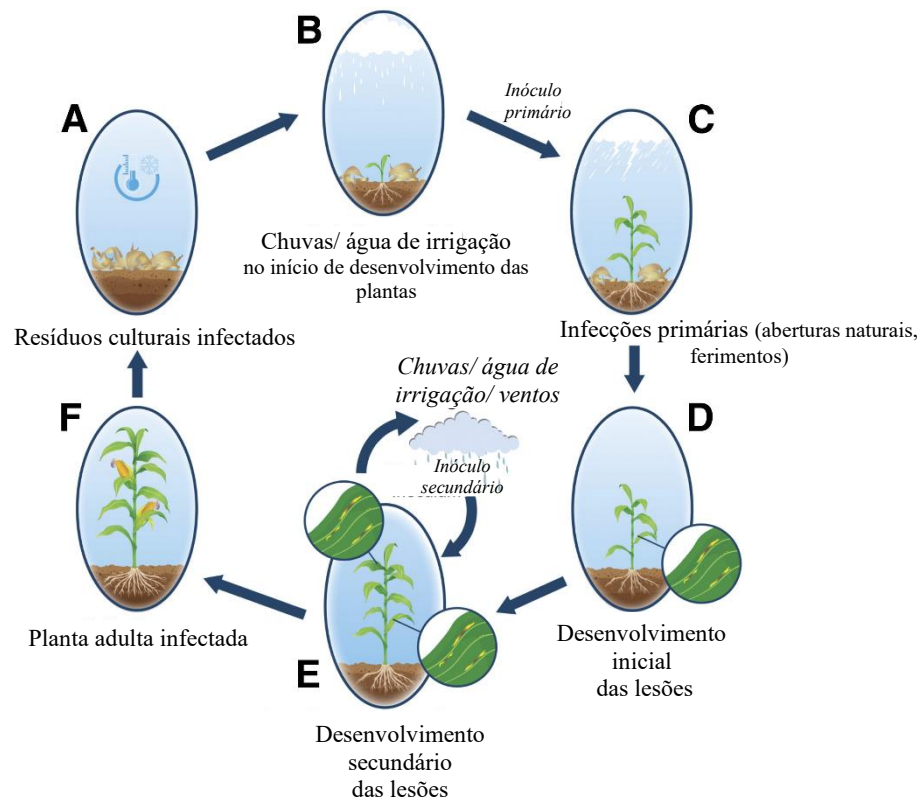
### 2.3.4 Ciclo da Doença

A bactéria *Xvv* pode sobreviver em resíduos culturais de milho infectados, remanescentes da estação de crescimento anterior e possivelmente também em hospedeiros alternativos, como outras plantas cultivadas e invasoras (BRODERS, 2017). As superfícies foliares de plantas com sintomas de estria bacteriana liberam exsudatos pelos quais a bactéria pode ser disseminada para plantas vizinhas pela água de chuva e/ou irrigação, ou mesmo por vento em dias secos (BRODERS, 2017; ORTIZ-CASTRO et al., 2020).

O patógeno pode infectar a planta através de aberturas naturais como os estômatos ou por ferimentos, e a colonização do tecido foliar aparentemente é limitada pelas nervuras principais. A bactéria coloniza basicamente o tecido apoplástico, não invadindo o sistema vascular da planta (ORTIZ-CASTRO, 2019). A alta umidade favorece o desenvolvimento da doença. Não há dados sobre as temperaturas ótimas para o crescimento e sobrevivência de *Xvv*. De acordo com Koizumi (1985), para outras *Xanthomonas*, como *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, pode ocorrer crescimento bacteriano entre 6 e 36°C. Entretanto, temperaturas entre 15 e 35°C são as ótimas para infecções e para o desenvolvimento dos sintomas da doença causada por essa bactéria (PELTIER, 1920). Assim, é provável que as temperaturas ótimas para o

crecimento de *Xvv* sejam semelhantes às temperaturas reportadas acima, uma vez que esta variação ocorre frequentemente durante a época de cultivo do milho.

Os sintomas da estria bacteriana são tipicamente observados inicialmente na parte inferior da planta e começam a progredir para as folhas superiores geralmente após a irrigação ou eventos de chuva acompanhados de vento (ORTIZ-CASTRO et al., 2020). Estas condições ambientais são favoráveis para a disseminação de *Xvv*. De meados até o final do período fenológico de cultivo do milho, a bactéria continua a se disseminar na lavoura e permanece nos resíduos culturais na superfície do solo após a colheita. Os resíduos culturais se convertem em fonte de inóculo inicial para a próxima safra (ORTIZ-CASTRO et al., 2020) (Figura 2.2). Estudos revelaram que é comum encontrar a doença em áreas sob produção contínua de milho, mas já foi também observada em áreas de rotação de cultura, após soja e trigo, ou pousio (JOHNSON JERRY et al., 2016).



**Figura 2.2** - Ciclo da estria bacteriana do milho causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* proposto por Ortiz-Castro et al. (2020), adaptado por Longhi.

Experimentos realizados para avaliar o potencial de transmissão de *Xvv* de sementes para plântulas de milho demonstraram que em sementes de milho contaminadas artificialmente,

a doença ocorreu consistentemente a partir de inoculações com suspensões bacterianas em concentrações superiores ou iguais a  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Isso sugere que é necessário um limiar de população da bactéria nas sementes para o desenvolvimento de sintomas da estria bacteriana e recuperação de células vivas (ARIAS et al., 2020). O isolamento da bactéria a partir de sementes colhidas em áreas onde a doença ocorreu com severidade elevada resultaram em baixo nível de bactérias. Aparentemente, essa concentração baixa de bactérias não seria suficiente para resultar em plântulas doentes, sugerindo baixos níveis de transmissão da bactéria por essa via (ARIAS et al., 2020). Arias et al. (2020) somente conseguiram detectar sobrevivência de *Xvv* em sementes de milho contaminadas naturalmente em um nível muito baixo, entre 0,1 e 0,5%, em oito lotes de sementes testados. Não foram encontradas evidências de colonização sistêmica de plantas e, portanto, acredita-se que a contaminação de sementes por *Xvv* é principalmente superficial (ARIAS et al., 2020).

As informações sobre essa bactéria são ainda muito limitadas. Entre as questões desconhecidas podem ser incluídas, quais os tecidos da planta que a bactéria é capaz de infectar, qual o tempo de sobrevivência em solo e em resíduos de cultura, qual a origem do inóculo inicial em cada safra, quais variáveis climáticas favorecem o desenvolvimento da doença, e quais são as plantas hospedeiras alternativas (BRODERS, 2017).

### **2.3.5 Danos Econômicos Potenciais**

O impacto na produtividade da cultura do milho causado pelas doenças depende de quanto da área foliar é afetada ou destruída. Quando a área foliar é afetada ou comprometida, ela reduz a capacidade fotossintética da planta e conseqüentemente o enchimento dos grãos (JACKSON-ZIEMS et al., 2016). As perdas normalmente são mínimas se os sintomas das doenças ocorrerem no final do ciclo da cultura, ou seja, se não houver desenvolvimento já durante o enchimento dos grãos (JOHNSON JERRY et al., 2016). Da mesma maneira, não existem informações de como a estria bacteriana afeta a qualidade dos grãos (JOHNSON JERRY et al., 2016) como o teor de amido, óleo e proteína. A severidade dos sintomas da estria bacteriana pode alcançar aproximadamente 40% da área foliar da planta infectada em híbridos suscetíveis de milho (JARDINE; CAFLIN, 2016). Estudos realizados nos Estados Unidos revelaram que em algumas regiões, onde a doença se tornou epidêmica, os níveis da incidência da doença foram maiores do que 90% e a severidade acima de 50% em híbridos suscetíveis de milho (BRODERS, 2017).

### 2.3.6 Medidas de Manejo

Há pouca informação disponível sobre o manejo da estria bacteriana por ela ser de ocorrência relativamente recente. Entretanto, os híbridos de milho comercialmente disponíveis diferem na suscetibilidade à doença, e demonstram uma grande variação no nível de severidade da estria bacteriana (BRODERS, 2017, HARTMAN, 2018; ROBAINA et al., 2020). Assim, a resistência de híbridos de milho à estria bacteriana tem mostrado ser uma característica multigênica (QIU et al., 2020). Devido os híbridos poderem ser avaliados rapidamente quanto à resistência genética, a utilização de híbridos menos suscetíveis seria a medida mais eficiente e simples de controlar a estria bacteriana do milho (ROBAINA et al., 2020).

Como para várias outras doenças bacterianas de plantas, medidas eficazes de controle químico ainda são escassas para a estria bacteriana. Longhi et al., (2022) avaliaram a sensibilidade *in vitro* de isolados de *Xvv* a diferentes produtos químicos fungicidas, bactericidas e fertilizante foliar agromineral e avaliaram o controle da estria bacteriana sob condições de casa de vegetação. Foi possível observar que os isolados de *Xvv* apresentaram variações na sensibilidade aos produtos químicos testados. A casugamicina, sulfato de cobre, oxicloreto de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso, cobre bioativo e mancozebe inibiram o crescimento dos isolados bacterianos *in vitro*. Nos estudos *in vivo*, o oxicloreto de cobre foi o único produto testado que reduziu significativamente a incidência e severidade da estria bacteriana (73% de redução) em plantas de milho inoculadas artificialmente. Os produtos à base de cobre foram fitotóxicos para plantas de milho na concentração utilizada e no estágio de crescimento em que foi aplicado.

Portanto, a identificação adequada da doença é importante para evitar gastos desnecessários com aplicações de produtos que não serão eficientes no controle da doença. Assim, o manejo da estria bacteriana deve seguir as medidas gerais de controle de doenças causadas por bactérias em plantas e também, considerando as características específicas da doença e de seu patógeno.

Dentre as recomendações de manejo sugeridas, estão as medidas fitossanitárias como rotação de culturas com espécies não hospedeiras da bactéria, controle de plantas de milho voluntárias na entressafra, controle de plantas invasoras hospedeiras de *Xvv*, em especial as gramíneas que podem ser potenciais hospedeiras alternativas, destruição de resíduos culturais, e a desinfestação de equipamentos (HARTMAN; JACKSON-ZIEMS, 2017; LEITE JÚNIOR et al., 2019b). A utilização de sementes com sanidade comprovada também tem relevância dentro do manejo da estria bacteriana, embora, estudos tenham demonstrado que a transmissão

da bactéria via sementes ocorre em taxas muito baixas (ARIAS et al., 2020). É importante ressaltar que as medidas culturais podem oferecer algum grau de controle da estria bacteriana, através da redução do inóculo primário presente, porém se fazem necessários estudos mais aprofundados sobre vários aspectos epidemiológicos da doença e de seu patógeno (JOHNSON JERRY et al., 2017; LEITE JÚNIOR et al., 2019b).

#### **2.4 SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum***

O conhecimento da sobrevivência de bactérias fitopatogênicas em condições de campo possibilita a adoção das práticas mais adequadas para o manejo de doenças por elas causadas. Cabe salientar que a manutenção de inóculo viável entre ciclos da cultura apresenta grande potencial para dar início à novas epidemias de doenças (SILVA JÚNIOR et al., 2020). As bactérias fitopatogênicas que causam danos em plantas de interesse econômico não formam esporos ou outras estruturas de resistência. No entanto, podem sobreviver, dependendo da espécie considerada, associadas às sementes ou outras partes propagativas, em órgãos vegetais infectados, em resíduos de cultura, no solo, como residentes e epifiticamente, ou no interior de plantas voluntárias da própria cultura, ou em plantas invasoras hospedeiras (SCHUSTER; COYNE, 1974; RYAN et al., 2011; GONÇALVES et al., 2018).

A sobrevivência das bactérias fitopatogênicas é influenciada normalmente por diversos fatores ambientais, como temperatura, precipitação e umidade relativa do ar, e de características químicas, físicas e biológicas do solo (DE BOER, 1982; LENNON et al., 2012). Geralmente, as bactérias fitopatogênicas sobrevivem no solo em temperaturas que variam entre 20 e 37°C (DE BOER, 1982). Além disso, a sobrevivência da maioria das bactérias fitopatogênicas é favorecida quando os resíduos da cultura infectados com o patógeno são mantidos na superfície do solo (SILVA JÚNIOR, 2011).

Estudos foram conduzidos em campo sobre a sobrevivência de *Xvv* em resíduos culturais de milho, comparando resíduos de plantas infectadas mantidos na superfície do solo e incorporados a 10 cm de profundidade, e não conseguiram recuperar células viáveis após seis meses da instalação do ensaio. No entanto, foi realizada a técnica de detecção molecular PCR em tempo real (qPCR), e os resultados confirmaram a presença de *Xvv* em ambas amostras, mas não foi possível afirmar se as bactérias estavam vivas ou mortas, porém detectaram que haviam diferenças significativas na quantidade de *Xvv* nas duas condições (ORTIZ-CASTRO, 2019). As amostras mantidas na superfície do solo apresentaram quantidades maiores de células de *Xvv* as amostras incorporadas ao solo (ORTIZ-CASTRO, 2019). Este comportamento se deve

provavelmente à maior ação de decomposição da microbiota do solo, reduzindo a população de *Xvv* em resíduos culturais enterrados (JOHNSON JERRY et al., 2017; ORTIZ-CASTRO, 2019).

Há relatos de que a maioria das bactérias fitopatogênicas sobrevivem melhor em condições secas, ou seja, quando os resíduos culturais são mantidos na superfície do solo (SILVA JÚNIOR et al., 2012). Nessas condições, as células bacterianas se encontram em estado hipobiótico, e estão protegidas da ação de diferentes fatores ambientais (SCHUSTER; COYNE, 1977). Resíduos culturais incorporados ao solo estão sujeitos à uma decomposição acelerada, e consequentemente à condições menos favoráveis para a sobrevivência de bactérias fitopatogênicas (SILVA JÚNIOR et al., 2012).

## 2.5 PLANTAS HOSPEDEIRAS DE *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*

Ao gênero *Xanthomonas* pertencem bactérias que causam doenças em centenas de espécies vegetais, incluindo muitas culturas economicamente importantes. Espécies patogênicas e seus patovares mostram um alto grau de especificidade de plantas hospedeiras e muitas exibem especificidade na colonização dos tecidos da planta, invadindo o sistema vascular ou permanecendo restritas aos tecidos do mesófilo (RYAN et al., 2011).

A bactéria *Xvv* tem uma extensa gama de hospedeiros sintomáticos (Tabela 2.1). Na cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) causa a doença vascular denominada “Gumming” (NORTH, 1935) que ocorre em diversas regiões do mundo, como África, Austrália, Argentina, Colômbia, Cuba, e Índia (SAUMTALLY et al., 2000). Também causa doenças em outras espécies de monocotiledôneas, como o milho (*Zea mays*) (DYER et al., 1949), a aveia (*Avena sativa*), o arroz (*Oryza sativa*) (HARTMAN et al., 2020) e o sorgo (*Sorghum bicolor*) (KORUS et al., 2017; LANG et al., 2017). De acordo com Ricaud e Autrey (1989) e Coutinho (2015), a bactéria também causa doenças em diversas espécies de palmeiras (*Dictyosperma album*, *Eucalyptus grandis*, *Roystonea regia*, *Areca catechu*) e em capim-chinês ou capim-bambu (*Thysanolaena maxima*).

Entre os hospedeiros sintomáticos, estão também plantas de pastagens perenes, gramas e algumas plantas paisagísticas, como dactilo-comum (*Dactylis glomerata*), ‘Sorghas trun nutans’, ‘big bluestem’ (*Andropogon gerardii*), ‘little bluestem’ ou capim-barba (*Schizachyrium scoparium*), ‘timothy’ (*Phleum pratense*), e ‘sand bluestem’ (*Andropogon hallii*) (HARTMAN et al., 2020).

As plantas daninhas relatadas como hospedeiras incluem milhã-de-cabecinha ou milhã-

verde (*Setaria viridis*), carrapiço (*Setaria verticillata*) e capim-massambará (*Sorghum halepense*) (HARTMAN et al., 2020). A junça ou junquinha-mansa (*Cyperus esculentus*) pertencente à família Cyperaceae também é considerada uma hospedeira sintomática (HARTMAN et al., 2020).

Em recente artigo, Hartman et al. (2020) demonstraram que existem três hospedeiros alternativos assintomáticos, como bromo-vassoura (*Bromus tectorum*), festuca (*Festuca arundinacea*) e ‘wheat grass ocidental’ (*Pascopy umsmithii*), os quais são colonizados endofiticamente por *Xv* (HARTMAN et al., 2020). Essa ampla gama de hospedeiros provavelmente se deve à plasticidade do genoma de *Xanthomonas* spp., o que torna a bactéria altamente adaptável à diferentes hospedeiros e ambientes (THIEME et al., 2005).

**Tabela 2.1** - Hospedeiros sintomáticos e assintomáticos de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* relatados na literatura.

<b>Categoria das Plantas/ Resposta de inoculação</b>	<b>Família botânica</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Fonte</b>
Anuais cultivadas e de adubação verde/ Sintomáticas	Poaceae	<i>Avena sativa</i>	Aveia	Lang et al., 2017; Hartman et al., 2020
	Poaceae	<i>Oryza sativa</i>	Arroz	Hartman et al., 2020
	Poaceae	<i>Saccharum officinarum</i>	Cana-de-açúcar	North, 1935; Vauterin et al., 1995; Dookun et al., 2000
	Poaceae	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo	Korus et al., 2017; Lang et al., 2017
	Poaceae	<i>Zea mays</i>	Milho	Dyer et al., 1949
Pastagens perenes, gramas e paisagísticas/ Sintomáticas	Poaceae	<i>Andropogon gerardii</i>	‘Big bluestem’	Hartman et al., 2020
	Poaceae	<i>Andropogon hallii</i>	‘Sand bluestem’	Hartman et al., 2020
	Poaceae	<i>Areca catechu</i>	Palmeira	Ricaud e Autrey.,1989
	Poaceae	<i>Dactylis glomerata</i>	Dáctilo comum	Hartman et al., 2020
	Poaceae	<i>Dictyosperma album</i>	Palmeira	Ricaud e Autrey.,1989
	Poaceae	<i>Phleum pratense</i>	‘Timothy’	Hartman et al., 2020
	Poaceae	<i>Roystonea regia</i>	Palmeiraa	Ricaud e Autrey.,1989
	Poaceae	<i>Schizachyrium scoparium</i>	‘Little bluestem’	Hartman et al., 2020
	Poaceae	<i>Sorghastrum nutans</i>	-	Hartman et al., 2020
	Poaceae	<i>Thysanolaena maxima</i>	Capim-chinês	Ricaud e Autrey.,1989
Pastagens perenes/ Assintomáticas	Myrtaceae	<i>Eucalyptus grandis</i>	Palmeira	Coutinho et al., 2015
	Poaceae	<i>Festuca arundinacea</i>	Festuca	Hartman et al., 2020
Invasoras/ Sintomáticas	Poaceae	<i>Pascopyum smithii</i>	‘Wheat grass ocidental’	Hartman et al., 2020
	Cyperaceae	<i>Cyperus esculentus</i>	Junça	Hartman et al., 2020
	Poaceae	<i>Setaria verticillata</i>	Carrapiço	Hartman et al., 2020
	Poaceae	<i>Setaria viridis</i>	Milhã-de-cabecinha	Hartman et al., 2020
	Poaceae	<i>Sorghum halepense</i>	Capim-massambará	Hartman et al., 2020
Invasoras/ Assintomáticas	Poaceae	<i>Bromus tectorum</i>	Bromo-vassoura	Hartman et al., 2020

### 3 ARTIGO A IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS HOSPEDEIRAS DE *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, AGENTE CAUSAL DA ESTRIA BACTERIANA DO MILHO

#### 3.1 RESUMO

A estria bacteriana do milho (*Zea mays*) causada pela bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xv*) foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2019. No presente estudo, 52 espécies de plantas anuais cultivadas, forrageiras e invasoras, que ocorrem na cultura do milho ou que fazem sucessão e rotação de cultura com o milho, foram inoculadas com *Xv* sob condições de casa de vegetação, com o objetivo de identificar potenciais hospedeiros alternativos da bactéria. Foram investigadas (i) a patogenicidade de *Xv* pelo desenvolvimento de infecções e sintomas e pelo reisolamento da bactéria; (ii) a colonização epifítica da bactéria em plantas assintomáticas; e (iii) a colonização bacteriana dos tecidos das plantas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em algumas espécies sintomáticas e assintomáticas. Somente dez espécies de plantas, todas pertencentes à família Poaceae, apresentaram sintomas: *Avena sativa* (aveia ‘IPR Afrodite’, ‘IPR Esmeralda’), *Avena strigosa* (aveia preta cv. IPR 161), *Hordeum vulgare* (cevada cv. BRS Cauê), *Oryza sativa* (arroz cv. IPR 117), *Brachiaria brizantha*, (braquiária cv. Brizantha, cv. Marandu), *Digitaria horizontalis* (capim-colchão), *Digitaria insularis* (capim-amargoso), *Echinochloa colonum* (capim-arroz), *Eleusine indica* (capim-pé-de-galinha), e *Sorghum arundinaceum* (falso-massambará). Além disso, a colonização epifítica por *Xv* foi observada em 23 espécies de plantas assintomáticas. As micrografias de varredura revelaram células e agregados de *Xv* distribuídas na superfície foliar e, através das fraturas de tecido, foi observada a colonização pela bactéria do tecido intercelular na câmara subestomática de aveia branca, de aveia preta e de milho. Embora o arroz foi constatado como espécie sintomática, o exame por MEV somente mostrou evidências de colonização de *Xv* na superfície foliar. Em espécies assintomáticas como o centeio, o sorgo e o milheto foram constatados pequenos números de células bacterianas na superfície foliar. Entretanto, nas fraturas do milheto não foram observadas evidências de colonização interna de tecidos, sugerindo que a *Xv* sobrevive somente de forma epifítica nessas espécies.

**Palavras-chave:** Colonização epifítica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), patogenicidade, sintomatologia, *Zea mays*.

### 3.2 INTRODUÇÃO

A estria bacteriana do milho, causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*), é uma doença bacteriana recentemente relatada no Brasil (LEITE JÚNIOR et al., 2019a). Além do Brasil, foi também relatada sua ocorrência em lavouras de milho nos Estados Unidos da América (EUA) e na Argentina (BRODERS et al., 2017; DAMICONE et al., 2018; JAMANN et al., 2019; KORUS et al., 2017; PLAZAS et al., 2018; LEITE JÚNIOR et al., 2019b). No Brasil, a estria bacteriana encontra-se presente em vários municípios das regiões Norte e Oeste do estado do Paraná e tem se mostrado um grande desafio para a pesquisa agrícola e para os agricultores brasileiros (LEITE JÚNIOR et al., 2019b).

Os sintomas iniciais da doença no milho são caracterizados pela presença de pequenas pontuações translúcidas e encharcadas, anasarca nas folhas, que se expandem ao longo dos tecidos internervais, formando estrias alongadas com bordas onduladas e irregulares (BRODERS, 2017; LEITE JÚNIOR et al., 2019b). As lesões são de coloração amarela intensa a marrom, e depois se tornam necróticas. Além do milho, outras espécies vegetais também têm sido relatadas como hospedeiras de *Xvv*. Em 1935, em New South Wales na Austrália, foi relatada a ocorrência de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) infectadas pela bactéria, manifestando sintomas da doença vascular denominada de “Gumming” (NORTH, 1935). Essa doença ocorre em diversas regiões produtoras de cana-de-açúcar do mundo (ROTT; GIRARDI, 2000). Algumas décadas mais tarde, as palmeiras *Areca catechu*, *Dictyosperma album*, e o *Eucalyptus grandis*, *Roystonea regia*, e o capim-chinês (*Thysanolaena maxima*) foram descritas como hospedeiras dessa bactéria (RICAUD; AUTREY., 1989). Recentemente, nos EUA foram relatadas outras espécies de plantas monocotiledôneas anuais como hospedeiras de *Xvv*, incluindo a aveia (*Avena sativa*), o arroz (*Oryza sativa*) e o sorgo (*Sorghum bicolor*) (HARTMAN et al., 2020; KORUS et al., 2017; LANG et al., 2017).

