



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNA RICINI MARTINS

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSMISSÃO DE
Xanthomonas vasicola pv. *vasculorum* POR SEMENTES E
RESÍDUOS DE MILHO**

BRUNA RICINI MARTINS

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSMISSÃO DE
Xanthomonas vasicola pv. *vasculorum* POR SEMENTES E
RESÍDUOS DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Marcelo Giovanetti Canteri

Coorientador. Dr. Rui Pereira Leite Junior

Londrina
2021

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

M386 Martins , Bruna Ricini Martins .
DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSMISSÃO DE *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* POR SEMENTES E RESÍDUOS DE MILHO / Bruna Ricini Martins Martins . - Londrina, 2021.
62 f. : il.

Orientador: Marcelo Giovanetti Canteri .
Coorientador: Rui Pereira Leite Junior .
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Estria bacteriana - Tese. 2. Transmissão - Tese. 3. Resíduos vegetais - Tese. 4. Sementes - Tese. I. Giovanetti Canteri , Marcelo . II. Pereira Leite Junior , Rui . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

BRUNA RICINI MARTINS

**DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSMISSÃO DE
Xanthomonas vasicola pv. *vasculorum* POR SEMENTES E
RESÍDUOS DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Marcelo Giovanetti Canteri
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Michele Regina Lopes da Silva
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná –
IDR - Paraná

Prof. Dra. Debora Cristina Santiago
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de março de 2021.

AGRADECIMENTOS

À Deus que iluminou e abençoou meu caminho, e meu grande defensor São Miguel Arcanjo.

Aos meus pais Lourdes e Moisés Ricini Martins e ao meu irmão Leonardo pelo amor incondicional, apoio, paciência e compreensão durante meus estudos.

Ao professor e orientador Marcelo G. Canteri pela oportunidade, confiança, paciência, incentivo e ensinamentos. Ao meu querido coorientador Rui Pereira Leite Jr pela amizade, ensinamentos, incentivos e pela grande contribuição na realização desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia do IDR - Paraná, Michele, Vanessa, Izabela, Talita, Renata, Vinicius, Israel e Cicero pela ajuda na realização dos trabalhos, pelas opiniões e conselhos.

À Caroline Bertoglio minha “*best roommate*” de todas as horas e momentos, encerramos nossa caminhada, no entanto agradeço cada momento de amizade, estudos, confiança, paciência, momentos de tristezas e alegrias. Uma grande amizade! Sempre estará no meu coração. Também aproveito a oportunidade para agradecer seus pais Mércio e Dirlei Bertoglio por todo apoio prestado nesses dois anos de mestrado.

Aos meus amigos Gabriel Shimizu, Izabela Daim, Bruno C. N. Marcos, Valdir Mariucci, Michele Corpolato e Maira Higuchi, pela amizade, companhia, conselhos em todos os momentos, sempre estarão no meu coração e na minha memória

A todos meus amigos que ganhei em Londrina, sempre me transmitiram força, apoio e confiança, deixo o meu sincero agradecimento.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) por todo o apoio institucional.
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Mestrado e oportunidade de estudo.

*“Tudo é do Pai, toda honra e toda glória
É dele a vitória alcançada em minha vida”*