De acordo com Schuster e Coyne (1974; 1977), diversas bactérias podem sobreviver entre os ciclos de cultivo da cultura em hospedeiros alternativos anuais e perenes, muitas vezes sem apresentarem sintomas que evidenciem alguma infecção. Essa sobrevivência pode ser uma importante fonte de inóculo para os cultivos posteriores. O conhecimento da sobrevivência da bactéria *Xvv* em plantas cultivadas ou de crescimento espontâneo, é fundamental para o manejo da doença em áreas produtoras de milho. A patogenicidade de *Xvv* em aveia, arroz, cana-de-açúcar e sorgo já foi demonstrada experimentalmente por inoculação artificial nos EUA (KORUS et al., 2017; LANG et al., 2017), mas o potencial dessas e outras plantas serem importantes hospedeiros alternativos da bactéria ainda não foi investigado no Brasil.

No presente estudo, plantas mono e dicotiledôneas anuais cultivadas, forrageiras e invasoras que ocorrem na cultura do milho ou que fazem sucessão e rotação com o milho, foram inoculadas artificialmente com *Xvv* sob condições controladas em casa de vegetação com o objetivo de identificar potenciais hospedeiros alternativos da bactéria. Para isso, foram investigadas (i) a patogenicidade de *Xvv* para as diferentes espécies vegetais pela presença visual de sintomas e pelo reisolamento da bactéria; (ii) a colonização epifítica pela bactéria de plantas assintomáticas; e (iii) a colonização bacteriana de tecidos de plantas pelo exame de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em algumas espécies que se mostraram sintomáticas e assintomáticas.

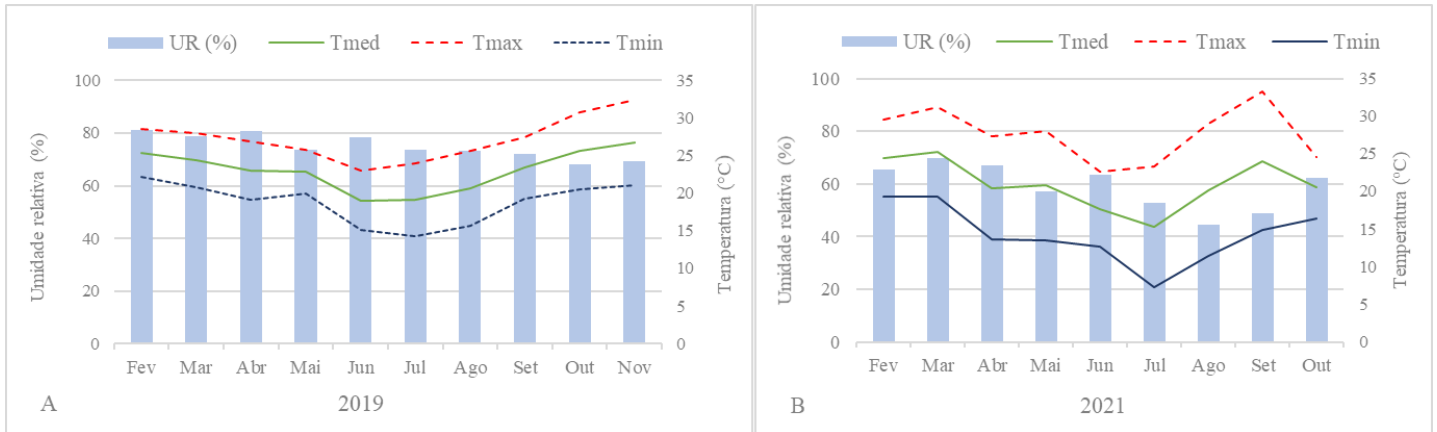
### **3.3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.3.1 Origem e Cultivo das Espécies Vegetais**

Neste estudo, foram incluídas 52 espécies vegetais, sendo 28 espécies monocotiledôneas e 24 dicotiledôneas (Tabela 3.1). Além disso, foram testados mais de um cultivar para algumas espécies, como *Aveia sativa*, *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum*, totalizando 58 genótipos. Os cultivares de milho comum cultivar IPR 164 e de milho branco IPR 127 foram incluídos como padrões de hospedeiros suscetíveis e sintomáticos à estria bacteriana (ROBAINA et al., 2020). As sementes de plantas anuais cultivadas, de adubação verde, forrageiras e invasoras foram fornecidas pelas áreas de Proteção de Plantas e de Melhoramento Genético e Propagação Vegetal do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR-EMATER (IDR-Paraná), Londrina, PR, Brasil. E as sementes de plantas de pastagens foram fornecidas pela Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

Cada espécie foi semeada separadamente em vasos de polietileno de 8 L, contendo mistura de solo, areia e esterco na proporção de 3:1:1. O número de sementes por vaso variou de acordo com a espécie e o tamanho da semente. Após a emergência, foi realizado raleio deixando pelo menos 10 plantas por vaso para as gramíneas forrageiras e plantas invasoras, e de 3 a 10 plantas para as espécies anuais cultivadas, dependendo do tamanho da planta. Para cada genótipo foram utilizados quatro vasos, sendo um controle negativo e três inoculados com suspensão da bactéria *Xvv*. As plantas foram mantidas em casa de vegetação semi-climatizada no IDR-Paraná em Londrina, PR, Brasil, sob controle parcial de temperatura mínimas e máximas e de umidade relativa do ar (Figura 3.1).

**Figura 3.1** - Temperaturas máximas (Tmax), mínimas (Tmin) e médias (Tmed) (°C) e umidade relativa do ar (UR) (%) em casa de vegetação semi-climatizada no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná-IAPAR-EMATER, Londrina, PR, Brasil, durante os períodos de (A) fevereiro a novembro de 2019 e de (B) fevereiro a outubro de 2021.



### 3.3.2 Isolado de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* e Inoculação das Plantas

O isolado de *Xv*v RL1 (LEITE et al., 2019a), pertencente à coleção de bactérias fitopatogênicas do Laboratório de Bacteriologia do IDR-Paraná (LABAC), Londrina, PR, Brasil, foi utilizado nas inoculações das plantas no presente estudo. A identidade da cultura bacteriana foi confirmada por PCR segundo Lang et al., (2017). Na PCR foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para *Xv*v, *Xv*v3\_F (5'-CAAGCAGAGCATGGCAAAC-3') e *Xv*v3\_R (5'-CACGTAGAACCGGTCTTTGG-3') que amplificam fragmento de 207 pb do genoma da bactéria (LANG et al., 2017). A patogenicidade do isolado bacteriano foi confirmada por inoculação artificial em plantas de milho cultivar IPR 164, mantidas em casa de vegetação.

As suspensões bacterianas utilizadas para as inoculações foram preparadas utilizando o isolado RL1 crescido em meio de cultura Ágar Nutriente (AN) por 24-72 horas a 28 °C. A parte aérea das plantas foi inoculada por aspersão até o ponto de escorrimento com a suspensão bacteriana na concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (DO<sub>600</sub> = 0,1) (Genesys™ 150, Thermo Fischer Scientific, Madison, WI, EUA). As plantas controle negativo foram aspergidas com água destilada esterilizada. Todas as plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 h antes e após a inoculação. As plantas de milho foram inoculadas no estágio de desenvolvimento vegetativos V3-V4. As plantas de arroz, aveia, milheto, trigo, triticale, trigo mourisco e nabo forrageiro foram inoculadas aos 17 dias após a semeadura, quando apresentavam cinco ou mais folhas. A

*Crotalaria spectabilis*, o feijão guandu, o tremoço branco e as demais plantas foram inoculadas aos 30 dias após a semeadura. Os experimentos foram repetidos por pelo menos duas vezes.

### **3.3.3 Determinação da Patogenicidade em Diferentes Plantas e da Sobrevivência Epifítica de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum***

A patogenicidade de *Xvv* para diferentes plantas foi determinada pelo desenvolvimento de sintomas e reisolamento bacteriano, conforme requerido para completar os postulados de Koch (LANG et al., 2017). Aos quinze dias após a inoculação (DAI), as plantas foram examinadas visualmente para determinar a presença de eventuais sintomas nas folhas inoculadas. Constatada a presença de sintomas, as folhas sintomáticas foram coletadas, levadas ao laboratório e submetidas ao processo de reisolamento de *Xvv*. Para isso, foram cortados pequenos pedaços de 2 a 4 mm da área de transição entre tecido sadio e doente, emergidos em álcool 70% por 1 min, transferidos para hipoclorito de sódio 1% por 1 min e lavados três vezes em água destilada esterilizada. Após desinfestação superficial, os pedaços de tecido foram macerados em água esterilizada e após 5 min, foi depositado em placas contendo meio ágar nutriente (AN), espalhadas com alça de Drigalski. Após 24-72 horas, as placas foram examinadas para determinar a presença de colônias bacterianas mucoides e amarelas típicas de *Xvv*. A identidade das colônias bacterianas foi confirmada por PCR como descrito em 3.3.4. Foi considerada planta sintomática, aquela que apresentou algum sintoma visual de infecção bacteriana e que foi confirmada positiva para *Xvv* por PCR, em pelo menos um dos experimentos realizados.

As plantas que não apresentaram sintomas visuais de infecção por *Xvv* foram submetidas ao isolamento da população bacteriana epifítica. No primeiro experimento foi realizada avaliação da população bacteriana epifítica das amostras foliares aos 21 DAI, e no segundo, foram realizadas avaliações aos 15, 21 e 30 DAI.

Para a avaliação da população epifítica, aproximadamente 1 g de folhas foi colocado em 50 ml de tampão PBS (6,25 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,75 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g peptona bacteriológica, 1 L água destilada, 1 gota de Tween 20) (LEITE JÚNIOR, 1986), em erlenmeyer de 125 mL e submetida à agitação (150 rpm) a 28 °C por 1 h. Em seguida, as amostras foram diluídas até  $10^{-2}$  em tampão PBS e inoculadas em placas de petri contendo meio AN suplementado com ciclohexamida (50 mg  $\text{mL}^{-1}$ ). As placas foram mantidas a 28 °C e avaliadas após 24-72 h. A população bacteriana epifítica foi determinada com base na contagem das colônias crescidas no meio, e expressas em UFC ( $\text{Log}_{10} \text{g}^{-1}$ ). Foram selecionadas de 5 a 10 colônias por placa para confirmação da

identidade por PCR segundo metodologia descrita em 3.3.4.

### 3.3.4 Teste da PCR para *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*

O DNA total de cada cultura bacteriana foi obtido a partir de suspensão de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> submetido a 100 °C em banho maria por 5 min, seguido de resfriamento rápido em gelo (GONÇALVES et al., 2017). A reação da PCR foi realizada utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para *Xvv*, *Xvv3\_F* e *Xvv3\_R* descrito no item 3.3.2 que amplificam fragmento de 207 pb do genoma da bactéria (LANG et al., 2017). O volume final da reação foi 25 µL onde foram incluídos: 1,0 µL de cada iniciador (0,5 mM), 1,0 µL de dNTP (5 mM), 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,5 µL de tampão (1X), 0,2 µL de Taq DNA Polymerase Recombinant (5 U µL<sup>-1</sup>), 17,5 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA total. Foram realizados 30 ciclos de amplificação, compreendendo desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento dos iniciadores a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min termociclador Verit 96 well (Applied Biosystems™, Marsiling, Woodlands, Singapura).

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (TAE 50X: Tris, ácido acético glacial e EDTA). O controle positivo foi a amostra de *Xvv* inoculada em milho. O gel foi pré-corado com brometo de etídio (0,1 µg mL<sup>-1</sup>) e a voltagem utilizada foi de 100 V por 35 min. Os produtos de PCR foram visualizados e fotodocumentados com equipamento L-PIX EX (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil).

### 3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Tecidos foliares sintomáticos de aveia cv. IPR Afrodite e cv. IPR Esmeralda, aveia preta cv. IPR 161, milho cv. IPR 164, arroz cv. IPR 117, milheto cv. IPR Santa Teresa do Oeste, sorgo cv. BRS 658 e centeio cv. IPR 89 foram cortados com furador com diâmetro de 0,5 mm. As amostras foliares foram preparadas para a microscopia eletrônica de varredura no laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil. O material foi fixado em glutaraldeído 2,5 % + paraformaldeído 3% + tampão cacodilato de sódio 0,2 M (pH 7,2) por 4 horas, seguido de lavagens em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (3 × 10 min cada) e pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% (OsO<sub>4</sub>) por uma hora. As amostras foram novamente submetidas à lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (3 × 10 min cada) e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%) por 10 min cada, com exceção da concentração de 100% na

qual foram realizadas duas lavagens de 10 min cada. Posteriormente, os espécimes foram levados à secagem ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido (Critical Point Dryer- CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Principado de Liechtenstein). Em seguida, foram colocados sobre *stubs* contendo fita adesiva de carbono dupla face e levados ao metalizador (Sputter Coater – SCD 050, Bal-Tec, Balzers, Principado de Liechtenstein) para cobertura da superfície com uma fina camada de ouro e examinados em microscópio eletrônico de varredura – MEV (Quanta 200, Philips-FEI, Holanda) (KITAJIMA; LEITE, 1999). Algumas amostras foram submetidas à fratura frágil obtida após cortes com bisturi, antes da análise no MEV.

### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1 Patogenicidade e Colonização Epifítica de Plantas Cultivadas, Adubação Verde, Forrageiras, de Pastagens e Invasoras por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*

Entre as 58 espécies e cultivares de plantas cultivadas, adubação verde, forrageiras e invasoras incluídas no presente estudo, 12 genótipos se apresentaram sintomáticos 15 DAI com o isolado RL1 de *Xv* (Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3). As plantas sintomáticas pertencem às espécies *Avena sativa* (aveias cv. IPR Afrodite e cv. IPR Esmeralda), *Avena strigosa* (aveia preta cv. IPR 161), *Hordeum vulgare* (cevada cv. BRS Cauê), *Oryza sativa* (arroz cv. IPR 117), *Brachiaria brizantha* (braquiaria cv. Brizantha e Marandu), *Digitaria horizontalis* (capim-colchão), *Digitaria insularis* (capim-amargoso), *Echinochloa colonum* (capim-arroz), *Eleusine indica* (capim-pé-de-galinha), e *Sorghum arundinaceum* (falso-massambará). Todas as espécies pertencem à família Poaceae e podem ser consideradas potenciais hospedeiros alternativos sintomáticos de *Xv* (Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3).

As demais espécies vegetais não apresentaram sintomas quando inoculadas com o isolado RL1 de *Xv* (Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3). Entretanto, a bactéria *Xv* foi detectada colonizando epifiticamente a filosfera de grande parte das plantas cultivadas, de adubação verde, forrageiras, de pastagens e invasoras incluídas no estudo (Tabelas 3.1, 3.2 e 3.3). Entre as plantas invasoras, apenas três espécies, capim branco (Poaceae), fazendeiro (Asteraceae) e poaia branca (Rubiaceae), não apresentaram colonização epifítica por *Xv* (Tabelas 3.3).

O período de sobrevivência epifítica do isolado RL1 de *Xv* variou entre as espécies de planta (Tabelas 3.4). Nos grupos de plantas cultivadas e de adubação verde, a *Xv* apresentou sobrevivência epifítica por até 30 dias em milheto, centeio, trigo e feijão, enquanto que em cana-de-açúcar, triticale, girassol, tremoços branco e azul, mucunas preta e anã, algodão e trigo

mourisco a sobrevivência foi de apenas 21 dias (Tabela 3.4).

Nos grupos de espécies forrageiras e de pastagem, a sobrevivência de *Xvv* foi por até 30 dias em *Brachiaria decumbens* (cv. Basilisk) e *Crotalaria spectabilis*, e por até 21 dias em *B. brizantha* (cv. Piatã e MG5-Vitória) e braquiárias *Decumbis*, *Humidicola* e *Ruzisiensis*, *Panicum maximum* cv. MG12 Paredão, e *Cajanus cajan* (Tabela 3.4). Em contraparte, a bactéria sobreviveu por apenas 15 dias em *Panicum maximum* cv. Tanzânia-1 (Tabela 3.4).

No grupo das plantas invasoras, a bactéria sobreviveu epifiticamente por até 30 dias na maior parte das espécies testadas nos dois experimentos (Tabela 3.4). Enquanto que em azevém (Poaceae) e picão-preto (Asteraceae), a *Xvv* sobreviveu foi de até 21 dias, enquanto que em buva (Asteraceae) e em nabo forrageiro (Brassicaceae) o período de sobrevivência epifítico de apenas 15 dias (Tabela 3.4).

Em relação à densidade epifítica de *Xvv*, foram observadas diferenças entre as espécies, variando de 2,70  $\log_{10}$  UFC g<sup>-1</sup> de tecido foliar em braquiária Basilisk aos 30 DAI, até 7,00  $\log_{10}$  UFC g<sup>-1</sup> em azevém e em tremoço branco aos 21 DAI (Tabela 3.4). Os resultados obtidos indicaram grande variação nas populações epíficas de *Xvv* em diferentes folhas de uma mesma planta.

Os resultados obtidos também sugerem que um grande número de espécies de plantas não hospedeiras sintomáticas podem suportar populações epifíticas de *Xvv*. Assim, essas plantas podem que podem ser fontes de inóculo de *Xvv* para o desenvolvimento da estria bacteriana em lavouras de milho. O conhecimento dos potenciais hospedeiros alternativos sintomáticos e assintomáticos que podem servir de reservatórios de *Xvv* é de fundamental importância para os estudos epidemiológicos e estabelecimento de medidas para o manejo da doença em lavouras de milho.

**Tabela 3.1** – Patogenicidade e colonização epifítica de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, agente causal da estria bacteriana do milho, em plantas anuais cultivadas e de adubação verde.

Família botânica	Nome científico	Nome comum	Cultivar	Sintomas <sup>1</sup>	Colonização epifítica <sup>2</sup>
<i>Monocotiledôneas</i>					
Poaceae	<i>Avena sativa</i>	Aveia	'IPR Afrodite'	+**	N/A
	<i>Avena sativa</i>	Aveia	'IPR Esmeralda'	+	N/A
	<i>Avena strigosa</i>	Aveia preta	'IPR 161'	+	N/A
	<i>Hordeum vulgare</i>	Cevada	'BRS Cauê'	+	N/A
	<i>Oryza sativa</i>	Arroz	'IPR 117'	+	N/A
	<i>Pennisetum glaucum</i>	Milheto	'IPR S <sup>a</sup> Tereza do Oeste'	-	+
	<i>Saccharum officinarum</i>	Cana-de-açúcar	N/I	-	+
	<i>Secale cereale</i>	Centeio	'IPR 89'	-	+
	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo	'BRS 658'	-	+
	<i>Triticosecale wittmack</i>	Triticale	'IPR Caiapó'	-	+
	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	'IPR Potyporã'	-	+
	<i>Zea mays</i>	Milho branco	'IPR 127'	+	N/A
	<i>Zea mays</i>	Milho	'IPR 164'	+	N/A
<i>Dicotiledôneas</i>					
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	Girassol	'BRS 417'	-	+
	<i>Glycine max</i>	Soja	'Potência'	-	+
	<i>Lupinus albus</i>	Tremoço branco	N/I	-	+
	<i>Lupinus angustifolius</i>	Tremoço azul	'IPR 124'	-	+
Fabaceae	<i>Mucuna aterrima</i> vc. <i>Mucuna preta</i>	Mucuna preta	N/I	-	+
	<i>Mucuna pruriens</i>	Mucuna anã	N/I	-	+
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Feijão	'Carioca'	-	+
Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodão	'FMT 701'	-	+
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench	Trigo mourisco	'IPR 91'	-	+

<sup>1</sup> Avaliação dos sintomas aos 15 DAI e confirmação de *Xvv* por PCR. <sup>2</sup> Isolamento epifítico de *Xvv* em plantas assintomáticas realizada aos 21 DAI no primeiro e aos 15, 21 e 30 DAI no segundo experimento. As bactérias isoladas foram confirmadas como *Xvv* por PCR.

\*\*+: presença de sintomas ou de *Xvv*. -: ausência de sintomas ou de *Xvv*. N/A: Não avaliado. N/I: cultivar não identificada.

**Tabela 3.2** - Patogenicidade e colonização epifítica de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, agente causal da estria bacteriana do milho, em plantas forrageiras e de pastagens.

Família botânica	Nome científico	Nome comum	Cultivar	Presença de sintomas <sup>1</sup>	Colonização epifítica <sup>2</sup>
<i>Monocotiledôneas</i>					
Poaceae	<i>Brachiaria brizantha</i>	Braquiária Brizantha	N/I*	+ **	N/A
	<i>Brachiaria brizantha</i>	Braquiária Marandu	'Marandu'	+	N/A
	<i>Brachiaria brizantha</i>	Braquiária Piatã	'BRS Piatã'	-	+
	<i>Brachiaria brizantha</i>	Braquiária MG-5 Vitória	'MG-5 Vitória'	-	+
	<i>Brachiaria decumbens</i>	Braquiária Basilisk	'Basilisk'	-	+
	<i>Brachiaria decumbens</i>	Braquiária Decumbis	N/I	-	+
	<i>Brachiaria humidicola</i>	Braquiária Humidicola	N/I	-	+
	<i>Brachiaria ruzisiensis</i>	Braquiária Ruzisiensis	N/I	-	+
	<i>Panicum maximum</i>	Capim MG-12 Paredão	'MG12 Paredão'	-	+
	<i>Panicum maximum</i>	Capim Tanzânia	'Tanzânia-1'	-	+
<i>Dicotiledôneas</i>					
Fabaceae	<i>Cajanus cajan</i>	Guandu forrageiro	'LAPAR 43'	-	+
	<i>Crotalaria spectabilis</i>	Crotalaria spectabilis	N/I	-	+

<sup>1</sup> Avaliação dos sintomas aos 15 DAI e confirmação de *Xvv* por PCR.

<sup>2</sup> Isolamento epifítico de *Xvv* em plantas assintomáticas realizada aos 21 DAI no primeiro e aos 15, 21 e 30 DAI no segundo experimento. As bactérias isoladas foram confirmadas como *Xvv* por PCR.

\*\*+: presença de sintomas ou de *Xvv*. -: ausência de sintomas ou de *Xvv*. N/A: Não avaliado. \*N/I: cultivar não identificada.

**Tabela 3.3** – Patogenicidade e colonização epifítica de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, agente causal da estria bacteriana do milho, em plantas invasoras.

Família botânica	Nome científico	Nome comum	Presença de sintomas <sup>1</sup>	Colonização epifítica <sup>2</sup>
<i>Monocotiledôneas</i>				
Poaceae	<i>Brachiaria plantaginea</i>	Capim-marmelada	-	+ *
	<i>Cenchrus echinatus</i>	Capim-carrapicho	-	+
	<i>Chloris gayana</i>	Capim cloris gayana	-	+
	<i>Chloris polydactyla</i>	Capim-branco	-	-
	<i>Digitaria horizontalis</i>	Capim-colchão	+	N/A
	<i>Digitaria insularis</i>	Capim-amargoso	+	N/A
	<i>Echinochloa colonum</i>	Capim-arroz	+	N/A
	<i>Eleusine indica</i>	Capim-pé-de-galinha	+	N/A
	<i>Lolium multiflorum</i>	Azevém	-	+
	<i>Panicum maximum</i>	Capim-colonião	-	+
	<i>Pennisetum purpureum</i>	Capim-napiê	-	+
	<i>Rhynchelytrum repens</i>	Capim favorito	-	+
	<i>Sorghum arundinaceum</i>	Falso-Massambará	+	N/A
<i>Dicotiledôneas</i>				
Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridis</i>	Caruru vermelho	-	+
	<i>Amaranthus viridis</i>	Caruru verde	-	+
Asteraceae	<i>Acanthospermum hispidum</i>	Carrapicho de carneiro	-	+
	<i>Bidens pilosa</i>	Picão-preto	-	+
	<i>Conyza sp.</i>	Buva	-	+
	<i>Galinsoga paviflora</i>	Fazendeiro	-	-
	<i>Tridax procumbens</i>	Erva-de-touro	-	+
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Nabiça	-	+
	<i>Raphanus sativus</i>	Nabo forrageiro	-	+
Commelinaceae	<i>Commelina benghalensis</i>	Trapoeraba	-	+
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Amendoim-bravo	-	+
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	Guanxuma	-	+
Rubiaceae	<i>Richardia brasiliensis</i>	Poaia-branca	-	-

<sup>1</sup> Avaliação dos sintomas aos 15 DAI e confirmação de *Xvv* por PCR.