Pe. Fabio de Melo

MARTINS, Bruna Ricini. **Determinação do potencial de transmissão de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* por sementes e resíduos de milho.** 2021. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A estria bacteriana causada pela bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv) é uma doença foliar do milho relatada no Brasil pela primeira vez em lavouras das regiões Oeste, Centro-Oeste e Norte do estado do Paraná em 2018. A disseminação de Xvv à longas distâncias pode estar relacionada à transmissão da bactéria por sementes. Por outro lado, resíduos vegetais infestados representam uma fonte potencial de inóculo primário, e se constituem em um veículo de sobrevivência da bactéria entre ciclos da cultura. Assim, os objetivos deste estudo foram determinar o potencial de transmissão de Xvv a partir de sementes infestadas com a bactéria e de resíduos vegetais para plantas de milho. Foram realizados dois procedimentos para a detecção da bactéria: a técnica de PCR utilizando os iniciadores específicos para Xvv, Xvv3F / Xvv3R, e o reisolamento em meio de cultura. Para isto, foram obtidos mutantes de Xvv resistentes à rifampicina. A presença de Xvv foi estudada em amostras de sementes de milho do híbrido IPR 164 embebidas em suspensão bacteriana na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹, após um, cinco, 10, 15, 30 e 60 dias da infestação artificial. A transmissão de Xvv a partir de resíduos vegetais provenientes de plantas de milho com estria bacteriana foi estudada em três condições: resíduos depositados na superfície do solo após a semeadura (RS), resíduos incorporados ao solo antes da semeadura (RSI) e resíduos associados às sementes (RAS): A transmissão de Xvv para as plantas de milho foram monitoradas e avaliadas com base na manifestação de sintomas de estria bacteriana durante quatro semanas. Plantas que apresentaram sintomas suspeitos foram examinadas em laboratório para a presença de Xvv pela técnica de PCR. A presença de Xvv nas sementes de milho foi detectada até 60 dias após a infestação artificial com a bactéria. A transmissão de Xvv via sementes para as plantas de milho ocorreu até 30 dias após a infestação artificial das sementes com a bactéria. Ocorreu transmissão de Xvv para plântulas de milho a partir dos resíduos vegetais provenientes de plantas com estria bacteriana, independente dos resíduos estarem na superfície ou incorporados ao solo, ou associados às sementes. Na transmissão de Xvv via sementes e resíduos vegetais foram observados sintomas de estria bacteriana somente em folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3 das plântulas de milho.

Palavras-chave: transmissão; estria bacteriana; resíduos vegetais; sementes; *Zea mays*.

MARTINS, Bruna Ricini. **Evaluation of the transmission potential of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* through seeds and plant debris of maize**. 2021. 62 p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Bacterial leaf streak caused by the bacterium *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv) is a maize disease reported in Brazil for the first time in the West, Midwest, and North regions of the state of Paraná in 2018. The dissemination of Xvv over long distances may be related to the transmission of bacterium through seeds. On the other hand, infested plant debris represent a potential source of primary inoculum, which constitutes a vehicle for the survival of the bacterium through crop seasons. Thus, the objectives of this study were to determine the potential for transmission of Xvv through infested seeds and from infected maize residues to plants. Two procedures were carried out for the detection of the bacterium: the PCR technique using the specific primers for Xvv, Xvv3F / Xvv3R, and re-isolation in culture medium. For this, rifampicin resistant Xvv mutants were obtained. The presence of Xvv was studied in samples of maize seeds of the hybrid IPR 164 soaked in a bacterial suspension at at the concentration of 10^8 CFU mL⁻¹. Bacterium detection was carried out at one, five, 10, 15, 30 and 60 days after the artificial infestation. The transmission of Xvv via plant debris was studied under three conditions: plant residues placed on the soil surface after sowing (RS), residues incorporated into the soil before sowing (RSI) and residues associated with the seeds (RAS): Xvv transmission to maize plants was monitored and evaluated based on the presence of bacterial leaf streak symptoms for four weeks after sowing. Plants that showed disease symptoms were sampled and examined in laboratory for the presence of Xvv using the PCR technique. The presence of Xvv in the maize seeds was detected up to 60 days after the artificial infestation with the bacterium. The transmission of Xvv via seeds to the maize seedlings occurred up to 30 days after the artificial infestation of the seeds with the bacterium. Xvv was transmitted to the maize seedlings from the plant residues, regardless of whether these plant residues were on the surface or incorporated in the soil, or associated with the seeds. In the transmission of Xvv via seeds and plant debris, symptoms of bacterial leaf streak were observed basically in leaves of the vegetative stages V1, V2 and V3 of the maize seedlings