<sup>2</sup> Isolamento epifítico de *Xvv* em plantas assintomáticas realizada aos 21 DAI no primeiro e aos 15, 21 e 30 DAI no segundo experimento. As bactérias isoladas foram confirmadas como *Xvv* por PCR.

\*+: presença de sintomas ou de *Xvv*. -: ausência de sintomas ou de *Xvv*. N/A: Não avaliado.

**Tabela 3.4** – Período máximo de recuperação em dias após inoculação (DAI) e unidades formadoras de colônia ( $\text{Log}_{10}$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ) de *Xanthomonas vasicola* pv. *vascolorum* (Xvv), agente causal da estria bacteriana do milho em plantas cultivadas, de adubação verde, forrageiras, pastagens e invasoras.

Família botânica	Nome Científico	Nome comum	Xvv	
			Período máximo de recuperação (DAI)	UFC ( $\text{Log}_{10}$ g-1) <sup>1</sup>
<i>Plantas cultivadas e de adubação verde</i>				
Poaceae	<i>Pennisetum glaucum</i>	Milheto	30	5,46
	<i>Saccharum officinarum</i>	Cana-de-açúcar	21	4,40
	<i>Secale cereale</i>	Centeio	30	6,36
	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo	21	5,18
	<i>Triticum secale</i>	Triticale	21	5,40
	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	30	6,71
Asteraceae	<i>Glycine max</i>	Soja	21	3,30
	<i>Helianthus annuus</i>	Girassol	21	6,02
	<i>Lupinus albus</i>	Tremoço branco	21	7,00
	<i>Lupinus angustifolius</i>	Tremoço azul	21	4,00
	<i>Mucuna aterrima</i> vc. <i>Mucuna preta</i>	Mucuna preta	21	6,01
Fabaceae	<i>Mucuna pruriens</i>	Mucuna anã	21	4,30
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Feijão	30	5,00
Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i>	Algodão	21	5,04
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench	Trigo mourisco	21	5,93
<i>Plantas forrageiras e pastagens</i>				
Poaceae	<i>Brachiaria brizantha</i>	B. brizantha Piatã	21	3,48
	<i>Brachiaria brizantha</i>	B. brizantha MG-5 Vitória	21	3,65
	<i>Brachiaria decumbens</i>	B. decumbens	21	4,74
	<i>Brachiaria decumbens</i>	B. decumbens Basilisk	30	2,70
	<i>Brachiaria humidicola</i>	B. humidicola	21	4,00
	<i>Brachiaria ruziensis</i>	B. ruziensis	21	5,00
	<i>Panicum maximum</i>	P. maximum-Tanzânia	15	4,00
	<i>Panicum maximum</i>	P. maximum-MG12	21	4,81
Fabaceae	<i>Cajanus cajan</i>	Guandu forrageiro	21	4,18
	<i>Crotalaria spectabilis</i>	Crotalaria spectabilis	30	5,23
<i>Plantas invasoras</i>				
Poaceae	<i>Brachiaria plantaginea</i>	Capim-marmelada	21	5,95
	<i>Cenchrus echinatus</i>	Capim-carrapicho	30	5,00
	<i>Chloris gayana</i>	Capim cloris gayana	30	6,27
	<i>Lolium multiflorum</i>	Azevém	21	7,00
	<i>Panicum maximum</i>	Capim-colonião	30	5,18
	<i>Pennisetum purpureum</i>	Capim-napiê	30	5,92
	<i>Rhynchelytrum repens</i>	Capim favorito	30	6,40
	Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridis</i>	Caruru vermelho	30
<i>Amaranthus viridis</i>		Caruru verde	30	3,98
Asteraceae	<i>Acanthospermum hispidum</i>	Carrapicho de carneiro	30	5,18
	<i>Bidens pilosa</i>	Picão-preto	21	5,00
	<i>Conyza</i> sp.	Buva	15	4,00
	<i>Tridax procumbens</i>	Erva-de-touro	30	3,70
Brassicaceae	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Nabiça	30	5,48
	<i>Raphanus sativus</i>	Nabo forrageiro	15	4,28
Commelinaceae	<i>Commelina benghalensis</i>	Trapoeaba	30	5,18
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Amendoim-bravo	30	3,93
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	Guanxuma	30	5,00

<sup>1</sup> Valor máximo de população epifítica recuperada da filosfera das plantas, dentre os dois experimentos avaliados.

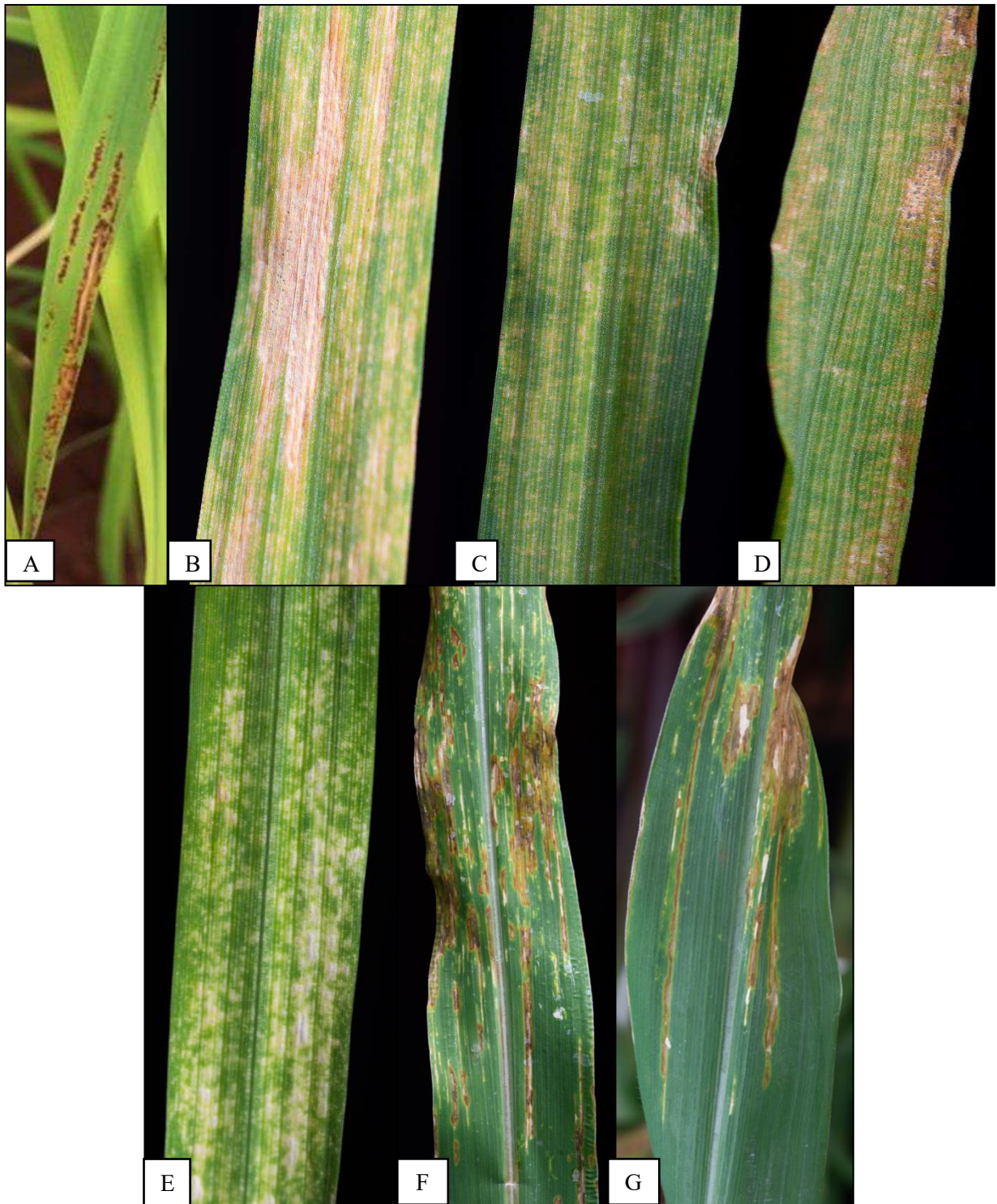
Nas espécies sintomáticas, os sintomas foliares foram observados a partir dos sete a nove dias após as inoculações, como pequenas lesões circulares ou irregulares de tecido encharcado, típico de anasarca, e bem definidos nas duas faces das folhas. Após esse período, diferenças foram observadas nos sintomas entre as espécies (Figuras 3.2 e 3.3). Em milho, as lesões se desenvolveram, porém, se mantiveram restritas às regiões internervais do limbo foliar, com aspecto translúcido quando visualizadas contra a luz. Por outro lado, as lesões nas demais planta, tanto nas anuais cultivadas, como nas de adubação verde, forrageiras, e invasoras apresentaram variações na forma e na coloração (Figuras 3.2 e 3.3).

Em plantas de arroz foram observadas pontuações avermelhadas, estreitas e bem definidas, às vezes circuladas por halo amarelado (Fig. 3.2A). Em aveia, as lesões, inicialmente pardo-amarelas, foram numerosas e coalescentes, atingindo grande parte do limbo foliar. Algumas áreas também se tornaram cloróticas (Fig. 3.2B, 3.2C e 3.2D). As espécies de aveia apresentaram quantidade de lesões distintas, porém não foi realizada avaliação de severidade dos sintomas. A aveia cv. IPR Afrodite apresentou a maior quantidade de lesões. Nas plantas de cevada, os sintomas se manifestaram como pontuações múltiplas de cor amarelo-palha a creme bem evidentes, com ocorrência de coalescência de lesões (Fig. 3.2E). Os milhos branco e comum, utilizadas como controles sintomáticos apresentaram lesões características de estria bacteriana, na forma de estrias de coloração amarela a marrom ao longo das regiões internervais, evoluindo para necrose (Fig. 3.2F e 3.2G). Na face adaxial do limbo foliar foram observados exsudatos bacterianos, indicando ampla multiplicação de *Xv* nos tecidos.

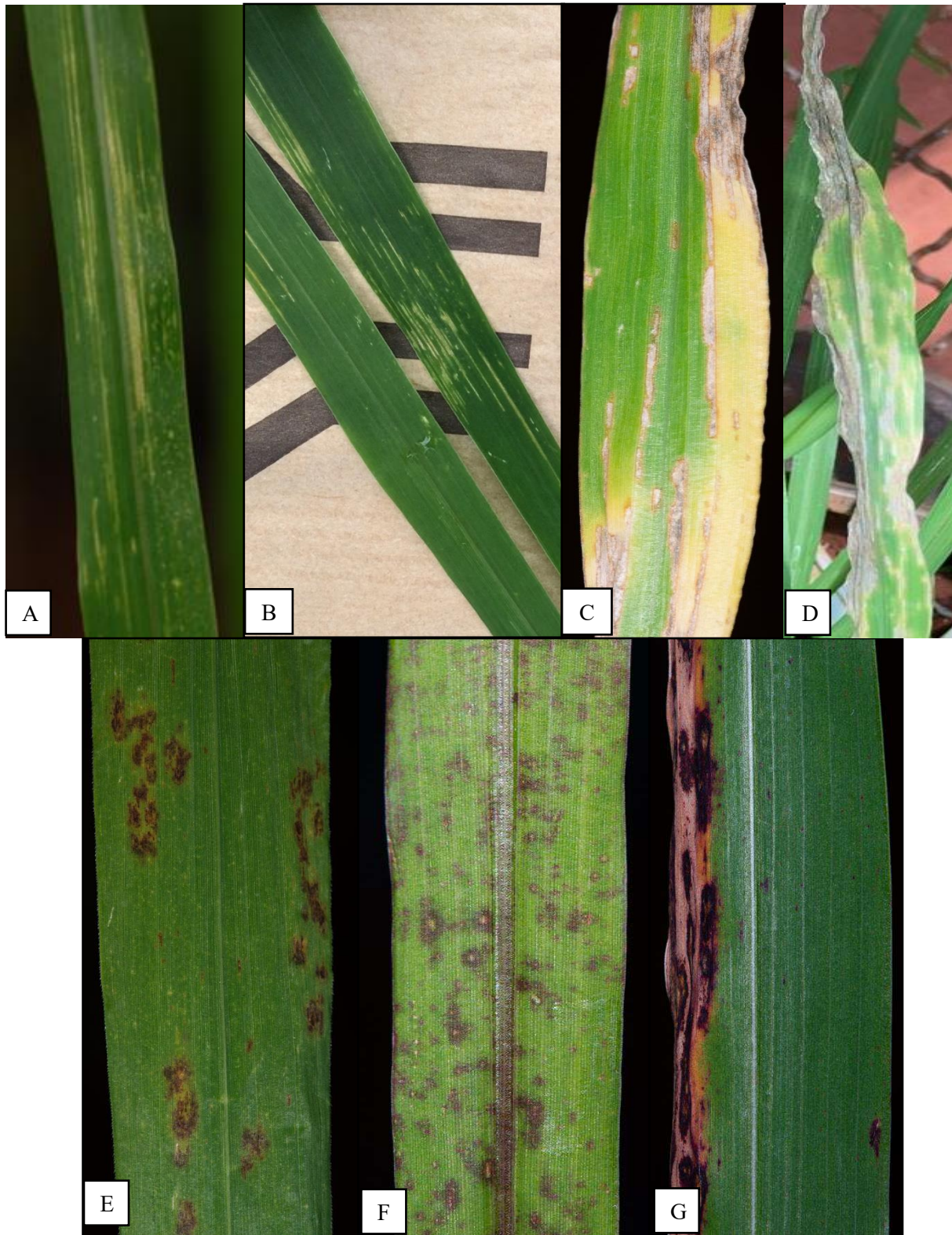
As lesões foliares nas plantas de braquiárias *Brizantha* e *Marandu* se caracterizaram por estrias muito estreitas, com 1 a 2 mm de largura, margens bem definidas, de cor pardo-amarela e paralelas às nervuras (Fig. 3.3A e 3.3B). Considerando todas as plantas invasoras, o capim-amargoso foi a que apresentou sintomas mais severos, os quais consistiram em estrias pardo-amarelas circundadas por área foliar amarela e tomando uma extensa parte do tecido (Fig. 3.3C). Em capim-pé-de-galinha, as estrias de coloração pardo-amarela apresentaram em algumas áreas amarelecimento ao redor das lesões, que evoluíram para necrose (Fig. 3.3D). Em capim-arroz, as lesões consistiram em pequenas pontuações arredondadas e avermelhadas ao longo da folha, distribuídas irregularmente (Fig. 3.3E). Em capim colchão, as lesões avermelhadas se apresentaram distribuídas por toda a folha (Fig. 3.3 F). Em falso-massarambá, as lesões se mostraram brilhantes, de cor vermelho-vinho e podendo coalescer, formando grandes manchas irregulares (Fig. 3.3G). Em relação à severidade de sintomas, nesse grupo de plantas forrageiras e invasoras sintomáticas foi possível observar diferenças evidentes na intensidade dos sintomas da doença, sendo o capim-amargoso o que apresentou a maior

severidade, embora não tenha sido avaliada quantitativamente.

A partir das folhas sintomáticas, foram realizados isolamentos bacterianos, obtendo-se culturas puras de *Xvv*. A identidade das culturas foi confirmada em testes da PCR com iniciadores específicos para *Xvv*, agente causal da estria bacteriana do milho.



**Figura 3.2** - Sintomas em plantas inoculadas com o isolado RL1 de *Xanthomonas vasicolor* pv. *vasculorum* (*Xvv*) 15 DAI. (A) arroz cv. IPR 117 com pontuações avermelhadas restritas às regiões internervais; (B) aveia cv. IPR Afrodite com pontuações amareladas nas folhas evoluindo para clorose; (C) aveia cv. IPR Esmeralda com pontuações amareladas nas folhas evoluindo para clorose; (D) aveia preta cv. IPR 161 com pontuações amareladas nas folhas evoluindo para clorose; (E) cevada cv. BRS Cauê com pontuações amarelo-palha ao longo das nervuras; (F) milho cv. IPR 164 com estrias com margens onduladas nas folhas; (G) milho branco cv. IPR 127 com estrias com margens onduladas nas folhas. Fotos: Antônio Alberto dos Santos e próprio autor.



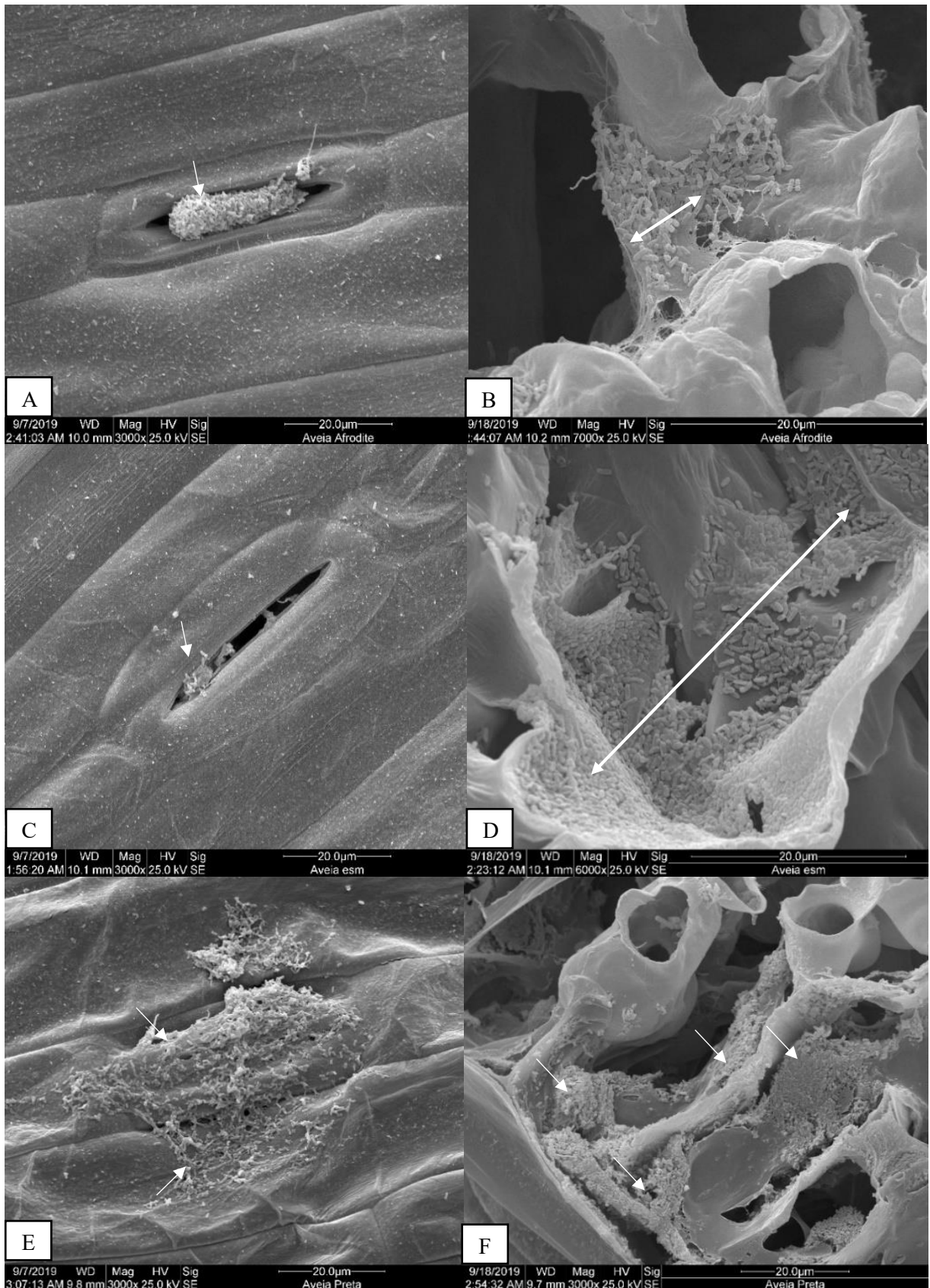
**Figura 3.3** - Sintomas em plantas forrageiras e plantas daninhas inoculadas com o isolado RL1 de *Xyv* observados 15 DAI. (A) braquiária Brizantha com sintomas de estria; (B) braquiária Marandu com sintomas de estria; (C) capim amargoso com sintomas de clorose; (D) capim pé-de-galinha com sintomas de estria; (E) capim arroz com pontuações avermelhadas; (F) capim colchão com pontuações avermelhadas; (G) falso-massambará com pontuações vermelhas no limbo foliar. Fotos: Antônio Alberto dos Santos e próprio autor.

### 3.4.2 Exame por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Plantas Colonizadas por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em amostras de plantas de espécies sintomáticas, i.e. aveias IPR Afrodite e IPR Esmeralda, aveia preta IPR 161, milho IPR 164 e arroz IPR 117, e de plantas de três espécies da família Poaceae que não apresentaram sintomas, i.e. sorgo BRS 658, centeio IPR 89 e milho IPR Santa Tereza do Oeste, quando inoculadas com o isolado RL1 de *Xvv*. As amostras para exame microscópico foram coletadas aos 15 DAI, quando as plantas sintomáticas já apresentavam sintomas causadas pela bactéria.

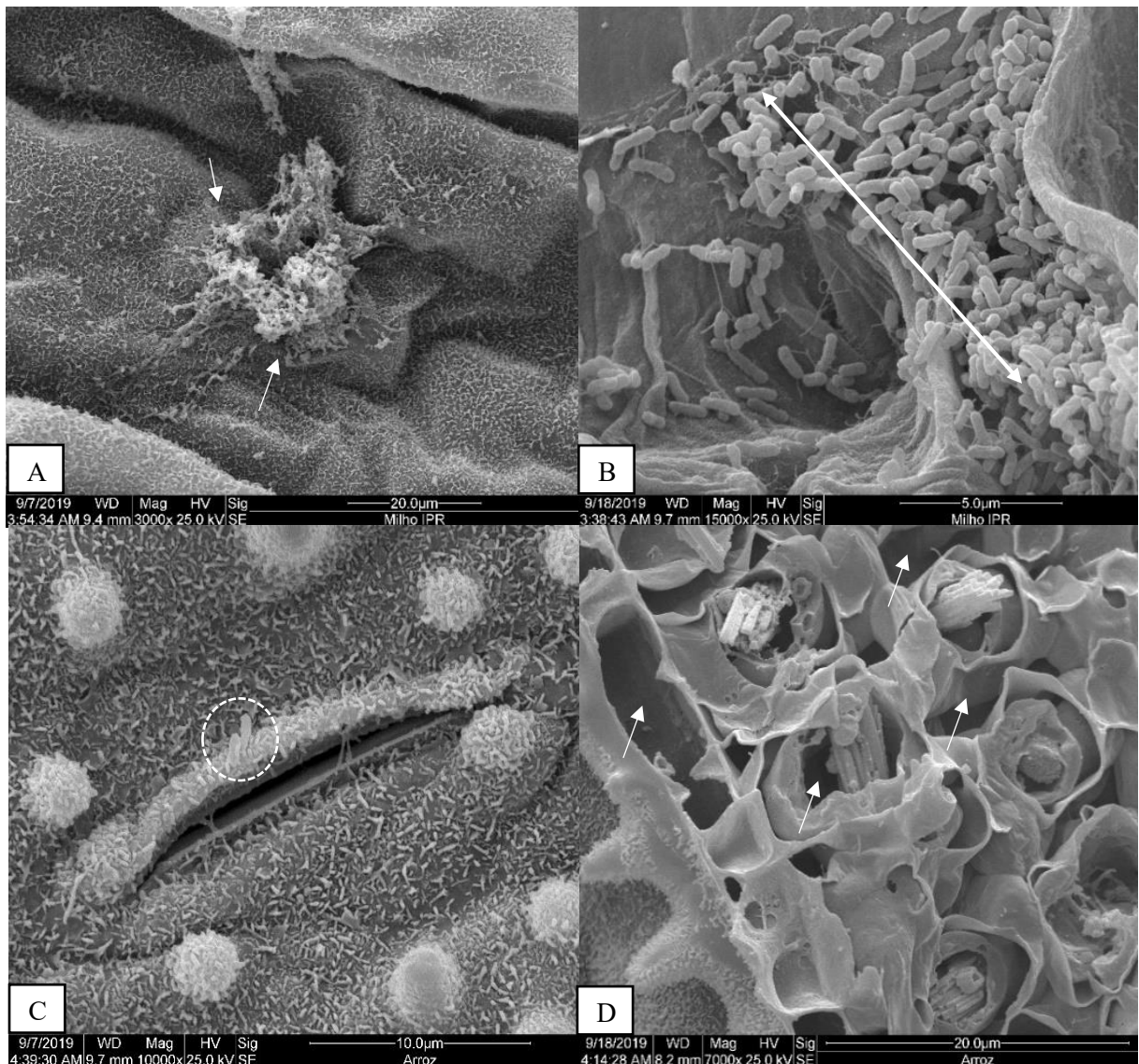
As células e agregados de *Xvv* foram frequentemente observados distribuídos na superfície adaxial das folhas de aveias IPR Afrodite e Esmeralda (Fig. 3.4A,C) e aveia preta (Fig. 3.4E), milho (Fig. 3.5A), arroz (Fig. 3.5C), sorgo (Fig. 3.6A) e centeio (Fig. 3.6B). As imagens das fraturas revelaram a colonização pela bactéria nos espaços intercelulares e na câmara subestomática em tecidos foliares de aveias IPR Afrodite (Fig. 3.4B) e IPR Esmeralda (Fig. 3.4D), aveia preta IPR 161 (Fig. 3.4F), milho IPR 164 (Fig. 3.5B). Foi possível também observar a presença de exopolissacarídeos (EPS) e muco entre as células bacterianas (Fig. 3.4B,D,F; 3.5B).