Keywords: transmission; bacterial leaf streak; plant debris; seeds; *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Regiões produtoras de milho no Paraná com presença da estria bacteriana causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* na safra de 2018/2019. Fonte: IAPAR, 2018. 18
- Figura 2** - Sintomas de estria bacteriana do milho em tecido foliar. A, Lesões iniciais no formato de pequenas pontuações; B, lesões alongadas e estreitas, restritas às regiões internervais; C, exsudação da bactéria no tecido foliar. Fontes: IAPAR, 2018; Universidade de Nebraska, 2016. 20
- Figura 3** - Produto da reação de PCR do DNA de mutantes do isolado RL1 de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* resistentes à rifampicina. A, RL2^{rif+}; B, RL3^{rif+}; C, RL4^{rif+}; D, RL5^{rif+}; E, controle negativo; F, controle positivo. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus. A flecha indica fragmento de 200 pb produzido pelo par de iniciadores Xvv3F / Xvv3R 40
- Figura 4** - Sintomas de estria bacteriana em folhas de milho do híbrido IPR 164 inoculadas com mutantes do isolado RL1 de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* resistente à rifampicina. A, RL2^{rif+}; B, RL3^{rif+}; C, RL4^{rif+}; D, RL5^{rif+} 41
- Figura 5** – Produto da reação da PCR para sementes de milho do híbrido IPR 164 artificialmente infestadas com o mutante RL4^{rif+} de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Dias após a infestação artificial: A, um; B, cinco; C, 10; D, 15; E, 30; F, 60; -, controle negativo; +, controle positivo. Marcador de peso molecular de 1 Kb Plus. A flecha indica fragmento de 200 pb produzido pelo par de iniciadores Xvv3F / Xvv3R..... 42
- Figura 6** – Produto da reação da PCR de colônias recuperadas de sementes de milho do híbrido IPR 164 artificialmente infestadas com o mutante RL4^{rif+} de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Dias após a infestação artificial: (A), um; (B), cinco; (C), 10; (D), 15; (E), 30; (F), 60; (G) Controle negativo; (H) Controle positivo. Marcador de peso molecular de 1 Kb Plus. A flecha indica fragmento de 200 pb produzido pelo par de iniciadores Xvv3F / Xvv3R 43
- Figura 7**- Sintomas típicos de estria bacteriana e atípicos em folhas de plantas de milho do híbrido IPR 164 provenientes de sementes infestadas artificialmente com suspensão na concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹ do mutante RL4^{rif+} de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* quatro semanas após a semeadura. A e C, sintomas típicos de estria bacteriana; B e D, sintomas atípicos. 45
- Figura 8**- Curva da regressão da incidência (%) de estria bacteriana em plantas de milho do híbrido IPR 164 em relação ao tempo da infestação artificial de sementes com o mutante

RL4 ^{rif+} de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> . A, ensaio I; B, ensaio II.	47
Figura 9- Curva da regressão entre o tempo de infestação artificial das sementes e a ocorrência da doença em folhas de diferentes estádios vegetativos das plantas de milho híbrido IPR 164. A, ensaio I; B, ensaio II	49
Figura 10 - Plantas de milho do híbrido IPR 164 com sintomas típicos e atípicos de estria bacteriana em estudo da transmissão de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> a partir de resíduos vegetais após 14 dias da semeadura. A, B e C, sintomas típicos de estria bacteriana; D, E e F, sintomas atípicos.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Iniciadores da PCR específicos para <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> utilizados no estudo.	36
Tabela 2 - Tratamentos avaliados no estudo da transmissão de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> a partir de resíduos vegetais contaminados com a bactéria da estria bacteriana.....	38
Tabela 3 - Presença de células viáveis de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> em sementes de milho do híbrido IPR 164 durante diferentes períodos após a infestação artificial com o mutante RL4 ^{rif+}	43
Tabela 4 - Incidência de plântulas de milho do híbrido IPR 164 com sintomas suspeitos de estria bacteriana e detecção da bactéria por PCR em relação ao tempo da infestação artificial das sementes com o mutante RL4 ^{rif+} de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>	46
Tabela 5 - Incidência de estria bacteriana em folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3 de plântulas de milho do híbrido IPR 164 em relação ao período de infestação artificial das sementes com o mutante RL4 ^{rif+} de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i>	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	CULTURA DO MILHO	16
2.2	ESTRIA BACTERIANA NA CULTURA DO MILHO.....	17
2.2.1	Etiologia	18
2.2.2	Sintomatologia	19
2.2.3	Epidemiologia	20
2.2.4	Sobrevivência e Transmissão da Bactéria	21
2.3	MÉTODOS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS EM SEMENTES.....	23
2.3.1	Cultivo em Meios de Cultura Semi-Seletivo e Seletivo.....	24
2.3.2	Inoculação em Plantas	25
2.3.3	Testes Moleculares	26
3	INTRODUÇÃO	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Obtenção de mutante de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> resistente à rifampicina.....	33
4.2	Fonte das sementes de milho	33
4.3	Infestação artificial de sementes de milho com Xvv	34
4.4	Detecção de Xvv em sementes de milho	34
4.4.1	Detecção de Xvv pela técnica da PCR	34
4.4.2	Detecção de Xvv por reisolamento em meio de cultura.....	36
4.5	Transmissão de Xvv para plantas	36
4.5.1	Transmissão via sementes.....	36
4.5.2	Transmissão via resíduos vegetais.....	37
4.5.3	Extração de DNA de folhas de milho com sintomas suspeitos de estria bacteriana.....	38
4.6	Análises estatísticas	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Obtenção de mutantes de Xvv resistente à rifampicina.....	40
5.2	Infestação artificial de sementes de milho com Xvv	41
5.3	Transmissão de Xvv via sementes.....	44