Em plantas de arroz foi detectada a presença de células bacterianas ao redor dos estômatos (Fig. 3.5C), mas nas fraturas não foi possível visualizar a colonização nos espaços intercelulares pela bactéria *Xvv* (Fig. 3.5D). Em sorgo (Fig. 3.6A) e centeio (Fig. 3.6B), mesmo não havendo sintomas, foi possível observar discreta colonização por *Xvv* na superfície foliar, em concordância com os resultados da sobrevivência epifítica da bactéria verificada nestas espécies (Tabela 3.1). Em milho, foi observado que a morfologia das células bacterianas estava alterada (Fig. 3.6C), indicando possível morte celular. Também não foi observada colonização bacteriana no mesófilo nesses tecidos em exames de fraturas (Fig. 3.6D). Isto sugere que o milho é apenas uma espécie onde *Xvv* poderia sobreviver epifiticamente (Tabela 3.1).

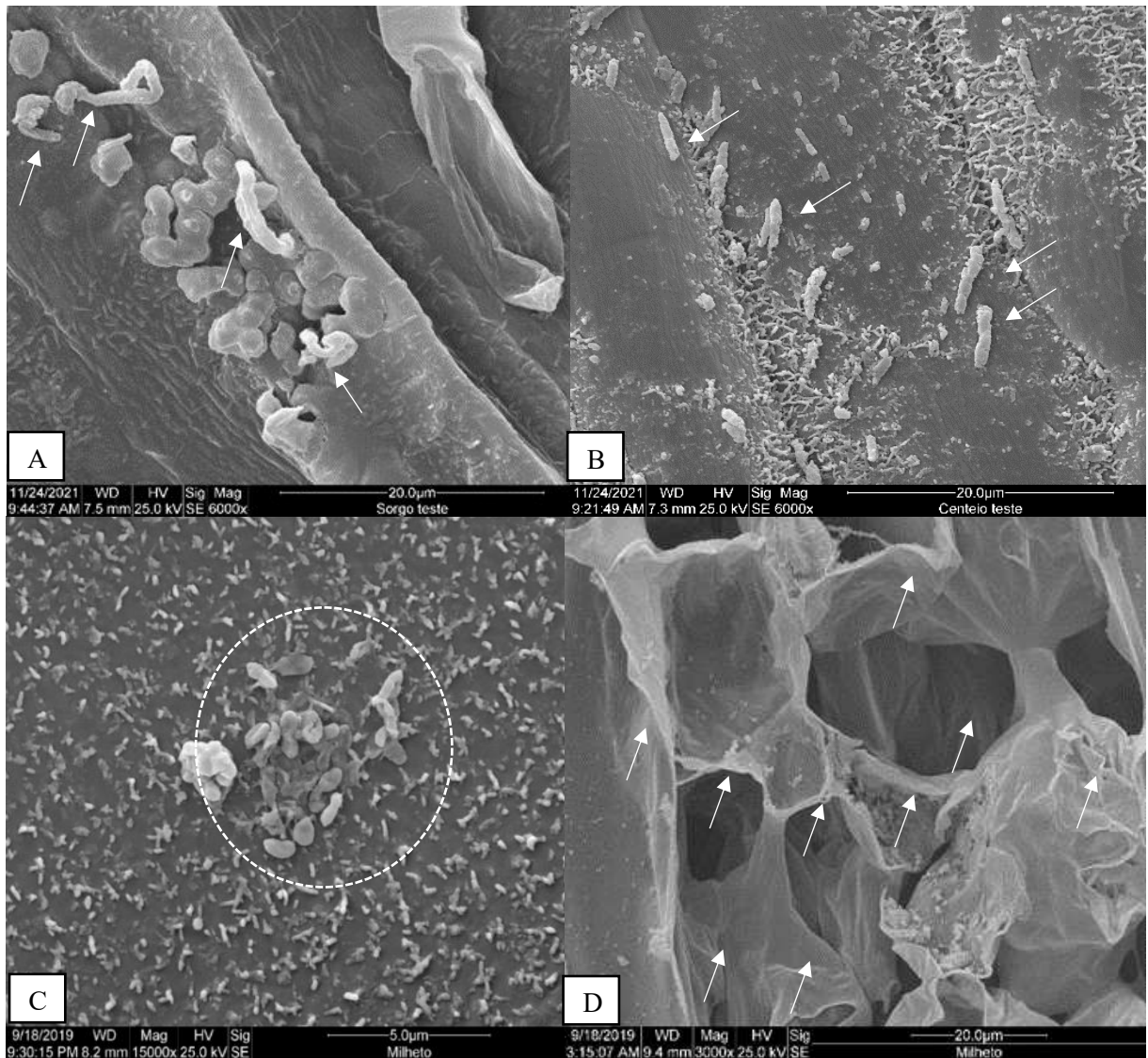


**Figura 3.4** - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície foliar e de fraturas de folhas das aveias aos 15 dias após a inoculação com *Xanthomonas vasculorum* pv. *vasculorum* (Xvv). (A) cv. IPR Afrodite com agregado de células de Xvv em estômato; (B) cv. IPR Afrodite com colonização do mesófilo foliar por Xvv havendo formação de agregados e produção de material amorfo sugerindo exopolissacarídeos; (C) cv. IPR Esmeralda com agregado de células de Xvv em estômato; (D) cv. IPR Esmeralda com colonização do mesófilo foliar por Xvv havendo formação de agregados e produção de material amorfo sugerindo exopolissacarídeos; (E) aveia preta cv. IPR161

com agregado de células de *Xvv* em estômato; (F) aveia preta cv. IPR161 com colonização do mesófilo foliar por *Xvv* havendo formação de agregados e produção de material amorfo sugerindo exopolissacarídeos.



**Figura 3.5** - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície adaxial e fraturas de folhas de milho e arroz aos 15 dias após a inoculação com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*). (A) milho cv. IPR164 com aglomerado de células de *Xvv* em abertura de estômato; (B) milho cv. IPR164 com agrupamento de células de *Xvv* no mesófilo foliar coberto por material amorfo sugestivo de exopolissacarídeos; (C) arroz cv. IPR 117 com células de *Xvv* colonizando região próxima à estômato; (D) arroz cv. IPR 117 com estrutura interna do mesófilo foliar, sem evidências da presença de células bacterianas.



**Figura 3.6** - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de plantas assintomáticas de sorgo cv. BRS 658, centeio cv. IPR 89, e milho cv. IPR Santa Tereza do Oeste aos 15 dias após a inoculação com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xv*). (A) superfície adaxial do sorgo cv. BRS 658 com células de *Xv* dispersas na epiderme; (B) superfície adaxial do centeio cv. IPR 89 com células de *Xv* dispersas na epiderme; (C) agregados de células de *Xv* demonstrando morfologia alterada, indicando morte celular na superfície adaxial de milho cv. IPR Santa Tereza do Oeste; (D) fraturas mostrando a estrutura interna do mesófilo foliar, sem evidências de colonização bacteriana em milho cv. IPR Santa Tereza do Oeste.

### 3.5 DISCUSSÃO

A patogenicidade da bactéria foi avaliada para 52 espécies de plantas pertencentes a diferentes famílias botânicas, incluindo mono e dicotiledôneas. Dez espécies de plantas potenciais hospedeiras sintomáticas de *Xv* foram identificadas. Entretanto, esses hospedeiros alternativos sintomáticos estão restritos basicamente a membros da família Poaceae. Esses resultados corroboram estudos anteriores sobre hospedeiros alternativos para *Xv* (KORUS et al., 2017); LANG et al., 2017; HARTMAN et al., 2020). Na literatura foi relatada como

exceção apenas uma espécie sintomática *Cyperus esculentus* pertencente à família Cyperaceae (Hartman et al., 2020).

Os resultados obtidos no presente estudo ampliam a relação de plantas hospedeiras da bactéria *Xvv*, além do milho, o sorgo, a cana-de-açúcar e algumas espécies de palmeiras (LANG et al., 2017; NORTH, 1935; RICAUD; AUTREY, 1989). Embora o estudo demonstre a patogenicidade de *Xvv* sob condições controladas para espécies vegetais ainda não relatadas como hospedeiros, é importante salientar que os resultados foram obtidos pela inoculação artificial de *Xvv* por pulverização foliar sob condições de casa de vegetação e podem não representar adequadamente as interações patógeno-hospedeiro que ocorrem naturalmente sob condições de campo. Inoculações artificiais podem favorecer um patógeno de maneira que consiga infectar o hospedeiro devido à alta concentração do inóculo, comportando-se mais agressivamente do que ocorreria sob condições naturais.

No estudo de Hartman et al. (2020), oito espécies de plantas identificadas como hospedeiras sintomáticas para *Xvv* sob condições de casa de vegetação foram transplantadas e avaliadas em condições de campo infestado naturalmente com *Xvv*. Apenas duas das oito espécies foram infectadas e confirmadas como suscetíveis à *Xvv* sob condições naturais de ocorrência da doença. Além disso, foi observado também que os sintomas em milho eram mais severos do que nos potenciais hospedeiros alternativos estudados. Respostas semelhantes foram reportadas por Lang et al (2017) e Hartman et al. (2020), indicando que a bactéria pode ter apresentado uma maior agressividade ou adaptabilidade para infectar o milho.

A cana-de-açúcar e o sorgo já haviam sido relatadas como hospedeiros sintomáticos da bactéria *Xvv* em Nebraska e em Kansas nos EUA (KORUS et al., 2017; LANG et al., 2017). No estudo de Lang et al. (2017), o sorgo apresentou sintomas quando inoculado artificialmente com *Xvv* sob condições de casa de vegetação. No entanto, não foram observados sintomas sob condições de campo, mesmo em áreas de sorgo adjacentes a lavouras de milho afetadas pela estria bacteriana. No presente estudo, plantas de cana-de-açúcar e de sorgo não apresentaram sintomas quando inoculadas com o isolado RL1 de *Xvv*. Entretanto, foi possível recuperar a bactéria *Xvv* da filosfera dessas plantas até 21 DAI, o que indica a colonização epifítica dessas plantas pela bactéria.

Diferenças entre os estudos sobre gama de hospedeiros podem ser explicadas em parte pela variabilidade patogênica ou diversidade genética dos isolados de *Xvv*. Como exemplo, o estudo de Peros (1988) com isolados de cana-de-açúcar que demonstrou que a agressividade varia entre as estirpes da bactéria, muito embora todas as estirpes testadas apresentassem algum nível de patogenicidade nas diferentes variedades de cana-de-açúcar estudadas. Ainda não

existem estudos comparativos entre isolados de *Xvv* do Brasil e de outras partes do mundo, incluindo os EUA. Entretanto, estudos de sequenciamento genômico de diferentes isolados de *Xvv* obtidos nos EUA, Argentina e África do Sul revelaram que esses isolados pertencem ao mesmo clado taxonômico (PEREZ-QUINTERO et al., 2020). No entanto, ainda não está claro se as estirpes de *Xvv* dos EUA e da Argentina apresentam diferenças fenotípicas em relação às linhagens sul-africanas quanto às plantas hospedeiras (LANG ET AL., 2017). Estudos iniciais com uma estirpe dos EUA e uma estirpe Sul-Africana de *Xvv* e quatro de *X. vasicola* pv. *holcicola* não mostraram diferenças nos sintomas em milho (LANG et al. 2017). Entretanto, é importante salientar que esses estudos foram limitados à algumas estirpes de *Xvv* e apenas uma variedade de milho.

A aveia branca (*Avena sativa*) e o arroz (*Oryza sativa*) também foram relatadas como hospedeiras de *Xvv* por Lang et al., (2017) e Hartman et al. (2020). No presente estudo foram avaliadas três cultivares de aveia, sendo duas pertencentes à espécie *A. sativa* e uma à espécie *A. strigosa*. Foram observados níveis distintos de suscetibilidade das cultivares de aveia à *Xvv*. A aveia branca cv. IPR Afrodite apresentou os sintomas mais severos de doença em comparação com as outras cultivares. Esses resultados indicam para a necessidade de avaliar a reação de diferentes genótipos de uma mesma espécie para determinar segurança a suscetibilidade à infecção por *Xvv*.

As plantas de cevada também foram sintomáticas quando inoculadas com o isolado RL1 de *Xvv*. Entretanto, nos estudos realizados anteriormente por Hartman et al. (2020), a espécie foi descrita como não-hospedeira da bactéria, por não apresentar sintomas e não ter sido demonstrada a colonização endofítica.

Provavelmente, este é o primeiro relato da patogenicidade de *Xvv* para as espécies *Brachiaria brizantha*, *B. brizantha* cv. Marandu, *Digitaria horizontalis* (capim-colchão), *D. insularis* (capim-amargoso), *Echinochloa colonum* (capim-arroz), *Eleusine indica* (capim-pé-de-galinha) e *Sorghum arundinaceum* (falso-massambará) no Brasil. Assim, esta é uma importante contribuição do presente estudo, visto que as plantas forrageiras do grupo das braquiárias são perenes e utilizadas em consórcios com milho. O cultivo simultâneo na mesma área de grãos e palhada de milho e volumoso destas espécies forrageiras tem o objetivo básico do pastoreio de gado (CECCON, 2013).

Em relação às plantas invasoras potenciais hospedeiras de *Xvv*, todas elas são bastante frequentes no país, infestando as principais lavouras anuais, as pastagens e os jardins. Além disso, apresentam grande capacidade reprodutiva (LORENZI, 2008). Dentre elas, *Sorghum arundinaceum* (falso-massambará) e *D. Insularis* (Capim-amargoso) são espécies perenes. A

agricultura tropical praticada no Brasil permite que em algumas regiões do país sejam realizados dois ou mais cultivos de grãos por ano na mesma área agrícola, como por exemplo, a sucessão soja e milho safrinha (ADEGAS; VOLL; GAZZIERO, 2011). Nesse sistema de produção, o investimento para controle de plantas daninhas na cultura do milho safrinha é geralmente baixo, o que resulta no aumento da flora infestante (ADEGAS; VOLL; GAZZIERO, 2011). A espécie *D. insularis* é considerada uma das plantas invasoras mais problemáticas desse contínuo sistema intensivo de produção de grãos, particularmente agravada pela ampla evolução de populações resistentes a herbicidas (GONÇALVES NETTO et al., 2021). A severidade de sintomas visuais em *D. insularis* e a sobrevivência epifítica da bactéria *Xvv* verificada nesta espécie sugere um potencial nicho para a permanência da bactéria em campos de cultivo de milho. Novos estudos são necessários para aprofundar o entendimento das interações entre *Xvv* e potenciais plantas invasoras hospedeiras.

Cabe salientar que a sobrevivência de bactérias fitopatogênicas como populações residentes na superfície ou no interior de plantas cultivadas, forrageiras ou invasoras é uma das principais fontes de inóculo para o desenvolvimento de novas epidemias de doenças bacterianas em campos de cultivos agrícolas (SCHUSTER; COYNE, 1974). No presente estudo, *Xvv* foi detectada colonizando epifiticamente diversas plantas cultivadas e de adubação verde, monocotiledôneas e dicotiledôneas. Assim, foi verificado que esta bactéria pode colonizar epifiticamente plantas de diferentes famílias botânicas, como Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Commelinaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae e Polygonaceae.

Nossos resultados indicam uma grande variação entre populações epifíticas amostradas em diferentes folhas de uma mesma planta. Essa é uma característica das populações de bactérias epifíticas já relatada em outros estudos (MERCIER; LINDOW, 2000; KINKEL; WILSON; LINDOW, 1996). O tamanho das populações de bactérias epifíticas pode variar em mais de 1.000 vezes de uma folha para outra, mesmo quando cultivadas em condições ambientais semelhantes (HIRANO; UPPER, 1990; KINKEL; LINDOW, 1993; KINKEL; WILSON; LINDOW, 1995, 1996).

Quando analisada a colonização epifítica em plantas forrageiras foi observada que também todas as espécies testadas permitem a sobrevivência da bactéria nessas condições. Em relação às plantas invasoras, 86% das espécies testadas possibilitaram a sobrevivência epifítica da bactéria. Entretanto, as espécies capim branco (*Chloris polydactyla*), fazendeiro (*Galinsoga paviflora*) e poaia branca (*Richardia brasiliensis*) não apresentaram a colonização epifítica por *Xvv*. Porém, isto pode ser resultado de uma baixa população bacteriana presente na filosfera das plantas daninhas no período avaliado. Outros fatores como composição das populações

bacterianas presentes na filosfera, espécie vegetal, tipo foliar, estágio fenológico e condições climáticas também podem ter influenciado a colonização epifítica (KINKEL, 1997; HIRANO; UPPER, 2000; LEVEAU, 2019). O tipo foliar é um dos fatores que podem influenciar a dinâmica das populações epifíticas (O'BRIEN; LINDOW, 1989; TOUSSAINT et al., 2012). Plantas com folhas tricômicas tendem a assegurar populações maiores do que as plantas com cutícula cerosa (O'BRIEN; LINDOW, 1989). Outro ponto também a ser considerado, é que a disponibilidade de fontes de nutrientes utilizáveis nas folhas, como os açúcares, pode ser determinante no tamanho da população epifítica (MERCIER; LINDOW, 2000).

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilitaram visualizar a colonização epifítica por *Xvv* de potenciais hospedeiros em espécies assintomáticas. A MEV evidenciou extensa colonização por *Xvv* com presença de exopolissacarídeos (EPS) em milho cv. IPR 164, *Avena sativa* e *Avena strigosa*. Estudos têm sugerido que os EPS têm diversas funções, que incluem a proteção das bactérias contra substâncias bacteriostáticas da planta, e redução do contato com células vegetais para minimizar as respostas de defesa do hospedeiro (DENNY, 1999). O EPS promove a retenção de água no tecido vegetal, e essa hiperhidratação estimula a ruptura do tecido, permitindo assim a movimentação, invasão ou colonização pelo fitopatógeno de locais distantes (STOODLEY et al., 2002; DENNY, 1999; DOW et al., 2003). Em bactérias do gênero *Xanthomonas*, a xantana é o EPS secretado (HARDING et al., 1995) e está envolvida em várias funções, como a supressão da defesa local da planta, inibindo a deposição de calose; e promovendo e facilitando a disseminação do patógeno (BRAUN, 1990; SAILE et al., 1997; YUN et al., 2006). Em estudos com *X. citri* subsp. *citri* foi verificado que a xantana atua durante os estágios posteriores do processo de infecção, provavelmente aumentando a aderência bacteriana ao tecido do hospedeiro e a sobrevivência epifítica, facilitando assim a colonização de tecidos mais distantes (DUNGER et al., 2007).

Embora tenham sido avaliadas 58 genótipos vegetais, estudos adicionais são necessários para determinar se outras plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas cultivadas ou que ocorram em áreas de cultivo de milho possam ser hospedeiras de *Xvv*. A constatação de que várias plantas cultivadas anuais, de adubação verde, plantas forrageiras e invasoras possam servir como hospedeiras para *Xvv* tanto de forma patogênica quanto epifítica sugerem seu uso técnico racional dentro de um programa de manejo integrado da doença para minimizar possíveis desenvolvimentos epidêmicos da estria bacteriana na cultura do milho. As práticas de adubação verde e de rotação de culturas devem ser realizadas, sempre que possível, com espécies não hospedeiras para minimizar a sobrevivência de *Xvv* no campo em regiões com incidência da estria bacteriana do milho.

### 3.6 CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo sobre hospedeiros alternativos de *Xvv* realizado no Brasil. Foi verificado que além do milho, existem outras plantas hospedeiras sintomáticas de *Xvv*, como *Avena sativa*, *Avena strigosa*, *Brachiaria brizantha* (cv. Brizantha e cv. Marandu), *Digitaria horizontalis*, *Digitaria insularis*, *Echinochloa colonum*, *Eleusine indica*, *Hordeum vulgare* e *Sorghum arundinaceum*. A filosfera de várias espécies de plantas anuais cultivadas, de adubação verde, forrageiras, pastagens e invasoras, são nichos apropriados para a sobrevivência epifítica de *Xvv*.

## 4 ARTIGO B SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* EM SOLO E RESÍDUOS CULTURAIS DE MILHO

### 4.1 RESUMO

A estria bacteriana do milho causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xv*) é uma doença emergente relatada nos Estados Unidos em 2016, na Argentina em 2017 e no Brasil em 2018. No Brasil, não existem estudos sobre a sobrevivência dessa bactéria no solo e em resíduos culturais. O objetivo deste estudo foi determinar a sobrevivência de *Xv* em solo sob condições controladas e de campo, além de determinar a capacidade de sobrevivência da bactéria em resíduos de cultura de milho. A sobrevivência de *Xv* em solo foi investigada em dois tipos de solo, arenoso e argiloso, mantidos nas temperaturas de 20, 25 e 30 °C, em condições de laboratório. A sobrevivência da bactéria em condições de campo foi estudada em solo argiloso infestado artificialmente. Por outro lado, a capacidade de sobrevivência em resíduos de cultura de milho infectados com a bactéria foi investigada utilizando resíduos mantidos na superfície do solo e incorporados ao solo na profundidade de 20 cm. Sob condições controladas, a bactéria sobreviveu por períodos que variaram de quatro a 40 dias, sendo quatro dias em solo arenoso mantido a 30 °C e 40 dias em solo argiloso mantido na temperatura de 20 °C. Os resultados obtidos evidenciaram que a *Xv* possui capacidade de sobreviver por maior período de tempo em solo argiloso. Entretanto a bactéria apresentou capacidade de sobreviver por um período maior em temperatura de 20° C do que em temperaturas mais elevadas, independentemente do tipo de solo. Em relação aos estudos sob condições de campo, a sobrevivência de *Xv* como células livres em solo foi de apenas 48 horas e em resíduos culturais de milho foi por até 15 dias em amostras mantidas na superfície do solo. Nas amostras de resíduos de milho incorporados ao solo, a bactéria foi detectada apenas no momento da instalação do experimento.