5.4	Transmissão de Xvv via resíduos vegetais	50
6	CONCLUSÕES	54
7	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais fontes energéticas do mundo, sendo utilizado tanto em alimentação humana como em animal. Concomitantemente à sua importância em relação à produção, a cultura também se notabiliza nos diversos segmentos da cadeia produtiva (CONTINI et al., 2019). Cultivado em todas as regiões do Brasil, a cultura apresentou transformações profundas nas últimas décadas, destacando-se o aumento da sua importância em uma agricultura altamente tecnificada, com deslocamentos geográficos e temporais da produção. Passou a ser um produto de exportação e se constituindo em uma commodity com ampla importância no agronegócio brasileiro (CONTINI et al., 2019; GUTH, 2018).

O Brasil é o terceiro produtor e segundo maior exportador mundial de milho, tendo atingido produção de aproximadamente 101 milhões de toneladas na safra de 2019/2020 (FIESP, 2020). O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em seu primeiro levantamento para a safra mundial de milho de 2020/2021 prevê para o Brasil uma produção de 106,0 milhões de toneladas, a maior da série histórica, com aumento de 2,6% em relação à anterior (FIESP, 2020). A produção global do cereal deve ser recorde, com 1.186,9 milhões de toneladas, crescimento de 6,5% em relação à safra de 2019/2020 (FIESP, 2020). Isto é reflexo das maiores colheitas projetadas para os EUA e Brasil (FIESP, 2020).

Na região Sul do Brasil, a cultura deverá experimentar incremento na área plantada, atingindo 1.517,8 mil hectares, representando aumento de 2,6% em relação à safra passada (CONAB, 2020). O estado do Paraná é o segundo maior produtor de milho do país (COELHO, 2020). De acordo com o Departamento de Economia Rural (DERAL), vinculado à Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (SEAB), a safra de milho de verão de 2020/2021 deverá atingir 360,4 mil hectares, 1% acima dos 355,9 mil hectares cultivados na safra de verão de 2019/2020 (DERAL, 2020). Para a safra de 2020/2021, a produção brasileira total deverá ser de 104,9 milhões de toneladas, aumento de 2,3% em relação à safra anterior (CONAB, 2020)

Apesar da expressividade econômica, a ocorrência de pragas e doenças na cultura do milho tem levado à perdas quantitativas e qualitativas na produção do cereal. A ocorrência de uma nova doença no milho nas Américas, a estria bacteriana causada pela bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv), foi observada pela primeira vez nos Estados Unidos em 2014. A incidência da doença foi maior em lavouras de milho em regiões do oeste do estado de Nebraska, oeste do estado de Kansas e nordeste do estado do Colorado

onde a produção contínua de milho é uma prática comum (USDA-NASS,2018). Dois anos após o primeiro relato da doença, a estria bacteriana foi constatada em 10 estados americanos, entre eles os três principais produtores de milho, Illinois, Iowa e Nebraska. Os níveis de incidência e severidade mais proeminentes foram observados em Nebraska, Colorado e Kansas (JACKSON ZIENS et al., 2016).

A estria bacteriana também foi relatada na América do Sul, ocorrendo em várias províncias da Argentina (BRODERS, 2017; PLAZAS et al., 2018). No Brasil, a doença foi observada inicialmente na região oeste do estado do Paraná no ano de 2016, com rápido aumento na safra de 2018 (LEITE et al., 2018).

Os sintomas iniciais da estria bacteriana se apresentam como pequenas pontuações translúcidas nas folhas. Com a evolução da doença, as lesões se desenvolvem de forma alongada e estreita com bordas onduladas, circundadas por halo amarelo, acompanhando as regiões internervais da folha (LEITE et al., 2018). Entretanto, informações em relação à sobrevivência, disseminação e outros aspectos relativos ao patógeno e à doença são limitados e seguem aguardando estudos mais aprofundados.