**Palavras-chave:** estria bacteriana do milho, sobrevivência em solo, resíduos culturais, tempo de sobrevivência.

## 4.2 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é o cereal mais produzido e consumido no mundo (USDA, 2020), sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial com produção estimada de 112,9 milhões de toneladas em área de 20.944 milhões de hectares na safra 2021/2022 (FIESP, 2022). Cabe salientar que o milho é cultivado em todas as regiões do Brasil, em mais de dois milhões de estabelecimentos agrícolas (CONTINI et al., 2019). No entanto, diversas doenças podem ocasionar perdas significativas na produção, dentre as doenças emergentes relacionadas na cultura no Brasil, a estria bacteriana do milho foi recentemente reportada no País (LEITE JÚNIOR et al., 2019a).

A estria bacteriana, causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xv*), é uma das doenças bacterianas que podem ocorrer na cultura do milho. A doença foi reportada pela primeira vez na África do Sul em 1949 (DYER, 1949), e permaneceu por décadas sem ser registrada em outras regiões produtoras de milho ao redor do mundo. Recentemente, foi constatada em importantes regiões produtoras em países das Américas do Norte e do Sul, incluindo Estados Unidos da América (EUA), Argentina e Brasil (BRODERS et al., 2017; DAMICONE et al., 2018; JAMANN et al., 2019; KORUS et al., 2017; PLAZAS et al., 2018; LEITE JÚNIOR et al., 2019a).

O conhecimento da capacidade de sobrevivência dessa bactéria no solo e em resíduos da cultura de milho é extremamente importante para o estabelecimento de medidas eficientes de manejo da estria bacteriana. A sobrevivência de *Xv* no período de entressafra do milho, mesmo que em baixas populações, pode ser suficiente para garantir a ocorrência de novos ciclos epidêmicos da doença (SCHUSTER; COYNE, 1974; BARAK et al., 2001; GENT et al., 2005; VICENTE; HOLUB, 2013).

As bactérias fitopatogênicas geralmente podem sobreviver associadas a sementes ou órgãos de propagação vegetativa, em tecidos vegetais infectados, em resíduos de cultura, no solo como residentes e epifiticamente na superfície ou no interior de plantas voluntárias da própria cultura ou em outras plantas hospedeiras, cultivadas ou invasoras (SCHUSTER; COYNE, 1974; RYAN et al., 2011, GONÇALVES et al., 2018). O período de sobrevivência das bactérias fitopatogênicas nessas condições é influenciado normalmente por diversos fatores ambientais como temperatura e umidade, e também pelas características físicas, químicas, e biológicas do solo (DE BOER, 1982, LENNON et al., 2012).

Ainda não existem estudos detalhados sobre a sobrevivência da bactéria *Xv* na forma de células livres no solo e em resíduos culturais de milho nas condições subtropicais do Brasil.

Nos EUA, estudos foram conduzidos em campo estudando a sobrevivência de *Xvv* em resíduos de plantas de milho infectadas naturalmente e mantidos na superfície e incorporados ao solo a 10 cm de profundidade (ORTIZ-CASTRO, 2019). Com base nesse estudo, não foi possível recuperar células viáveis de *Xvv*, porém a bactéria foi detectada por PCR em tempo real (qPCR) por até seis meses nos resíduos mantidos no campo. No entanto, a técnica utilizada para detecção, qPCR, não possibilitou determinar se o DNA obtido era de células vivas ou mortas de *Xvv*. Assim, o conhecimento da capacidade de sobrevivência de *Xvv* no solo e em associação com resíduos culturais de milho permitiria a adoção de práticas mais adequadas para o manejo da estria bacteriana no Brasil e em países produtores de milho com condições climáticas semelhantes.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência de *Xvv* no solo e em resíduos de cultura de milho infectados com a bactéria. Foram avaliadas: (i) a influência da temperatura e do tipo de solo na sobrevivência de *Xvv* em condições controladas; (ii) a sobrevivência de *Xvv* em solo sob condições de campo; e (iii) a sobrevivência de *Xvv* em resíduos culturais de milho infectados pela bactéria e mantidos na superfície e incorporados ao solo a 20 cm de profundidade sob condições de campo.

### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.3.1 Obtenção e Manutenção de Isolado de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* Resistente à Rifampicina

Neste estudo foi utilizado o isolado RL1 de *Xvv*, pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IAPAR/Emater (IDR-Paraná), Londrina, PR, Brasil. A identidade do isolado bacteriano foi confirmada por PCR segundo Lang et al., (2017). O isolado RL1 mutante resistente à rifampicina (RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup>) foi obtido pela inoculação de suspensão bacteriana em meio de cultura Ágar Nutriente (AN) (5,0 g de peptona, 3,0 g de extrato de carne, 15,0 g de ágar e 1000 mL de água destilada) (SCHAAD et al., 2001), suplementado com 100 µg mL<sup>-1</sup> de rifampicina, seguido de incubação a 28 °C por 72 h. A confirmação da patogenicidade do mutante bacteriano foi realizada por inoculação em plantas de milho IPR 164 mantidas em casa de vegetação. Para o teste de patogenicidade, foi realizada a semeadura de milho suscetível cultivar IPR 164 em vasos de 5 L contendo mistura de solo, areia e esterco na proporção de 3:1:1. As plantas foram inoculadas por aspersão com suspensão de células do mutante RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup>

ajustada para a concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (DO<sub>600</sub> = 0,1). As plantas foram colocadas em câmara úmida por 24 horas antes e após a inoculação e mantidas em casa de vegetação semi-climatizada, com temperatura entre 25 e 30 °C, na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, em Londrina, PR, Brasil. Comprovada a patogenicidade e agressividade do mutante RL1<sup>Rif+</sup>, procedeu-se ao reisolamento em meio AN contendo rifampicina e posterior foi realizado, a PCR segundo Lang et al., (2017). O mutante bacteriano foi armazenado em tampão fosfato à temperatura ambiente.

#### **4.3.2 Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* em Solo como Células Livres sob Condições Controladas**

Na avaliação da sobrevivência de *Xvv* RL1<sup>Rif+</sup> em diferentes temperaturas e tipos de solo foram realizados três experimentos sob condições controladas em incubadoras do tipo Bioquímica de Demanda de Oxigênio (B.O.D.) (411 FPD, Labstore, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil). O solo utilizado nos experimentos foi coletado em duas áreas agricultáveis localizadas nas regiões Norte e Noroeste do estado do Paraná. O solo arenoso foi coletado na Unidade de Desenvolvimento Tecnológico (UDT) da Cooperativa Agroindustrial Cocamar, localizada no município de Guairaçá/PR (latitude de 22°56'04'' S; longitude de 52°41'08'' W; e altitude média de 518 m acima do nível do mar), e o solo argiloso foi coletado na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, localizada em Londrina (latitude de 23°21'30'' S; longitude de 51°10'17'' W; e altitude média de 585 m acima do nível do mar) (Nitsche et al., 2019). Esses locais foram selecionados visto que seus solos apresentam origem geológicas distintas e diferenças na distribuição granulométrica e, conseqüentemente, com atributos químicos e físicos distintos. O solo arenoso de Guairaçá foi classificado como *Latossolo Amarelo Distrófico* (Typic Haplustox) (LARACH et al., 1984) e o solo argiloso de Londrina como *Latossolo Vermelho Distroférrico* (Rhodic Hapldox) (LARACH et al., 1984). O clima de Guairaçá e de Londrina é classificado como subtropical úmido (Cfa), segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, com temperaturas máximas e mínimas anuais de 29,1 e 17,1 °C, e 27,1 e 16,1°C, respectivamente (Nitsche et al., 2019).

Os solos foram coletados na profundidade de 0-20 cm em áreas sem histórico de cultivo de milho. As propriedades físicas e químicas dos solos estão descritas nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente. A determinação dos atributos químicos do solo foi realizada de acordo com o procedimento de referência utilizado pelo IDR-Paraná e descrito por Pavan et al. (1992). As análises de solo foram realizadas no laboratório de análise de solos e tecidos vegetais do IDR-

Paraná, Londrina, PR.

**Tabela 4.1** - Características físicas dos solos utilizados no estudo da sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vascolorum* sob condições controladas.

Solo	Local	Características do solo			
		Textura	Argila (%)	Silte (%)	Areia (%)
Arenoso	Guairaçá, PR	Arenosa	9	2	89
Argiloso	Londrina, PR	Argilosa	76	14	10

**Tabela 4.2** - Características químicas dos solos utilizados no estudo da sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vascolorum* sob condições controladas.

Solo	pH	P <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	Al <sup>c</sup>	H+Al	Ca <sup>c</sup>	Mg <sup>c</sup>	K <sup>a</sup>	SB <sup>d</sup>	T <sup>e</sup>	V <sup>f</sup>	SAI <sup>g</sup>
	CaCl <sub>2</sub> 0,01M	mg/dm <sup>3</sup>	g/dm <sup>3</sup>	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> de solo							%	
Arenoso	4,50	7,20	4,71	0,21	2,73	0,55	0,24	0,07	0,86	3,59	23,95	19,62
Argiloso	5,00	92,70	16,44	0,04	5,76	5,40	1,85	0,68	7,93	13,69	57,92	0,50

<sup>a</sup>P - K: Mehlich I; <sup>b</sup>C: Walkley – Black; <sup>c</sup>Ca- Mg- Al: KCL M;; <sup>d</sup>SB<sup>d</sup>: Soma das bases; <sup>e</sup>T<sup>e</sup>: Capacidade de troca de cátions; <sup>f</sup>V<sup>f</sup>: Saturação por bases; <sup>g</sup>SAI<sup>g</sup>: Saturação por alumínio

Para a instalação dos experimentos, os solos foram secos à temperatura ambiente por 12 dias e peneirados em malha de 2,0 mm. Alíquotas de 150 gramas de cada solo foram acondicionadas em copos de poliestireno de 400 mL. Os solos arenoso e argiloso foram infestados com 17 mL e 40 mL, respectivamente, de suspensão do mutante RL1<sup>Rif+</sup> da *Xvv* na concentração de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Os copos foram fechados com papel alumínio (15 x 15 cm) e mantidos às temperaturas de 25 e 30 °C no primeiro experimento e por 20, 25 e 30 °C nos segundo e terceiro experimentos. A correção da umidade do solo foi realizada quando necessária de acordo com a avaliação utilizando o protocolo de umidade da Embrapa (EMBRAPA, 1997).

Na avaliação da sobrevivência de *Xvv* foi realizada amostragem de quatro copos para cada tipo de solo e temperatura. As amostras foram processadas individualmente. Após retiradas as amostras, os copos foram retornados à incubadora na temperatura correspondente.

Para determinar a população da *Xvv*, alíquotas de 10 g de solo de cada amostra foram transferidas para erlenmeyer contendo 90 mL de tampão fosfato 0,005 M (1,73 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2000 mL de água destilada, pH 7.0) esterilizado. As amostras foram agitadas em

agitador (250 rpm por 30 min) e mantidas em repouso por mais 30 min com o objetivo de decantar o solo. Amostra de 1 mL do sobrenadante foi coletada, diluída e 100 µl de cada diluição foram plaqueadas em meio AN (SCHAAD et al., 2001) suplementado com rifampicina e ciclohexamida, ambos na dosagem de 100 µg mL<sup>-1</sup>. As placas foram mantidas a 28 °C e realizada a contagem das colônias bacterianas com características do mutante RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> após 72 horas. Como controle negativo, o solo recebeu igual volume de água esterilizada.

Em cada período de avaliação, 5 a 10 colônias bacterianas com características semelhantes da *Xvv* RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> foram selecionadas e caracterizadas por PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para *Xvv*, *Xvv3\_F* (5'-CAAGCAGAGCATGGCAAAC -3') e *Xvv3\_R* (5'-CACGTAGAACCGGTCTTTGG -3'), que amplificam fragmento de 207 pb do genoma da bactéria (LANG et al., 2017). O DNA total de cada cultura bacteriana foi obtido a partir de suspensão de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> submetida a 100 °C em banho maria por 5 min, seguido de resfriamento rápido em gelo.

A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL sendo incluídos: 1,0 µL de cada iniciador (0,5 mM), 1,0 µL de dNTP (5 mM), 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,5 µL de tampão (1X), 0,2 µL de Taq DNA Polymerase Recombinant (5 U µL<sup>-1</sup>), 17,5 µL de água ultrapura e 1 µL de DNA total. 30 ciclos de amplificação foram realizados em termociclador Veriti™ 96-Well (ThermoFisher Scientific, Marsiling Industrial Estate Road 3, Singapore), compreendendo desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento dos iniciadores a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 min.

No primeiro experimento foram realizadas amostragens antes da infestação do solo e aos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 dias após a infestação (d.a.i) com a bactéria RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup>. Nos segundo e terceiro experimentos foram realizadas amostragens antes da infestação do solo e aos 0, 1, 2, 4, 8, 12, 15, 20, 25, 30, 40 e 45 (d.a.i).

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas no tempo, para o primeiro experimento foram avaliados (dois tipos de solo x duas temperaturas) e para o segundo e terceiro experimentos 2 x 3 (dois tipos de solo x três temperaturas). E o tempo utilizado foi até a ausência da bactéria. Os dados obtidos da sobrevivência da bactéria foram expressos em UFC g solo<sup>-1</sup> e convertidos em escala logarítmica (Log<sub>10</sub> UFC g solo<sup>-1</sup>) e submetidos à análise de variância (p < 0,05).. Os pressupostos de normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias foram testados pelos testes de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e Bartlett (BARTLETT, 1965), respectivamente. Foi realizada regressão polinomial, linear ou bisegmentada utilizando o pacote “Segmented” do software R quando constatado efeito significativo (R CORE TEAM, 2020). A análise de sobrevivência da bactéria também foi realizada utilizando o estimador

Kaplan-Meier (KAPLAN; MEIER, 1958). Os tratamentos foram comparados utilizando o teste de *log-rank* ao nível de significância de 5% (SAVAGE, 1956). As análises foram realizadas utilizando o pacote "Survival" em R (R CORE TEAM, 2020).

### 4.3.3 Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* em Solo sob Condições de Campo

Quatro experimentos foram conduzidos em área experimental não cultivada previamente com milho na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR (latitude de 23°21'30'' S; longitude de 51°10'17'' W; e altitude média de 585 m), em área de solo argiloso (Tabela 4.1), durante os anos de 2020 e 2021. As características químicas e físicas do solo são descritas no item 4.3.2.

Os dados de temperaturas máxima e mínima, deumidade relativa do ar e de precipitação durante o período experimental foram obtidos da estação meteorológica do IDR-Paraná em Londrina/PR, instalada a uma distância de aproximadamente 100 metros do experimento. Os dados de umidade do solo foram coletados utilizando o aparelho ML3 ThetaProbe (Low Road, Burwell, Cambridge, Reino Unido), uma vez ao dia no período da tarde. Todas as plantas daninhas da área experimental foram removidas antes da instalação de cada experimento.

Molduras de madeira nas dimensões de 30,0 cm × 30,0 cm × 8,0 cm de largura, comprimento e altura, respectivamente, foram distribuídas na área experimental, separadas entre si pela distância de 60 cm. Para cada experimento foram utilizadas seis molduras de madeira. O solo no interior de cada moldura de madeira foi infestado com 1 L de suspensão do isolado RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> na concentração de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

A amostragem do solo foi realizada utilizando trado manual, coletando até 5 cm de profundidade. Para cada avaliação, três amostras de solo foram removidas de cada parcela para comporem uma amostra composta. As amostras foram coletadas aos 0, 1, 2, 4 e 6 d.a.i. do solo. A sobrevivência de *Xvv* foi avaliada até a ausência de detecção de RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> em pelo menos duas amostragens subsequentes (6 dias). O período de sobrevivência de *Xvv* foi considerado como sendo o da última amostragem com crescimento da bactéria.

Para recuperação de *Xvv*, alíquota de dez gramas de solo de cada amostra composta foi transferida para erlenmeyers de 250 mL contendo 90 mL de solução salina esterilizada e tamponada com fosfato (PBS 0,01 M, pH 7,0). Os enlemeyers foram agitados (200 rpm por 30 min), seguido por repouso de 30 min para sedimentação (SILVA JÚNIOR et al., 2012 ). O sobrenadante foi recuperado e diluído em série, 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-3</sup>, e 100 µL do sobrenadante de cada

diluição foram plaqueados em triplicata em meio AN + rifampicina + ciclohexamida, ambos na concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup>. As placas foram mantidas a 28 °C por 72 h e as colônias idênticas ao do isolado RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> foram quantificadas. De cada amostragem realizada, 5 a 10 colônias bacterianas com características semelhantes às do mutante RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> foram purificadas e caracterizadas por PCR, conforme descrito no item 4.3.2.

Todos os dados foram expressos em Log<sub>10</sub> UFC g solo<sup>-1</sup> e submetidos à análise de variância (p < 0,05). Os pressupostos de normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias foram testados por Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e Levene (LEVENE, 1960), a 5% probabilidade, respectivamente. Quando constatado efeito significativo, a regressão polinomial, linear ou bisegmentada foi realizada utilizando o pacote “Segmented” do software R (R CORE TEAM, 2020). Os tratamentos foram comparados utilizando o teste de *log-rank* (SAVAGE, 1956). As análises foram realizadas utilizando o pacote "Survival" em R (R CORE TEAM, 2020).

#### **4.3.4 Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* Associada a Resíduos de Cultura de Milho**

Dois experimentos foram conduzidos na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR. O primeiro experimento foi realizado no inverno e o segundo na primavera. A área experimental foi cultivada anteriormente com aveia, e mantida livre de plantas invasoras por remoção manual. Os dados climáticos de temperatura e pluviosidade foram obtidos da estação meteorológica de Londrina do IDR-Paraná, localizada a 100 metros da área experimental.

Para a obtenção de resíduos culturais infectados com a bactéria *Xvv*, plantas de milho da cultivar IPR 164 foram cultivadas em casa de vegetação semi-climatizada e inoculadas com suspensão na concentração de 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup> do mutante RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup>. As plantas foram inoculadas aproximadamente 12 dias após a emergência, no estágio fenológico vegetativo de três folhas (V3). Quando os sintomas de estria bacteriana já estavam bem evidentes, aproximadamente 15 d.a.i. , as folhas sintomáticas foram coletadas, secas a temperatura ambiente durante sete dias, armazenadas em sacos de papel e mantidas em câmara fria em temperatura de 8 a 12 °C por aproximadamente 4 meses.

Após armazenagem, amostras contendo oito gramas das folhas secas foram transferidas para sacos de nylon medindo 20 x 30 cm. Os sacos foram amarrados a estacas de madeira de 60 cm de comprimento, sendo 60 sacos mantidos na superfície do solo e os outros 60 enterrados

a uma profundidade de 20 cm. Foi realizada avaliação qualitativa da presença de RL1<sup>Rif+</sup>. A amostra foi considerada portadora de células viáveis do mutante RL1<sup>Rif+</sup> quando pelo menos uma colônia de bactéria foi reisolada. A amostragem para determinar a sobrevivência da bactéria foi realizada no primeiro experimento aos 0, 15, 30, 45 e 60 dias, e no segundo experimento aos 0, 2, 4, 8, 12, 15, 20, 25 e 30 dias após a colocação no solo dos sacos de nylon contendo as folhas de milho com estria bacteriana. Em cada amostragem foram removidos três sacos contendo as folhas de milho mantidos na superfície do solo e três mantidos a 20 cm de profundidade.

As amostras do material vegetal foram pesadas e trituradas em moinho analítico (IKA A11 basic, Staufen, Germany) e depois adicionado solução salina tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, esterilizada e submetidas a banho em ultrasonicador por 20 minutos (Thornton T50, Vinhedo, SP, Brasil). Para cada grama de material vegetal foram adicionados 10 mL de solução salina tampão fosfato. A suspensão obtida de cada amostra foi filtrada em camada dupla de gaze e o líquido foi submetido a diluição seriada,  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ . Aliquotas de 100  $\mu$ L da suspensão e de cada diluição foram inoculadas em meio de cultura AN suplementado com 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de rifampicina e 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de ciclohexamida e mantidas a 28 °C por 72 h. De cada amostragem realizada, 5 a 10 colônias bacterianas com características semelhantes às do mutante RL1<sup>Rif+</sup> foram purificadas e caracterizadas por PCR, conforme descrito no item 4.3.2. Todos os dados foram expressos em Log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> de planta. A análise estatística foi a mesma descrita no item 4.3.3.

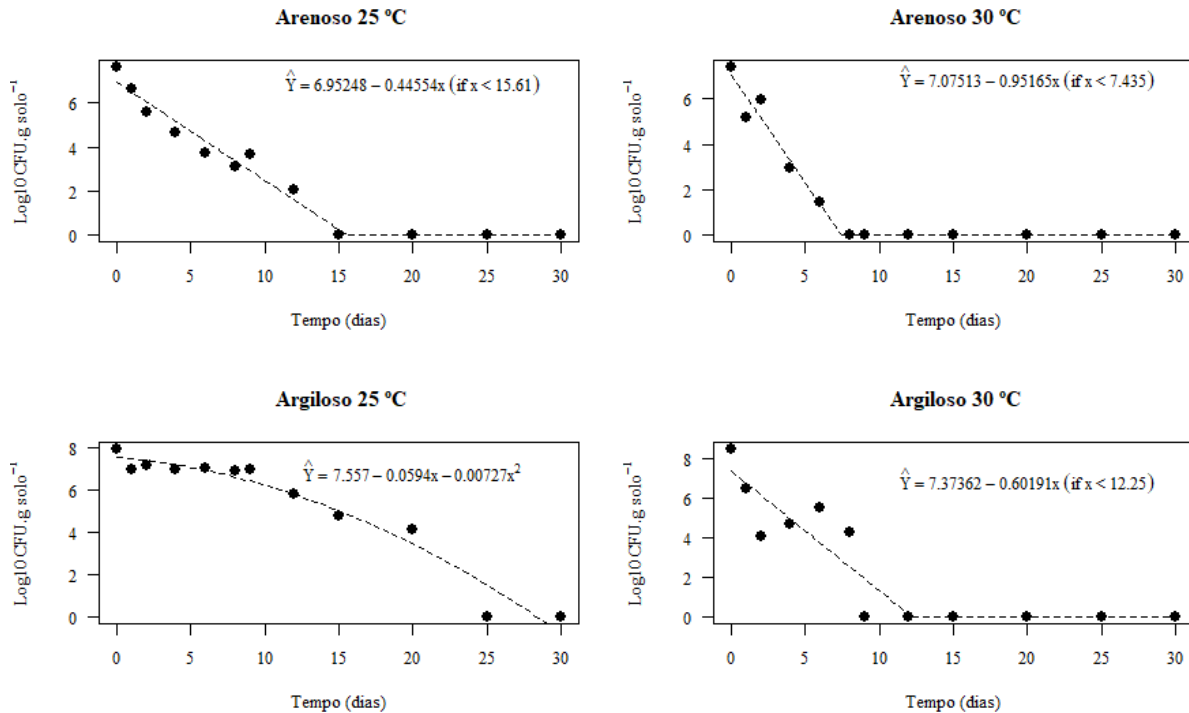
## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* em Solo sob Condições Controladas

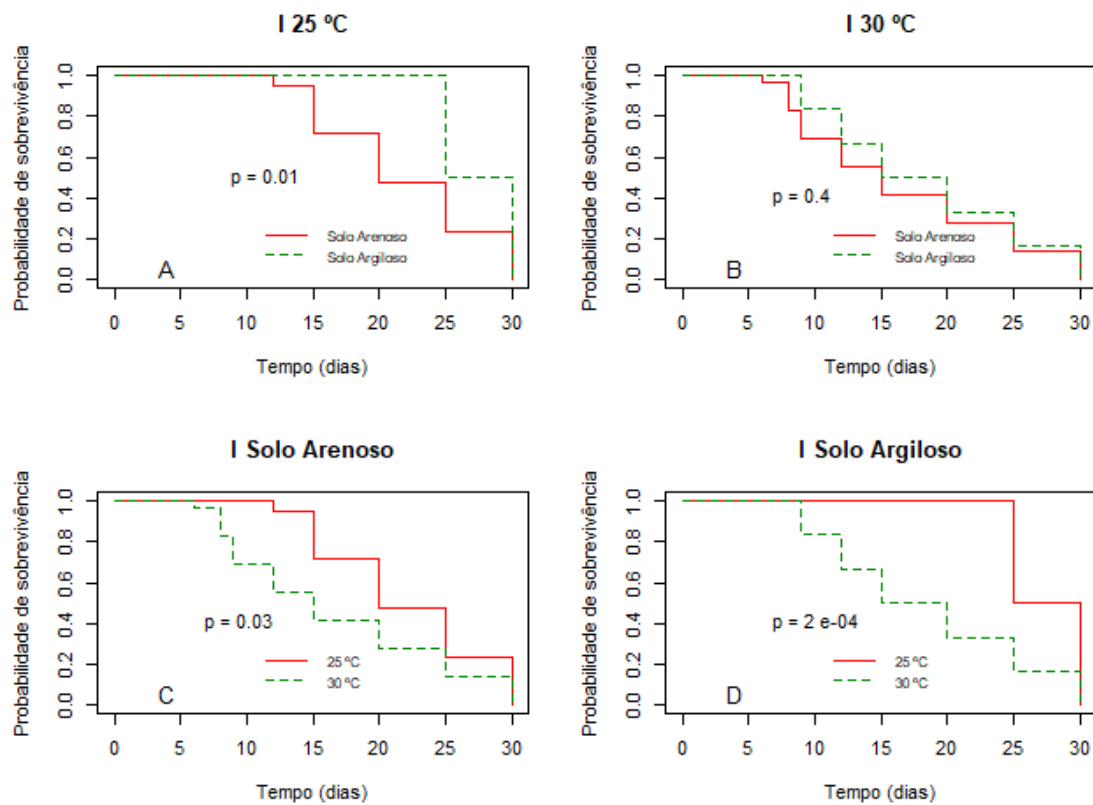
A sobrevivência da *Xvv* em solo como células livres foi influenciada pela temperatura e pelo tipo de solo. Houve diferenças significativas no período máximo de sobrevivência e na população bacteriana. No primeiro experimento, o período máximo de sobrevivência da bactéria variou de 6 a 20 dias, dependendo do tipo de solo e da temperatura empregada (Figura 4.1). A bactéria sobreviveu por um período máximo de até seis dias em solo arenoso mantido a 30 °C, porém o período de sobrevivência se estendeu por até 20 dias em solo argiloso mantido a 25 °C (Figura 4.1).