Esta doença traz novos desafios para a pesquisa e ao setor produtivo, pois ela já avançou para lavouras de várias regiões do Paraná, causando danos em mais de 30 híbridos comerciais de milho que se mostraram suscetíveis (LEITE et al., 2018). De acordo com Jardine e Caflin (2016) ainda não se tem conhecimento se a doença pode influenciar na qualidade do grão, mas sabe-se que a severidade da estria bacteriana em híbridos de milho suscetíveis pode alcançar níveis acima de 40%.

Com relação à transmissão da bactéria Xvv pelas sementes de milho e a sua disseminação à longas distâncias, ainda não se têm estudos detalhados. Entretanto, a disseminação de agentes fitopatogênicos via sementes tem importância significativa para diversas doenças (MAPA, 2009). Assim, este estudo teve como objetivos determinar o potencial de transmissão de Xvv por sementes de milho e por resíduos vegetais provenientes de plantas infectadas com a bactéria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família Poaceae e é uma espécie de ciclo anual, monóica e do grupo C4. A planta possui ampla adaptação à diferentes condições de ambiente, podendo ser cultivada em praticamente todas as regiões agrícolas do mundo, porém não tolera geadas (MEGALHÃES et al., 2002). Para a expressão do seu máximo potencial produtivo, o milho necessita de altas temperaturas, em torno de 24 a 30°C, radiação solar elevada e adequada disponibilidade hídrica no solo (BORÉM et al., 2004). A planta apresenta alto potencial produtivo e é bastante responsiva à tecnologia, sendo desta maneira uma das espécies vegetais mais comumente usadas em pesquisas genéticas em função da fácil manipulação das estruturas reprodutivas (TROJAN, 2016).

A cultura do milho apresenta ampla extensão geográfica e importância socioeconômica no mundo. É um dos principais cereais utilizados como fonte energética na alimentação animal e humana, e em vários segmentos industriais (DUARTE et al., 2005; SOLOGUREN, 2015). No Brasil, o milho tem adquirido importante papel socioeconômico, encontrando-se amplamente disseminado no território nacional. É a segunda maior cultura do agronegócio no país, e, com deslocamento geográfico e temporal da produção. O cereal passou a ser um importante produto de exportação sendo considerada uma commodity, com ampla importância no agronegócio (CONTINI et al., 2019; GUTH, 2018).

O Brasil ocupa a terceira colocação no ranking de maior produtor mundial de milho, atrás apenas dos Estados Unidos e da China, e a segunda posição como maior exportador mundial (FIESP, 2020). De acordo com dados da CONAB (2020), houve crescimento de 1,1% na área semeada com milho na última safra, totalizando 4,15 milhões de hectares, com produção próxima de 101 milhões de toneladas, superando a safra anterior de 2018/2019 (FIESP, 2020). De acordo com o USDA (2020), a produção brasileira de milho deverá ser de 106,0 milhões de toneladas, 5% maior que em 2019/2020.

Como cultura suporte para a agricultura, a produtividade do milho vem crescendo de forma significativa em decorrência da evolução do sistema de produção. No entanto, a exposição da cultura do milho aos mais variados estresses bióticos e abióticos dificulta a exploração do máximo potencial genético para a produtividade de grãos (BRITO, et al., 2013).

Embora o milho seja considerado tolerante à ação de agentes de estresses, tem se manifestado vulnerável à incidência de patógenos, comprometendo dessa maneira a produtividade da cultura (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000; PEREIRA et al., 2005). O agravamento da incidência e severidade das doenças acompanha toda essa evolução da cultura (CRUZ, et al., 2011). Esse aumento na ocorrência de doenças tem sido atribuído principalmente à realização de plantios na palhada e sem rotação de culturas. Em regiões de clima quente onde o plantio de milho ocorre em vários meses do ano, há sobreposição do ciclo de doenças (BRITO et al., 2013; SOUZA; PEREIRA; SOUZA, 2015).