Com base na análise de Kaplan-Meier, foi possível observar que a sobrevivência de *Xvv*

em solo arenoso diferiu significativamente da sobrevivência em solo argiloso para a temperatura de 25 °C ( $p$ -value = 0,01) (Figura 4.2). Entretanto, não houve diferenças entre os solos para o período máximo de sobrevivência na temperatura de 30 °C ( $p$ -value = 0,4) (Figura 4.2). A sobrevivência em solo arenoso e em solo argiloso mantidos nas temperaturas de 25 e 30 °C foram significativamente diferentes ( $p$ -value = 0,03 e  $p$ -value =  $2e10^{-4}$ , respectivamente) (Figura 4.2).



**Figura 4.1** - Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vascularum* isolado RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> em solo arenoso e argiloso, mantidos em temperaturas de 25 e 30 °C no primeiro experimento.

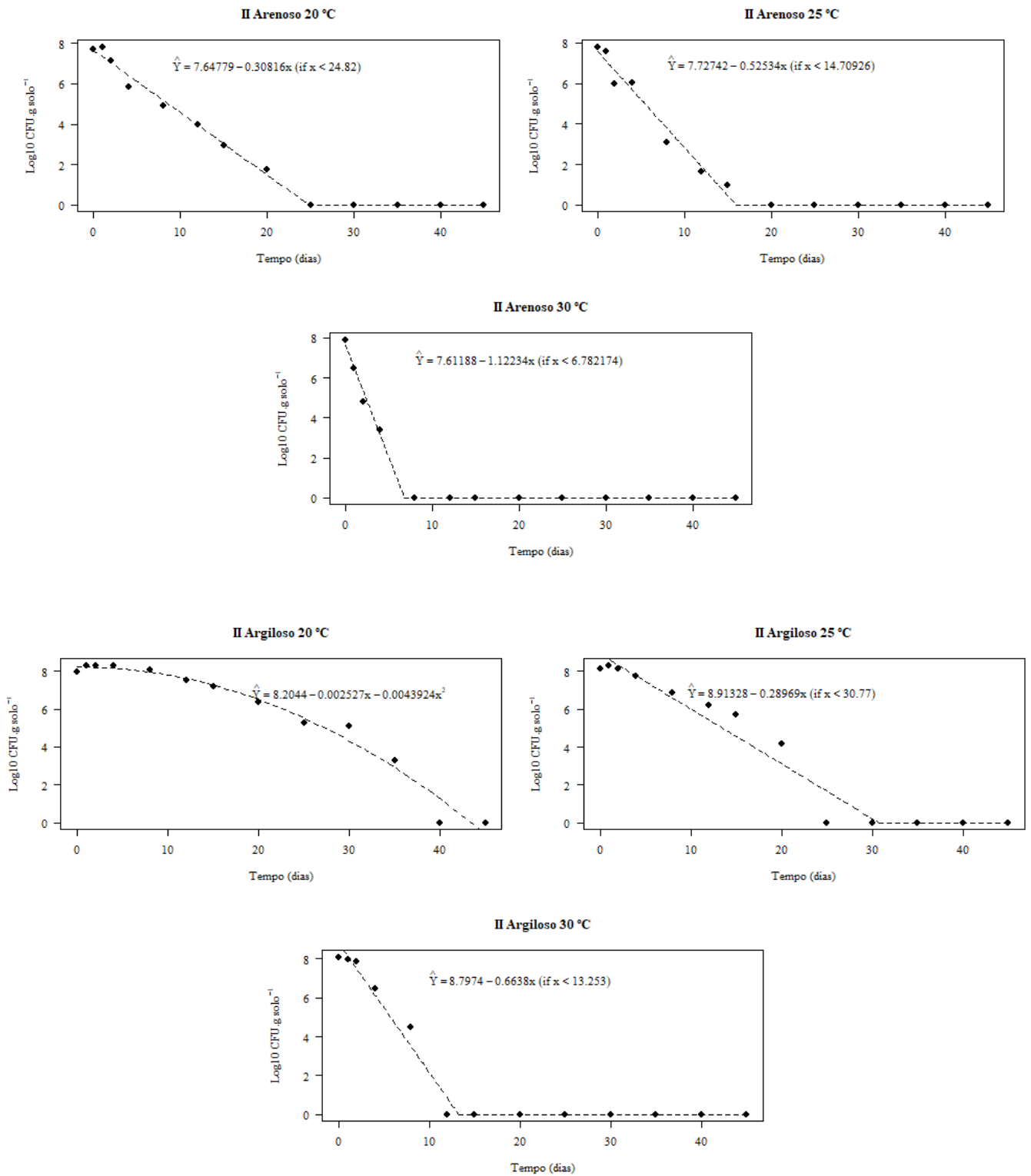


**Figura 4.2** - Análise de Kaplan-Meier para a sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* isolado RL1<sup>Rif<sup>r</sup></sup> em função do tempo (dias) após a infestação de solos arenoso e argiloso mantidos nas temperaturas de 25 e 30 °C no primeiro experimento. O teste Log-Rank foi utilizado para as comparações.

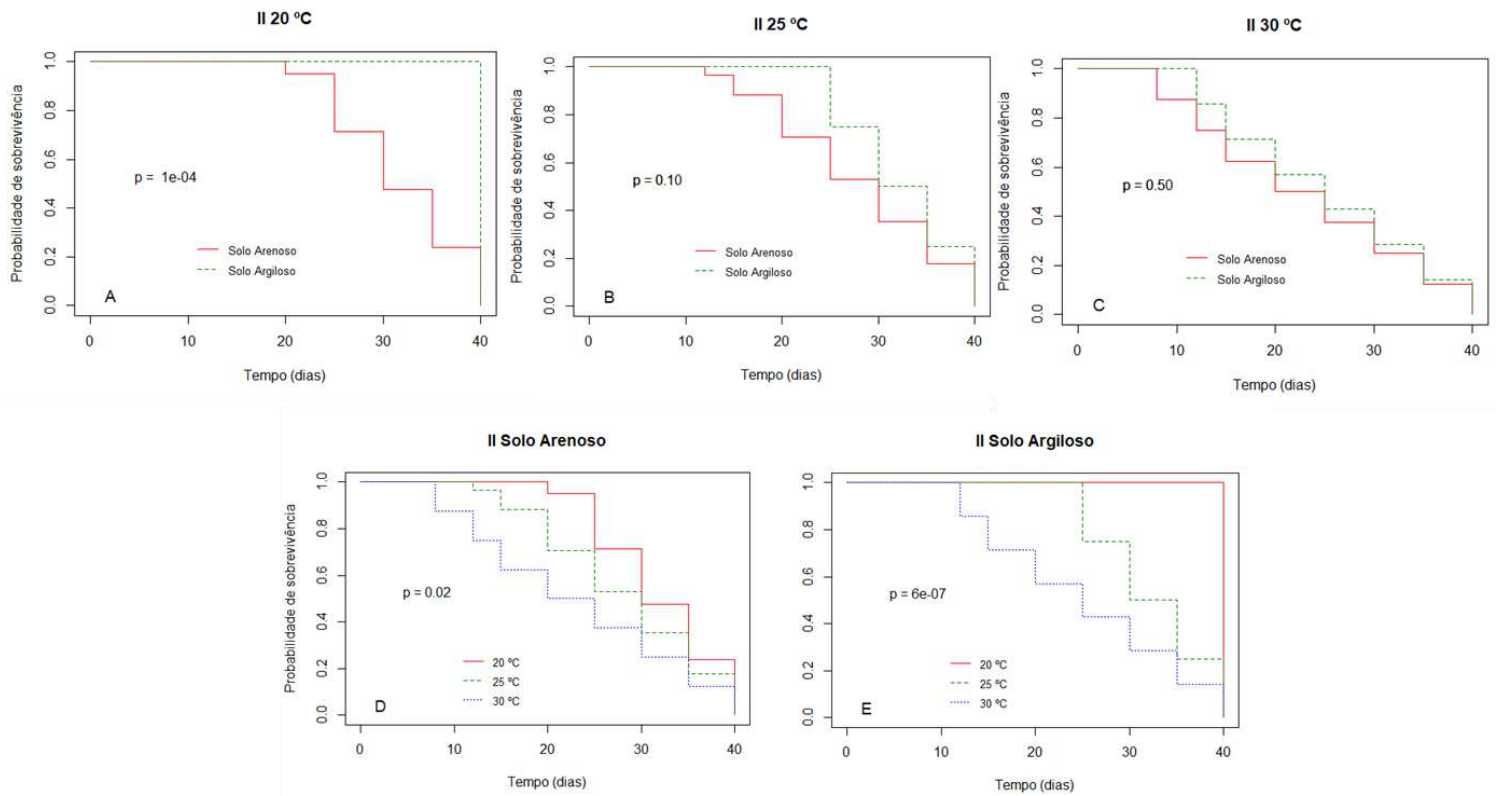
A sobrevivência da bactéria *Xyv* foi estudada novamente nos dois tipos de solo, arenoso e argiloso, porém mantidos em temperaturas de 20, 25 e 30 °C. A sobrevivência da bactéria variou de 4 a 35 dias no segundo experimento (Figura 4.3) e de 4 a 40 dias no terceiro experimento (Figura 4.5). No solo argiloso, o tempo máximo de sobrevivência do mutante RL1 Rif<sup>+</sup> da bactéria *Xyv* foi de 35 dias no segundo experimento (Figura 4.3) e de 40 dias no terceiro experimento (Figura 4.5). Por sua vez, no solo arenoso o tempo máximo de sobrevivência da bactéria em ambos experimentos foi de até 20 dias, mantido na temperatura de 20 °C (Figura 4.3, 4.5). Independentemente do tipo de solo, o período máximo de sobrevivência da bactéria *Xyv* foi na temperatura de 20° C e o mínimo na temperatura de 30 °C (Figura 4.3, Figura 4.5).

A análise Kaplan-Meier para a sobrevivência da bactéria *Xyv* revelou que houve diferença significativa na sobrevivência da bactéria entre solo arenoso e argiloso para a temperatura de 20 °C, de acordo com o teste de Log-Rank (Fig. 4.4A, Fig. 4.6A). Assim, existiu uma maior probabilidade da bactéria sobreviver por um período mais longo em solo argiloso mantido na temperatura de 20 °C. No terceiro experimento, também foi observado que na temperatura de 25 °C houve diferença significativa entre o solo arenoso e argiloso para a sobrevivência da bactéria ( $p$ -value = 0,003) (Figura 4.6B).

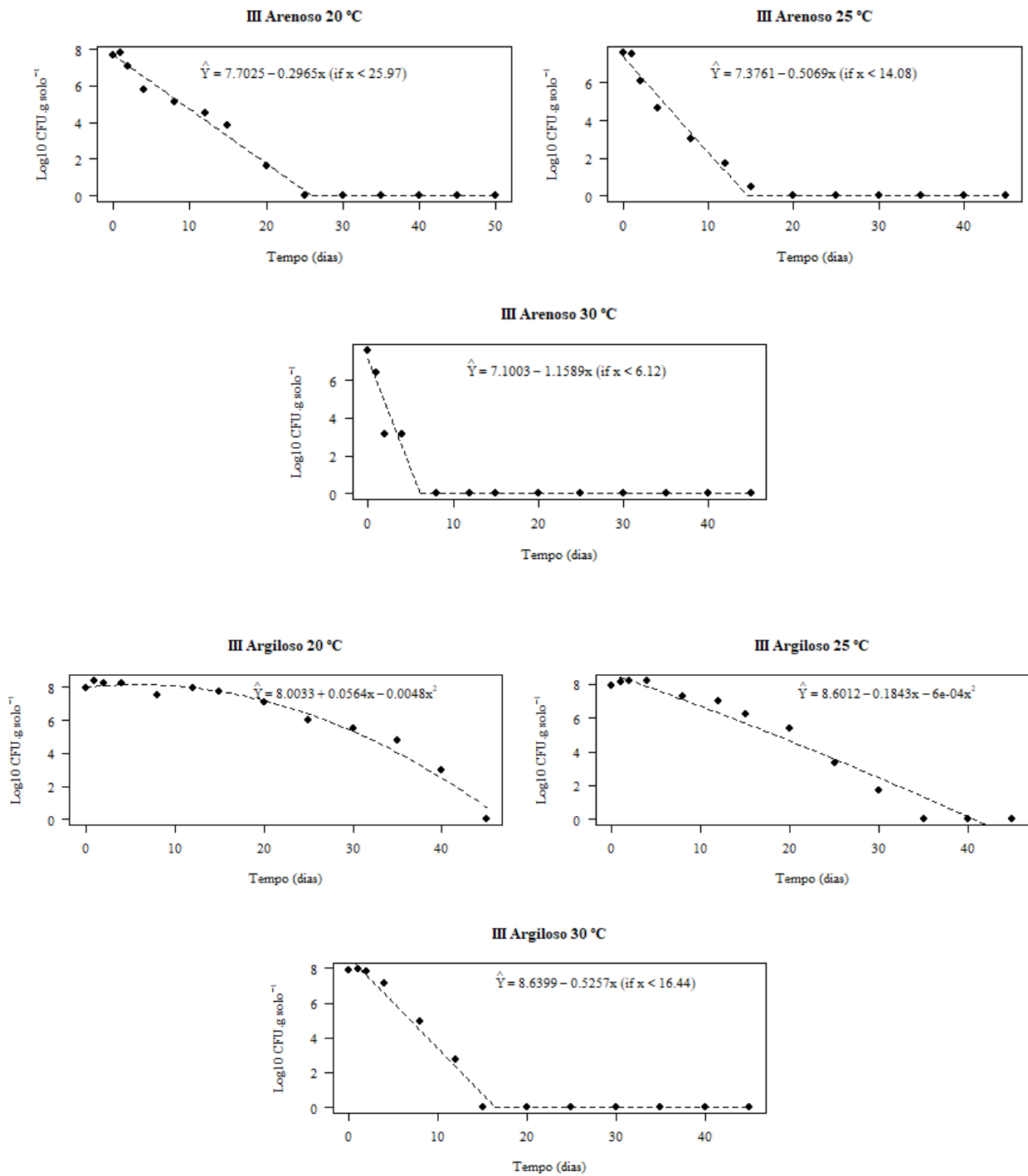
Diferenças significativas foram verificadas na sobrevivência da bactéria tanto no solo arenoso como no argiloso nas três temperaturas testadas (Figuras 4.4D, 4.6D, 4.4E e 4.6E). Comparando todos os tipos de solo e temperaturas, a sobrevivência de *Xyv* no solo argiloso foi significativamente maior na temperatura de 20 °C, quando comparada com a sobrevivência nas temperaturas de 25 e 30 °C (Figuras 4.3 e 4.5).



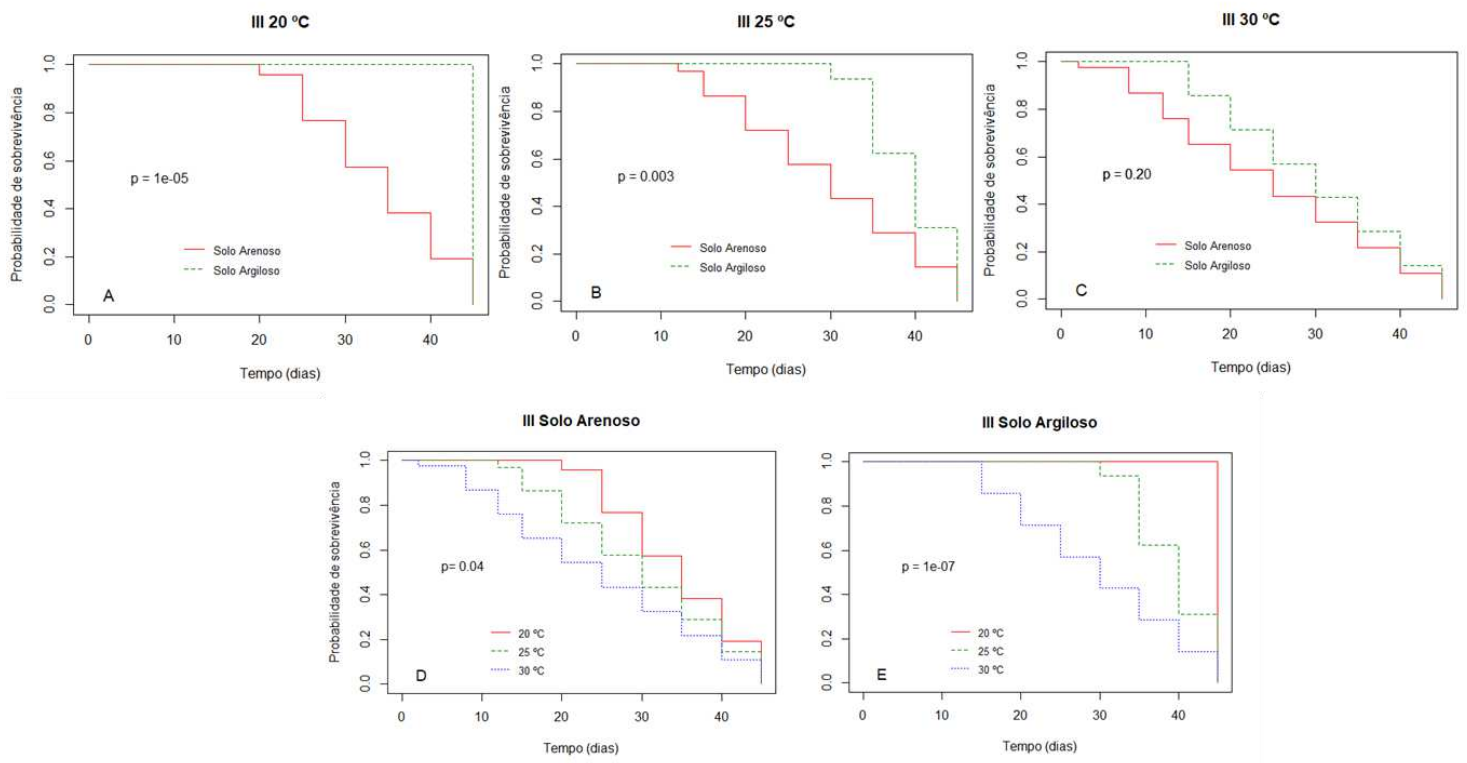
**Figura 4.3** - Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* isolado RL1<sup>Rif<sup>r</sup></sup> em solos arenoso e argiloso mantidos em temperaturas de 20, 25 e 30 °C no segundo experimento.



**Figura 4.4** - Gráficos de Kaplan-Meier da sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* isolado RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> em função do tempo (dias) após a infestação artificial em solos arenoso e argiloso mantidos a 20, 25 e 30 °C no segundo experimento. O teste de Log-Rank foi utilizado para as comparações.



**Figura 4.5** - Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vascularum* isolado RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> em solos arenoso e argiloso mantidos em temperaturas de 20, 25 e 30 °C no terceiro experimento.



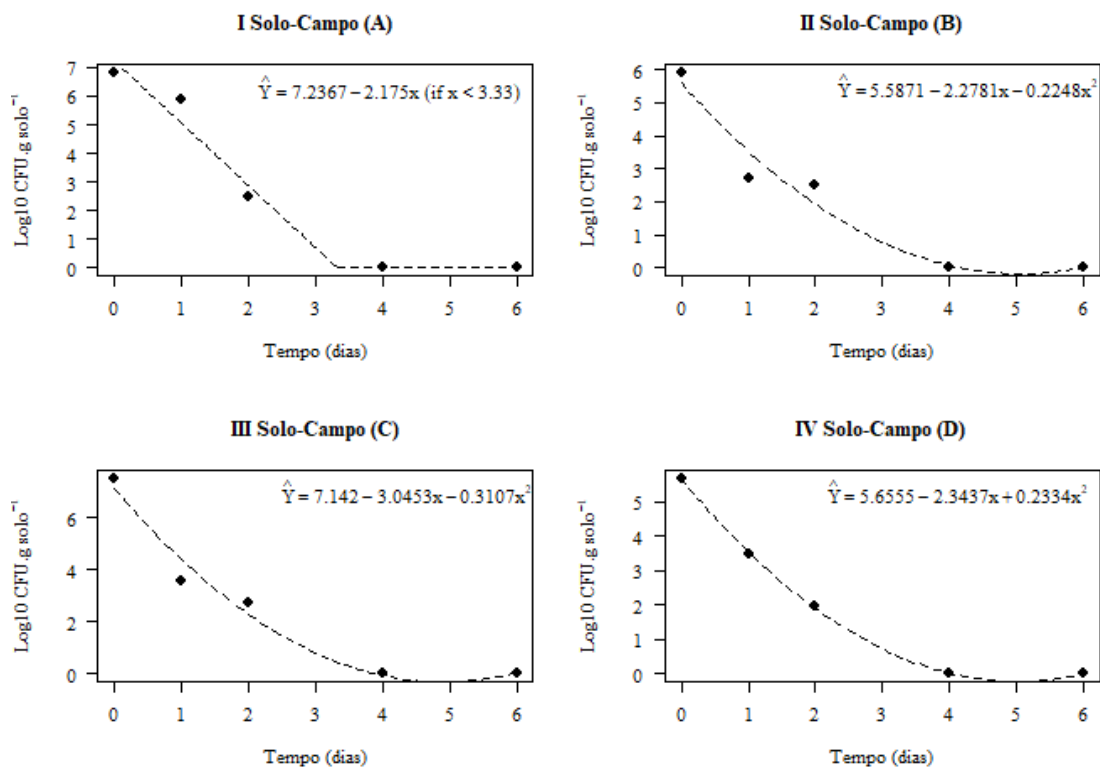
**Figura 4.6** - Gráficos de Kaplan-Meier da sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* isolado RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> em função do tempo (dias) após a infestação artificial em solos arenoso e argiloso mantidos a 20, 25 e 30 °C no terceiro experimento. O teste de Log-Rank foi utilizado para as comparações.

#### **4.4.2 Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* em Solo sob Condições de Campo**

O período máximo de recuperação do isolado RL1<sup>Rif+</sup> de solo sob condições de campo foi de dois dias em experimentos realizados nos anos de 2020 e 2021 (Figura 4.7). As condições meteorológicas durante os períodos experimentais estão apresentadas na tabela 4.3. A precipitação acumulada durante as 48 horas de sobrevivência da bactéria de cada experimento variou de zero no quarto experimento a 30,8 mm no primeiro experimento (Tabela 4.3). E as umidades do solo variaram de 3 a 22 % no quarto experimento e 33 a 90 % no primeiro experimento. As temperaturas mínimas variaram de 19,1 a 23,5 °C e as máximas de 29,2 a 34,2 °C (IDR-PARANÁ, 2022).

**Tabela 4.3** - Temperatura média (Tmed), precipitação pluviométrica (PREC) umidade relativa (UR) e de umidade do solo (US), durante os períodos experimentais de avaliação da sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* isolado RL1<sup>Rif<sup>r</sup></sup> em solo sob condições de campo conduzidos na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR. Brasil, nos anos de 2020 e 2021.

Dia	Experimento (Período)																							
	I (18-11-20 a 24-11-20)						II (08-02-21 a 14-02-21)						III (24-02-21 a 02-03-21)						IV (03-05-21 a 09-05-21)					
	Tmed (°C)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	PREC (mm)	UR (%)	US (%)	Tmed (°C)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	PREC (mm)	UR (%)	US (%)	Tmed (°C)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	PREC (mm)	UR (%)	US (%)	Tmed (°C)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	PREC (mm)	UR (%)	US (%)
0	19,2	25	17,5	30,6	95	90	22,8	28,8	16,8	0	64	18	25,1	34,2	20,1	0,2	75	16	21,5	29	14,9	0	64	3
1	21,4	28,7	17,1	0,2	77	33	22,2	27,7	16,6	0	72	34	23,5	31,4	18,7	4,2	84	20	22	30,2	14,5	0	59	22
2	21,5	29,2	14,7	0	63	33	23,5	30,9	17,6	0	69	21	24,1	31,3	19,5	0	73	16	22,7	30,6	16,1	0	52	14
3	22,8	30,5	15,3	0	60	27	20,7	24,4	18,3	12,4	92	100	22,9	30,5	17,9	11	79	30	21,3	29,7	14,5	0	63	5
4	23,6	32,3	16,2	0	58	25	21,2	25,9	17,1	0,2	90	80	21,6	25,8	19,8	13,8	90	95	17,4	22	14,5	0	81	5
5	23,9	31,3	16,9	0	52	20	23,6	31,1	17,9	0	83	60	21,5	29,6	18,6	5,2	92	95	17,7	25,3	12	0	76	0
6	25,4	33,6	16,9	0	53	18	21,6	25,9	18	32,8	91	100	22,6	30,8	19,1	0,2	89	90	19,1	26,9	11,8	0	70	0



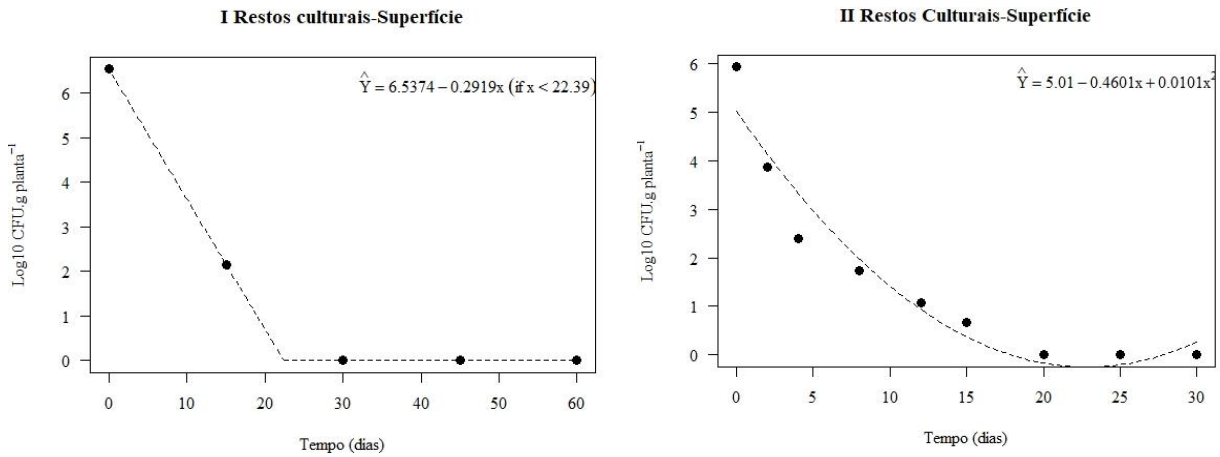
**Figura 4.7** - Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* isolado RL1<sup>Rif<sup>+</sup></sup> em solo sob condições de campo em quatro experimentos conduzidos na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR. Brasil, nos anos de 2020 e 2021.

#### 4.4.3 Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* Associada a Resíduos de Cultura de Milho

Nos dois experimentos realizados nas estações, inverno e primavera, o período máximo de recuperação da bactéria *Xvv* foi até 15 dias em resíduos culturais de milho mantidos na superfície do solo (Figura 4.8 e Tabela 4.4). Nos resíduos de cultura incorporados ao solo a 20 cm de profundidade somente foi possível a recuperação da bactéria no momento de instalação dos experimentos.

Durante os primeiros 15 dias após a instalação do experimento, as precipitações acumuladas foram de 5,2 mm para o primeiro experimento e de 60 mm para o segundo (Figura 4.9).

As temperaturas máximas e mínimas médias nos primeiros 15 dias da instalação dos experimentos foram respectivamente de 25,7 e 12,1 °C no primeiro experimento e de 31,4 °C e 19,4 °C no segundo experimento (Figura 4.9).



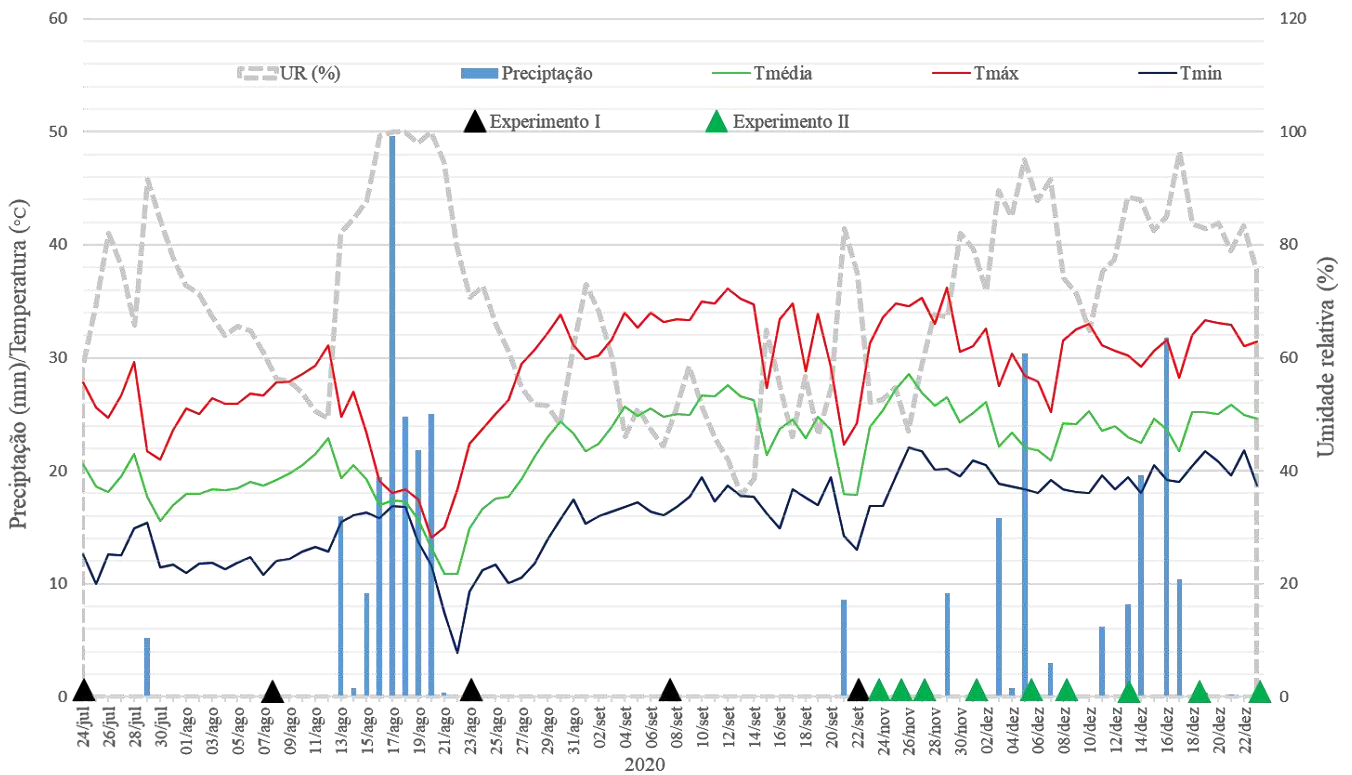
**Figura 4.8** - Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* isolado RL1<sup>Rif+</sup> em resíduos culturais de milho mantidos na superfície e incorporados ao solo sob condições de campo em experimentos conduzidos na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR. Brasil, no primeiro (I) e segundo experimento (II) do ano 2020.

**Tabela 4.4** - Sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* em resíduos de cultura de milho mantidos na superfície e incorporados ao solo a 20 cm de profundidade, no primeiro (I) e segundo (II) experimentos no ano de 2020, conduzidos na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR. Brasil.

Dia da amostragem <sup>a</sup>	Superfície do Solo		Incorporado ao solo	
	I	II	I	II
0	+	+	+	+
2	N/A <sup>b</sup>	+	N/A	-
4	N/A	+	N/A	-
8	N/A	+	N/A	-
12	N/A	+	N/A	-
15	+	+	-	-
20	N/A	-	N/A	-
25	N/A	-	N/A	-
30	-	-	-	-
45	-	N/A	-	N/A
60	-	N/A	-	N/A

<sup>a</sup>Dia após o início do experimento. <sup>b</sup>N/A, não avaliado. + presença. - ausência.

<sup>b</sup>N/A, não avaliado.



**Figura 4.9** - Precipitação (mm), temperaturas mínima, máxima e média (°C), umidade relativa do ar (%) durante o período em que foi avaliada a sobrevivência de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* associada a resíduos de cultura de milho em experimentos conduzidos na Estação Experimental de Londrina do IDR-Paraná, Londrina, PR, Brasil. As setas indicam os momentos de amostragem para avaliação em ambos os experimentos (I e II).

#### 4.5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a sobrevivência de *Xvv* em solo sob condições controladas e de campo, e em resíduos de cultura de milho infectados com a bactéria sob condições de campo. Este é o primeiro relato no Brasil da sobrevivência de *Xvv* em condições de agricultura subtropical. Para o estudo, foi obtido o mutante RL1<sup>Rif+</sup> de *Xvv*, que apresentou estabilidade em relação à resistência ao antibiótico rifampicina, com crescimento no meio de cultura AN+Rif+ciclohexamida e patogenicidade ao milho, similar ao isolado original RL1. Essas características foram importantes para que o mutante pudesse ser utilizado nos estudos de sobrevivência da bactéria *Xvv* em solo e em resíduos de cultura. Cabe salientar que em condições naturais de campo é incomum a presença de bactérias resistentes à determinados antibióticos como por exemplo a rifampicina (CINTAS et al., 2006). Assim, a utilização desse marcador em *Xvv* possibilitou monitorar a dinâmica populacional da bactéria, visto que as amostras de solo provenientes do campo possuíam alta diversidade microbiana.

A sobrevivência da bactéria *Xvv* como célula livre em solos foi influenciada pela temperatura e tipo de solo. O período de sobrevivência da bactéria variou de quatro a 40 dias em solo sob condições controladas, sendo o período mais longo de sobrevivência em solo argiloso mantido a 20 °C. Cabe salientar que temperaturas em torno de 20 °C têm favorecido a sobrevivência de *Xvv* no solo quando comparado a temperaturas de 30° C. Além disso, resultados semelhantes tem sido obtidos para outras bactérias fitopatogênicas, como por exemplo *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* que sobreviveu em solo por 14 dias a 20 °C, mas somente quatro dias quando mantido a 30 °C (SILVA JÚNIOR et al., 2020).

A sobrevivência de bactérias fitopatogênicas no solo pode ser afetada por diversos fatores ambientais, como condições meteorológicas, propriedades físico-químicas do solo, atividades microbianas, e também por práticas culturais (DE BOER 1982; SCHUSTER; COYNE, 1974). Por exemplo a variação de sobrevivência das bactérias no solo pode ser influenciada por características mineralógicas desses solos (HATTORI, 1973). Em solos argilosos, as bactérias poderiam sobreviver por períodos mais longos, pois estariam protegidas em agregados de argila (HATTORI, 1973). Nessas condições, são formadas estruturas protetoras em torno das células bacterianas (MARSHALL, 1971). Esse envoltório reduziria as perdas de água e poderiam proteger as células bacterianas durante períodos de dessecação e reidratação do solo (MARSHALL, 1971) e também propiciaria proteção contra antagonistas (HATTORI, 1973). Em contraste, solos arenosos teriam uma menor capacidade para propiciar condições de sobrevivência para a bactéria devido à baixa formação de agregados, em

comparação com os solos argilosos (HATTORI, 1973). Em estudos sobre a sobrevivência em diferentes tipos de solo, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* sobreviveu por mais tempo em solos argilosos em comparação com a sobrevivência em solos de textura média (SILVA JÚNIOR et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2022).

Como o período de sobrevivência da bactéria sob condições controladas foi mais longo em solo argiloso, a área escolhida para realizar os experimentos de sobrevivência da *Xvv* sob condições de campo foi com este tipo de solo. Entretanto, a *Xvv* apresentou baixa capacidade de sobrevivência na forma de células livres em solo sob condições de campo. A bactéria sobreviveu por apenas 48 horas em todos os experimentos realizados a campo, mesmo tendo sido aplicada ao solo suspensão bacteriana com concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (Figura 4.7).

A maioria das bactérias fitopatogênicas que causam doenças somente no filopiano das plantas encontram dificuldades para sobreviver no solo, na ausência de plantas hospedeiras. Uma ativa flora microbiana, constituída por vários microrganismos como actinobactérias, bactérias, fungos, nematoides e protozoários (SCHUSTER; COYNE, 1974), exerceria considerável antagonismo sobre as bactérias fitopatogênicas no solo (JANSE, 2005). A ação antagonista ou competitiva de microrganismos pode interferir na sobrevivência de bactérias mediante a produção de compostos químicos prejudiciais à bactéria, ou até mesmo competindo por nutrientes e nichos de sobrevivência (THEODORO; MARINGONI, 2002).

No presente estudo foi observado rápido declínio da população da *Xvv* no solo, provavelmente devido à competição com a microflora presente no solo. Fatores climáticos, principalmente precipitação, temperatura, e umidades do ar e do solo, devem também ter influenciado na curta sobrevivência da bactéria no solo sob condições de campo. A temperatura pode influenciar a sobrevivência de *Xvv* como foi verificado nos estudos conduzidos em solo argiloso sob condições controladas. Nessas condições, a bactéria sobreviveu por apenas 12 dias na temperatura de 30 °C e por 30 dias a 25 °C. Contudo, é importante ressaltar, que embora a temperatura máxima durante os experimentos tenha variado de 26,9 a 32,8 °C em média nos dois primeiros dias de avaliação, essa variação aparentemente não interferiu na sobrevivência da bactéria no solo. Aparentemente também não houve respostas de *Xvv* para as diferenças contrastantes de precipitação e de umidade que ocorreram durante os períodos experimentais. Assim, é possível que a *Xvv* introduzida no solo possa ter tipo um custo de adaptação que teria reduzido a sua capacidade de sobrevivência nessas condições de campo.

Estudos com outras bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* revelaram resultados variáveis de sobrevivência no solo. Como exemplos, a *X. campestris* pv. *campestris* que sobreviveu por apenas quatro a sete dias (SILVA JÚNIOR et al., 2020), a *X. vasicola* pv.

*musacearum* que sobreviveu por até 20 dias (MWEBAZE et al., 2006), a *X. citri* subsp. *malvacearum* que sobreviveu até 50 dias (ALLIPI, 1989), e a *X. citri* subsp. *citri* sobrevivendo por 120 dias na superfície do solo (GRAHAM et al., 1989).

A sobrevivência de bactérias associadas a resíduos culturais é uma característica comum de muitas *Xanthomonas* spp. (FAYETTE et al., 2018). Na literatura são relatados diversos estudos envolvendo a capacidade de sobrevivência de outras *Xanthomonas*. Entretanto, o período de sobrevivência varia conforme a espécie bacteriana (TORRES, MARINGONI, SILVA-JÚNIOR, 2009; MWEBAZE et al., 2006; ZHAO, DAMICONE, BENDER, 2002). Nos estudos envolvendo a sobrevivência de *Xv* em resíduos culturais de milho, o período máximo de sobrevivência foi de 15 dias para aqueles mantidos na superfície do solo (Figura 4.8). Muito embora tenha ocorrido variações nas condições climáticas durante os períodos experimentais, principalmente em relação à temperatura e precipitação que variaram de 25,6 °C a 31,5 °C e de 5,2 mm a 60 mm, respectivamente (Figura 4.9).

Estudos com *X. phaseoli* pv. *manihotis* sob condições controladas revelaram a sobrevivência em solos da bactéria por menos de 60 dias na presença de alta umidade e por mais de cinco meses sob condições de seca (FANOUE, ZINSOU, WYDRA, 2017). Precipitação e umidade do solo desempenharam papel decisivo na rápida deterioração de resíduos de mandioca e contribuíram para a curta sobrevivência de *X. phaseoli* pv. *manihotis* (FANOUE, ZINSOU, WYDRA, 2017). Estudos com *X. translucens* pv. *translucens* (MILUS; MIRLOHI, 1995) e *X. vesicatoria* (JONES et al., 1986) indicaram que a temperatura pode reduzir a sobrevivência dessas bactérias em resíduos culturais. Entretanto, nossos resultados com a *Xv* não permitem conclusivamente correlacionar as variáveis climáticas com o tempo de sobrevivência da bactéria nas diferentes condições.

A sobrevivência de bactérias fitopatogênicas em resíduos culturais mantidos na superfície do solo é mais longa em relação à sobrevivência em resíduos incorporados ao solo. Podemos citar estudos realizados com *X. phaseoli* pv. *manihotis* (FANOUE, ZINSOU, WYDRA, 2017), *X. vesicatoria* (JONES et al., 1986), *X. citri* subsp. *citri* (GRAHAM et al., 1989) e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (FATMI; SCHAAD, 2002). As bactérias fitopatogênicas normalmente não produzem estruturas de resistência ou de sobrevivência, sendo assim, tem um período de sobrevivência relativamente maior em condições mais secas. Isto ocorre com resíduos culturais mantidos próximos à superfície do solo, em comparação com aqueles incorporados ao solo, pois estariam protegidos da ação da microbiota antagônica naturalmente presente no solo. Cabe lembrar que essa microfauna depende de água para as atividades metabólicas e também para se movimentar (TORRES, MARINGONI, SILVA

JÚNIOR, 2009).

Segundo Leben (1981), quando microrganismos são expostos à dessecação, baixa temperatura, aumento da concentração de sal ou outro fator, ocorre desaceleração do metabolismo, dormência ou um estado hipobiótico. Quando a umidade do solo é baixa, a decomposição é mais lenta, ou até interrompida, e com isso a sobrevivência da bactéria é prolongada (TORRES, 2001). Consequentemente, a capacidade de sobrevivência de células bacterianas em estado de metabolismo ativo é menor, comparativamente às aquelas em estado de metabolismo reduzido (SCHUSTER; COYNE, 1977). Quando há umidade, tanto os resíduos quanto as próprias células das bactérias fitopatogênicas são rapidamente degradados pelos componentes da microbiota do solo (TORRES, 2001).

Nos resíduos culturais de milho infectados com a bactéria e incorporados ao solo a 20 cm de profundidade, células viáveis de *Xv* foram recuperadas apenas no dia da instalação dos experimentos (Tabela 4.4). Porém, a ausência de detecção por isolamento em meio de cultura seletivo pode não ser totalmente indicativo da ausência do patógeno nos resíduos de cultura. A bactéria poderia estar presente em níveis não detectáveis por meios convencionais. Ortiz-Castro (2019) analisou a sobrevivência de *Xv* associada a resíduos culturais de milho contaminados naturalmente nos EUA, e não conseguiu recuperar bactérias viáveis desses resíduos culturais mantidos na superfície do solo e nem daqueles incorporados ao solo, após seis meses. Entretanto, pela metodologia de qPCR detectou *Xv* nesses resíduos, porém não sendo possível determinar se a bactéria estava viável pela metodologia empregada. Além disso, foi observado que havia mais bactérias nos resíduos culturais mantidos na superfície do solo, em comparação com os incorporados ao solo. Estes resultados corroboram com os obtidos no presente estudo. Resultados semelhantes foram também obtidos com *X. hortorum* pv. *vitians*. as células viáveis da bactéria foram recuperadas de resíduos culturais mantidos na superfície do solo por até 30 dias, enquanto que nas amostras incorporadas ao solo, não foi possível a recuperação da bactéria (FAYETTE et al., 2018).

Os resultados obtidos mostram que a *Xv* sobrevive por um curto período de tempo em solo e em resíduos culturais infectados sob condições de campo. Esse curto período de sobrevivência sugere que o solo e os resíduos de milho de safras anteriores não seriam importantes fontes de inóculo primário para a próxima cultura de milho. Esta sobrevivência é ainda menor na sucessão milho-soja, pois a soja não é uma planta hospedeira de *Xv* e existe um período de pousio entre a colheita de milho e semeadura de soja. No entanto, é importante remover das lavouras de milho plantas invasoras como *Digitaria horizontalis*, *D. insularis*, *Echinochloa colonum*, *Eleusine indica* e plantas cultivadas voluntárias potenciais hospedeiras

da bactéria, como *Avena sativa*, *A. strigosa*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, pois elas poderiam servir como reservatórios epifíticos de *Xvv*. Também é recomendado não realizar a sucessão de milho com espécies hospedeiras e potenciais hospedeiras da bactéria.

#### **4.6 CONCLUSÕES**

Este é o primeiro estudo sobre a sobrevivência de *Xvv* no solo, sob condições controladas e a campo, e em resíduos culturais a campo em ambiente subtropical brasileiro. *Xvv* pode sobreviver como células livres no solo em condições controladas de 4 a 40 dias dependendo do tipo de solo e da temperatura, porém apresenta reduzida capacidade de sobrevivência no solo em condições de campo de apenas 48 horas e de 15 dias associada a resíduos culturais de milho.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

a) As gramíneas *Avena sativa*, *Avena strigosa*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Brachiaria brizantha* (cv. Brizantha e cv. Marandu), *Digitaria horizontalis*, *Digitaria insularis*, *Echinochloa colonum*, *Eleusine indica* e *Sorghum arundinaceum* são hospedeiros sintomáticos da bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv);

b) A bactéria Xvv apresenta capacidade de colonização epifítica em plantas cultivadas como *Saccharum officinarum*, *Triticum aestivum*, *Phaseolus vulgaris*, *Helianthus annuus* e *Glycine max*, plantas de adubação verde como *Mucuna aterrima* vc. *mucuna preta* e *Pennisetum glaucum*, forrageiras e de pastagens como *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*, *Brachiria ruzisiensis* e *Panicum maximum*, e invasoras como *Brachiaria plantaginea*, *Amaranthus viridis* e *Conyza* sp. As plantas invasoras *Chloris polydactyla*, *Galinsoga paviflorae* e *Richardia brasiliensis* não apresentaram colonização epifítica de Xvv. O período máximo de sobrevivência epifítico da bactéria foi de 30 dias em 19 espécies avaliadas;

c) A sobrevivência da bactéria Xvv como células livres no solo sob condições controladas pode variar de 4 a 40 dias, dependendo do tipo de solo e da temperatura. O tempo máximo de sobrevivência foi em solo argiloso em temperatura de 20 °C. Na temperatura de 30 °C, a sobrevivência foi menor, independentemente do tipo de solo;

d) A bactéria Xvv apresentou reduzida capacidade de sobrevivência no solo em condições de campo, no máximo 48 horas;

e) A sobrevivência de Xvv associada a resíduos culturais de milho foi influenciada pela incorporação ou não do material vegetal ao solo. O tempo máximo de sobrevivência da bactéria em resíduos de milho mantidos na superfície do solo foi de 15 dias.

## REFERÊNCIAS

- ADEGAS, F. S.; VOLL, E.r; GAZZIERO, D. L. P.. Manejo de plantas daninhas em milho safrinha em cultivo solteiro ou consorciado à braquiária ruziziensis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 10, p. 1226-1233, 2011.
- ALIPPI, A. M. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in soil. **Turrialba Volumen. 39**, 1989.
- ARIAS, S. L. et al. Occurrence in Seeds and Potential Seed Transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in maize in the United States. **Phytopathology**, v. 110, n. 6, p. 1139-1146, 2020.
- ARITUA, V. et al. Characterization of the *Xanthomonas* sp. causing wilt of enset and banana and its proposed reclassification as a strain of *X. vasicola*. **Plant pathology**, v. 57, n. 1, p. 170-177, 2008.
- BARAK, J. D.; KOIKE, S. T.; GILBERTSON, R. L. Role of crop debris and weeds in the epidemiology of bacterial leaf spot of lettuce in California. **Plant disease**, v. 85, n. 2, p. 169-178, 2001.
- BARTLETT, R. W.; MCCAMONT, J. W.; GAGE, P. R. Structure and chemistry of oxide films thermally grown on molybdenum silicides. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 48, n. 11, p. 551-558, 1965
- BRAUN, E. J. Colonization of resistant and susceptible maize plants by *Erwinia stewartii* strains differing in exopolysaccharide production. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.36, n.5, p. 363-379, 1990.
- BRODERS, K.. Status of bacterial leaf streak of corn in the United States. **Proceedings of the Integrated Crop Management Conference**. Iowa State University. Digital Press. 2017.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U.. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 2, p. 107-133, 2010.

CARVALHO, R. V. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 666, 2016.

CECCON, G. Consórcio milho-braquiária. **Embrapa Agropecuária Oeste-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2013.

CINTAS, N. A. et al. Holdover inoculum of *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* from broccoli raab causes disease in subsequent plantings. **Plant disease**, v. 90, n. 8, p. 1077-1084, 2006.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectiva para a agropecuária**. 2019. Volume 7 – Safra 2019/20 p. 1-100, out. 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/perspectivas-para-a-agropecuaria>> Acesso em: 5 mar. 2020.

CONAB -Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectiva para a agropecuária**. 2021. Volume 9 – Safra 2021/22 3º Levantamento p. 1-100, dez. 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos> Acesso em: 4 jan. 2022.

CONTINI, Elisio. et al. **Milho: caracterização e desafios tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. (Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2), 2019. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195075/1/Milho-caracterizacao.pdf>> Acesso em: 20 jun. 2020.

COSTA, R. V. et al. **Manejo de doenças na cultura do milho**. In: KAPPES, C. (Ed.). **Boletim de pesquisa 2017/2018: soja, algodão, milho**. Rondonópolis: Fundação MT. p. 274-309, 2017.

COUTINHO, T. A. et al. Significant host jump of *Xanthomonas vasicola* from sugarcane to a *Eucalyptus grandis* clone in South Africa. **Plant Pathology**, v. 64, n. 3, p. 576-581, 2015.

COUTINHO, T. A. **Bacterial Streak Disease of Maize: A Study on Host Specificity and Cultivar Susceptibility**. Tese de Doutorado. University of Natal (Pietermaritzburg) 1988.

COUTINHO, T. A.; WALLIS, F. M. Bacterial streak disease of maize (*Zea mays* L.) in South Africa. **Journal of Phytopathology**, v. 133, n. 2, p. 112-120, 1991.

DA SILVA, Joao Cesar et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the phyllosphere and rhizosphere of crops. **Plant and Soil**, v. 462, n. 1, p. 389-403, 2021.

DAMICONE, J.; CEVALLOS, F.; OLSON, J. First report of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Oklahoma. **Plant Disease**, v. 102, n. 2, p. 437-437, 2018.

DAVET, Pierre. **Microbial ecology of soil and plant growth**. CRC Press, 2004.

DE BOER, SOLKE H. Survival of phytopathogenic bacteria in soil. **Phytopathogenic prokaryotes**, v. 1, p. 285-306, 1982.

DENNY, T.P. Autoregulator-dependent control of extracellular polysaccharide production in phytopathogenic bacteria. **European Journal of plant pathology**, v. 105, n. 5, p. 417-430, 1999.

DOOKUN, Asha; STEAD, David E.; AUTREY, L. Jean-Claude. Variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* from Mauritius and other countries based on fatty acid analysis. **Systematic and applied microbiology**, v. 23, n. 1, p. 148-155, 2000.

DOW, J. Maxwell et al. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 19, p. 10995-11000, 2003.

DUNGER, Germán et al. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. **Archives of microbiology**, v. 188, n. 2, p. 127-135, 2007.

DYER, R. A. Botanical surveys and control of plant diseases. **Farming in South Africa. Annu. Rep. Dep. Agric. S. Afr.**, v. 275, p. 119-121, 1949.

FANOU, A. A.; ZINSOU, A. V.; WYDRA, K. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in weed species and in cassava debris: Implication in the epidemiology of cassava bacterial blight. **International Journal of Advanced Research**, v. 5, n. 4, p. 2098-2112, 2017.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2019) **World Food And Agriculture** – Statistical pocketbook 2019. Rome. Disponível em: <http://www.fao.org/3/cab6463en.pdf>. Acesso em: 10 ago.2020.

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, n. 2, p. 149-154, 2002.

FAYETTE, Joubert et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* on lettuce in crop debris, irrigation water, and weeds in south Florida. **European Journal of Plant Pathology**, v. 151, n. 2, p. 341-353, 2018.

FIESP – Federação das Indústrias do Estado de São Paulo – Safra Mundial de Milho 2020/21 - 1º Levantamento do USDA (2021). [https://D:/Usuario/Downloads/file-20200514191213-boletimilhomaio2020%20\(2\).pdf](https://D:/Usuario/Downloads/file-20200514191213-boletimilhomaio2020%20(2).pdf). Acesso em: 03 dez 2021.

FIESP – Federação das Indústrias do Estado de São Paulo – Safra Mundial de Milho 2021/22 – 8º Levantamento do USDA (2022).

<https://docs.google.com/viewerng/viewer?url=https://sitefiespstorage.blob.core.windows.net/uploads/2021/12/file-20211210135959-boletimilhodezembro2021.pdf&time=1641307988&action=purge>. Acesso em: 04 jan.2022.

GALVÃO, Sarah R.; SABATO, Elizabeth O.; BEDENDO, Ivan P. Occurrence and distribution of single or mixed infection of phytoplasma and spiroplasma causing corn stunting in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, n. 2, p. 152-155, 2021.

GENT, D. H. et al. Inoculum sources and survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* in Colorado. **Plant disease**, v. 89, n. 5, p. 507-514, 2005.

GONÇALVES NETTO, Acácio et al. Population genomics of *Digitaria insularis* from soybean areas in Brazil. **Pest Management Science**, v. 77, n. 12, p. 5375-5381, 2021.

GONÇALVES, Ricardo M. et al. Alternative hosts of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, causal agent of bean bacterial wilt. **European Journal of Plant Pathology**, v. 148, n. 2, p. 357-365, 2017.

GONÇALVES, Ricardo M. et al. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in the soil under Brazilian conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, n. 1, p. 213-223, 2018.

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

GOTO, Masao; HYODO, Hiroshi. Role of extracellular polysaccharides of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the early stage of infection. **Japanese Journal of Phytopathology**, v. 51, n. 1, p. 22-31, 1985.

GRAHAM, J. H., GOTTWALD, T. R., CIVEROLO, E. L., McGUIRE, R. G. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. **Plant Disease**, v. 73, n. 5, p. 423-427, 1989.

HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*, 1995. **Food biotechnology microorganism**. VCH Publishers, Inc., New York, NY, p. 495-514.

HARRISON, James; STUDHOLME, David J. Draft genome sequence of *Xanthomonas axonopodis* pathovar *vasculorum* NCPPB 900. 2014.

HARTMAN, T. et al. Agronomic factors associated with bacterial leaf streak development caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in corn. **Phytopathology**, v. 110, n. 6, p. 1132-1138, 2020a.

HARTMAN, T. et al. Alternative hosts in the families Poaceae and Cyperaceae for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, causal agent of bacterial leaf streak of corn. **Phytopathology**, p. PHYTO-04-19-0132-R, 2020b.

HARTMAN, T.; JACKSON-ZIEMS, T. Update on bacterial leaf streak of corn in Nebraska. 2017. <https://cropwatch.unl.edu/2017/update-bacterial-leaf-streak-corn-nebraska>

HARTMAN, Terra Marie. Investigation of alternative hosts and agronomic factors affecting *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, causal agent of bacterial leaf streak of corn. MSc. thesis. University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE. 2018.

HATTORI, Tsutomu. **Microbial life in the soil: an introduction**. Marcel Dekker, New York, 1973.

HIRANO, Susan S.; UPPER, Christen D. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. **Annual review of phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 155-177, 1990.

HIRANO, Susan S.; UPPER, Christen D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 3, p. 624-653, 2000.

HYRE, R. A. et al. New records and unusual occurrence of plant diseases. **Plant Disease Reporter**, v. 27, p. 553-554, 1943.

INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO RURAL DO PARANÁ – IAPAR-EMATER (IDR-PARANÁ), 2022. <https://www.idrparana.pr.gov.br/Pagina/Dados-Meteorologicos-Historicos-e-Atuais>.

JACKSON-ZIEMS, Tamra et al. Bacterial Leaf Streak of Corn Confirmed in Nebraska, Other Corn Belt States August 26, 2016. University of Nebraska–Lincoln, Institute of Agriculture and Natural Resources. Cropwatch, 26 Aug. 2016. <https://cropwatch.unl.edu/2016/bacterialleaf-streak-corn-confirmed-nebraska>. Acesso em: 8 jan 2020.

JAMANN, T. M. et al. First report of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Illinois. **Plant disease**, v. 103, n. 5, p. 1018-1018, 2019.

JANSE, Jacob Dirk. **Phytopathology: principles and practice**. Cabi, 2005. p 121.

JARDINE, D.J.; CLAFIN, L.E. Compendium of Corn Diseases, 4th edition. Web sources verified 7/25/16. 2016.

JOHNSON JERRY et al. Agricultural experimete station. Colorado: Colorado State University Crops testing program; Technical Report TR16-11. 2016.

JOHNSON JERRY et al. Agricultural experimete station. Colorado: Colorado State University Crops testing program; Technical Report TR17-7. 2017.

JONES, L. R. et al. Bacterial-blight of barley. **Journal of agricultural research.**, v. 11, p. 625-643, 1917.

JONES, J. B. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. **Phytopathology**, v. 76, n. 4, p. 430-434, 1986.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P.. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American statistical association**, v. 53, n. 282, p. 457-481, 1958.

KARAMURA, G. et al. Comparative pathogenicity studies of the *Xanthomonas vasicola* species on maize, sugarcane and banana. **African Journal of Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 385-400, 2015.

KERBAUY, Gilberto Barbante. Fisiologia vegetal. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 431, 2012.

KINKEL, Linda L. Microbial population dynamics on leaves. **Annual review of phytopathology**, v. 35, n. 1, p. 327-347, 1997.

KINKEL, Linda L.; LINDOW, Steven E. Invasion and exclusion among coexisting *Pseudomonas syringae* strains on leaves. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3447-3454, 1993.

KINKEL, Linda L.; WILSON, M.; LINDOW, Steven E. Effect of sampling scale on the assessment of epiphytic bacterial populations. **Microbial ecology**, v. 29, n. 3, p. 283-297, 1995.

KINKEL, Linda L.; WILSON, M.; LINDOW, S. E. Utility of microcosm studies for predicting phylloplane bacterium population sizes in the field. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3413-3423, 1996.

KITAJIMA, E.W. & LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**, 2a. Ed. Piracicaba. NAP/MEPA ESALQ. p. 48, 1999.

KOIZUMI, M. Citrus canker: The world situation. **Citrus Canker: An International**

**Perspective.** LW Timmer, ed. **University of Florida, Lake Alfred**, p. 2-7, 1985.

KORUS, K. A. et al. First report of *Xanthomonas vasicola* causing bacterial leaf streak on corn in the United States. 2017.

LANG, J. M. et al. Detection and characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. causing bacterial leaf streak of corn in the United States. **Phytopathology**, v. 107, n. 11, p. 1312-1321, 2017.

LEBEN, Curt. How plant-pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, v. 65, n. 8, p. 633-637, 1981.

LEITE JR, Rui. Pereira. The relationship between pathogenic and nonpathogenic strains of *Pseudomonas syringae* and bacterial brown spot disease in beans. Thesis EUA, 1986.

LEITE JR, Rui. Pereira. et al. First report of the occurrence of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 1, p. 145-145, 2019a.

LEITE JR, Rui. Pereira. et al. Estria bacteriana do milho no Paraná. IAPAR, Londrina (Informe da Pesquisa, n.160). 2019b.

LEMISKA, Anderson et al. Disseminação da estria bacteriana do milho (*Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*) no Paraná. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Fitossanidade** v. 5, n. 1, 2019.

LENNON, Jay T. et al. Mapping the niche space of soil microorganisms using taxonomy and traits. **Ecology**, v. 93, n. 8, p. 1867-1879, 2012.

LEVEAU, Johan HJ. A brief from the leaf: latest research to inform our understanding of the phyllosphere microbiome. **Current Opinion in Microbiology**, v. 49, p. 41-49, 2019.

LEVENE, H. Robust Test for Equality of Variances, in I. O. et al., ed., 'Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotteling', Stanford University Press, California, United States, p. 278–292. 1960.

LONGHI, Talita Vigo. et al. Sensibility of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* to chemicals and efficiency of the chemical control of bacterial leaf streak on corn plants. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 44, 2022.

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. **Nova Odessa: Plantarum**, p. 640, 2008

MALVICK, K. Report on plant disease - Bacterial blights of forage grasses. University of Illinois: Department of crop sciences. RPD no. 315. 1991.

<http://ipm.illinois.edu/diseases/rpds/315.pdf>. Data do acesso: 20 April 2020.

MARSHALL, K. C. Sorptive interactions between soil particles and microorganisms. In: **Soil Biochemistry** (Edited by MCLAREN A. D.; SKUJINS J. J.), Dekker, New York. v. 2, p. 409-445, 1971.

MERCIER, Julien; LINDOW, S. E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 369-374, 2000.

MWEBAZE, J. M. et al. The survival of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* in soil and plant debris. **African Crop Science Journal**, v. 14, n. 2, 2006.

NASCIMENTO, Daniele M. et al. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* from soybean and common bean in soil. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-9, 2022.

NASCIMENTO, Daniele M. et al. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in weeds. **Plant Pathology**, v. 69, n. 7, p. 1357-1367, 2020.

NITSCHKE, P. R.; CARAMORI, P.H.; RICCE, W.S. ; PINTO, L.F.D. (2019) Atlas climático do Estado do Paraná. Available at:  
[http://www.iapar.br/arquivos/File/zip\\_pdf/AtlasClimaticoPR.pdf](http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/AtlasClimaticoPR.pdf) Accessed on: fev 10<sup>th</sup>, 2021.  
<https://www.idrparana.pr.gov.br/system/files/publico/agrometeorologia/atlas-climatico/atlas-climatico-do-parana-2019.pdf>

NORTH, D. S. et al. The gumming disease of the Sugar-Cane, its dissemination and control. **Agricultural Report**. N°. 10, The Colonial Sugar Refining Co., Ltd, Sydney, Australia, p. 1-149, 1935.

O'BRIEN, R. D.; LINDOW, S. E. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. **Phytopathology**, v. 79, n. 5, p. 619-627, 1989.

ORTIZ CASTRO, Mary Carmen. Understanding the disease ecology of the corn bacterial leaf streak pathogen *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. **2000-2019-CSU Theses and Dissertations**, Colorado State University, Fort Collins, CO, 2019.  
<https://mountainscholar.org/handle/10217/197391>. 201

ORTIZ-CASTRO, Mary et al. Current Understanding of the History, Global Spread, Ecology, Evolution, and Management of the Corn Bacterial Leaf Streak Pathogen, *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. **Phytopathology**, v. 110, n. 6, p. 1124-1131, 2020.

PELCZAR, M. J. Microbiologia. In: **Microbiologia**. 1980. p. 50.

PELTIER, George L. Influence of temperature and humidity on the growth of *Pseudomonas citri* and its host plants and on infection and development of the disease. **Journal of Agricultural Research**. v. 20, p. 447-506, 1920.

PEREZ-QUINTERO, Alvaro L. et al. Genomic acquisitions in emerging populations of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* infecting corn in the United States and Argentina. **Phytopathology**, v. 110, n. 6, p. 1161-1173, 2020.

PEROS, J. P. Variability in colony type and pathogenicity of the causal agent of sugarcane gumming *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* (Cobb) Dye. Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, Journal of Plant Diseases and Protection. v. 95, p. 541-545., 1988.  
<https://www.jstor.org/stable/43386650>

PLAZAS, M. C. et al. First report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing bacteria leaf streak of maize (*Zea mays*) in Argentina. **Plant Disease**, v. 102, n. 5, p. 1026-1026, 2018.

QHOBELA, M.; CLAFLIN, L. E. Eastern and southern African strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* are distinguishable by restriction fragment length polymorphism of DNA and polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins. **Plant pathology**, v. 41, n. 2, p. 113-121, 1992.

QHOBELA, M.; CLAFLIN, L. E.; NOWELL, D. C. Evidence that *Xanthomonas campestris* pv. *zeae* can be distinguished from other pathovars capable of infecting maize by restriction fragment length polymorphism of genomic DNA. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 12, n. 2, p. 183-186, 1990.

QIU, Yuting et al. Identification of quantitative trait loci associated with maize resistance to bacterial leaf streak. **Crop Science**, v. 60, n. 1, p. 226-237, 2020.

RADEMAKER, J. L. W. et al. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 95, n. 9, p. 1098-1111, 2005.

RICAUD, C.; AUTREY, L. J. C. Gummy disease. **Diseases of sugarcane: Major diseases**, p. 21-38. 1989.

ROBAINA, Renata Rodrigues et al. Development of a protocol and a diagrammatic scale for quantification of bacterial leaf streak disease on young plants of maize. **Plant Disease**, v. 104, n. 11, p. 2921-2927, 2020.

ROTT, P.; GIRARD, J-C. Sugarcane producing countries/locations and their diseases. In: Rott, P., Bailey, R.A., Comstock, J.C., Croft, B.J., Saumtally, A.S. (eds). *A Guide to Sugarcane Diseases*, La Librairie du Cirad, Montpellier, p.323–336, 2000.

RYAN, Robert P. et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344-355, 2011.

SAILE, Elke et al. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. **Phytopathology**, v. 87, n. 12, p. 1264-1271, 1997.

SAUMTALLY, S.A.; DOOKUM, A. GUMMING. IN: ROTT, P.; BAILEY, R. A.;

COMSTOCK, J. C.; CROFT, B. J.; SAUMTALLY, A. S. A guide to sugarcane diseases. Montpellier: Cirad Publications Service, p. 32-37, 2000.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, n. 1, p. 199-221, 1974.

SCHUSTER, M. L. et al. Survival of plant parasitic bacteria of plants grown in tropics with emphasis on beans (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 117-130, 1977.

SHAPIRO, Samuel Sanford; WILK, Martin B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SIKIROU, R.; WYDRA, K. Persistence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* in weeds and crop debris and identification of *Sphenostylis stenocarpa* as a potential new host. **European journal of plant pathology**, v. 110, n. 9, p. 939-947, 2004.

SILVA JÚNIOR, TAF et al. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soil and bean crop debris. **Journal of Plant Pathology**, p. 331-337, 2012.

SILVA JÚNIOR, TAF et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* associated with soil and cauliflower crop debris under Brazilian conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n. 2, p. 399-411, 2020.

SMITH, Damon et al. Bacterial leaf streak of corn confirmed for the first time in Wisconsin. **Wisconsin Crop Manager Newsletter**, 2018.

SOARES, A. C. et al. Milho crioulo: conservação e uso da biodiversidade. **Rio de Janeiro: AS-PTA, 185p**, p. 93-103, 1998.

STARR, Mortimer P.; STEPHENS, William L. Pigmentation and taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Journal of Bacteriology**, v. 87, n. 2, p. 293-302, 1964.

STOODLEY, Paul et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.

STUDHOLME, David J. et al. Genome-wide sequencing data reveals virulence factors implicated in banana *Xanthomonas* wilt. **FEMS microbiology letters**, v. 310, n. 2, p. 182-192, 2010.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. **International Review of Cytology**, v. 113, p. 187-231, 1988.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 954. 2013.

TESSA ALBRECHT et al. Agricultural experimente station. Colorado: Colorado State University Crops testing program; 2019. Technical Report TR19-5. 2019.

THEODORO, G. F; MARINGONI, A. C. Sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em manipueira sob condições ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 945-953, 2002.

THIEME, Frank et al. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 21, p. 7254-7266, 2005.

TIMILSINA, Sujan et al. *Xanthomonas* diversity, virulence and plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 415-427, 2020.

TORRES, João Pereira. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro: sobrevivência em restos de cultura e ocorrência em sementes produzidas no Estado do Paraná. 68. 2001. Tese (Doutorado – Agronomia) UNESP, Botucatu, 2001.

TORRES, João Pereira; SILVA JÚNIOR, Tadeu Antônio Fernandes da; MARINGONI, Antonio Carlos. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do Estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 136-139, 2009.

TOUSSAINT, Vicky.; BENOIT, Diane Lyse; CARISSE, Odile. Potential of weed species to serve as a reservoir for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. **Crop Protection**, v. 41, p. 64-70, 2012.

UDRY, Consolación V.; DUARTE, Wilton. **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. Brasília, DF :Paralelo 15, 2000.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. Washington DC - EUA. 40 p. 2020.

VAUTERIN, L. et al. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

VICENTE, Joana G.; HOLUB, Eric B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular plant pathology**, v. 14, n. 1, p. 2-18, 2013.

WARD, Julian M.J .et al. Gray leaf spot: a disease of global importance in maize production. **Plant disease**, v. 83, n. 10, p. 884-895, 1999.

WASUKIRA, Arthur et al. Genome sequencing of *Xanthomonas vasicola* pathovar *vasculorum* reveals variation in plasmids and genes encoding lipopolysaccharide synthesis, type-IV pilus and type-III secretion effectors. **Pathogens**, v. 3, n. 1, p. 211-237, 2014.

WELLER, David M.; SAETTLER, A. W. Rifampin-resistant *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* and *Xanthomonas phaseoli*: Tools for field study of bean blight bacteria. **Phytopathology**, v. 68, n. 5, p. 778-781, 1978.

YOUNG, J. M. et al. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 21, n. 1, p. 153-177, 1978.

YUN, Maximina H. et al. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. **Plant Physiology**, v. 141, n. 1, p. 178-187, 2006.

ZHAO, Youfu; DAMICONE, John P.; BENDER, Carol L. Detection, survival, and sources of inoculum for bacterial diseases of leafy crucifers in Oklahoma. **Plant disease**, v. 86, n. 8, p. 883-888, 2002.