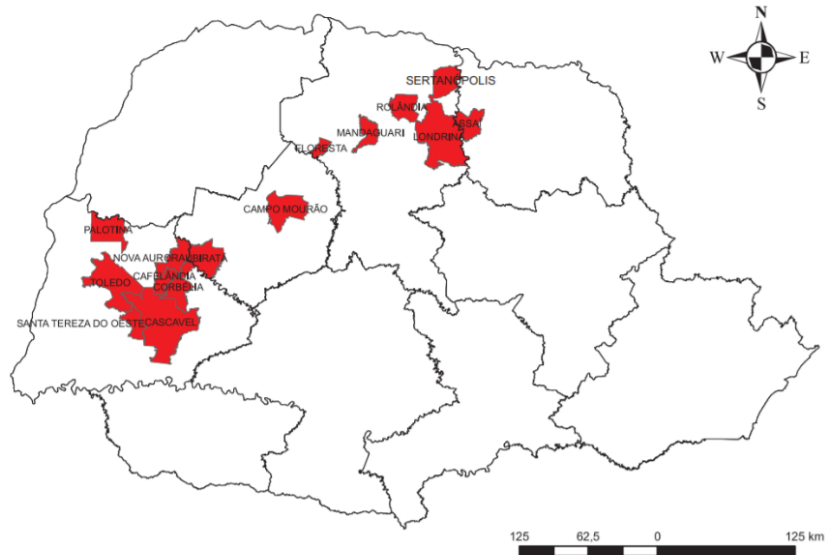
A evolução das doenças na cultura do milho tem impactado a produtividade e a qualidade dos grãos, mesmo havendo no mercado híbridos de milho com diferentes graus de resistência às diferentes doenças. As doenças que afetam a cultura são problemas que ocorrem em todas as regiões produtoras do país, tornando se uma preocupação aos produtores (MOTA, 2019). A cultura do milho quando afetada por doenças foliares de forma severa pode levar à danos irreparáveis na produtividade, tanto pela redução do número, quanto do tamanho e densidade total dos grãos (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

2.2 ESTRIA BACTERIANA NA CULTURA DO MILHO

A estria bacteriana do milho, causada pela bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) (Xvv), é uma doença foliar de ocorrência recente em algumas regiões produtoras de milho ao redor do mundo. Esta doença foi constatada pela primeira vez ocorrendo em lavouras de milho na África do Sul em 1949 (DYER, 1949) (LEITE et al., 2018).

A estria bacteriana foi observada recentemente em países das Américas do Norte e do Sul, sendo constatada em regiões produtoras de milho do meio oeste dos Estados Unidos, ocorrendo em níveis epidêmicos em pelo menos três estados, Nebraska, Kansas e Colorado (JACKSON ZIENS et al., 2016). A Xvv também tem sido relatada em pelo menos 10 províncias na Argentina (BRODERS, 2017; PLAZAS et al., 2018), e no Brasil foi observada no estado do Paraná em lavouras de diversos municípios das regiões Oeste, Centro Oeste e Norte do Estado (Figura 1) (LEITE et al., 2018).

Figura 1 – Regiões produtoras de milho no Paraná com presença da estria bacteriana causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* na safra de 2018/2019. Fonte: LEITE et al., 2018.



2.2.1 ETIOLOGIA

O gênero *Xanthomonas* compreende um grupo de bactérias fitopatogênicas de grande relevância para uma ampla gama de plantas cultivadas, com expressões econômicas significativas para a agricultura. As bactérias desse gênero apresentam células do tipo bastonete, móveis por um único flagelo polar, são aeróbicas obrigatórias e formam em meio de cultura colônias viscosas e brilhantes, de bordos lisos e com pigmentação amarela intensa ou brancas, e de aspecto mucoide (BEDENDO; BELASQUE, 2018).

A bactéria responsável pela estria bacteriana do milho foi inicialmente descrita como *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* em 1978 (YOUNG et al., 1988). No entanto, isolados obtidos de cana-de-açúcar também foram patogênicos para sorgo e para milho, porém, isolados da bactéria obtidos de milho na África do Sul foram patogênicos somente para milho (QHOBELA; CLAFLIN; NOWELL, 1990). Esses isolados africanos apresentaram diferenças em relação aos isolados de *X. campestris* pv. *holcicola*, agente causal da estria bacteriana do sorgo, e de isolados de *X. campestris* pv. *vasculorum*, agente causal do "gumming" da cana-de-açúcar, com base no polimorfismo de fragmentos de DNA (RFLP) (QHOBELA; CLAFLIN; NOWELL, 1990; COUTINHO, 1988). Um subgrupo desses

isolados foi posteriormente reclassificado como *X. campestris* pv. *zeae* (STULBERG et al., 2020), diferenciando-se dos isolados de *X. campestris* pv. *vasculorum* de cana-de-açúcar (QHOBELA; CLAFLIN; NOWELL, 1990).

Com base em estudos recentes, as bactérias que causam a doença “gumming” em cana-de-açúcar e a estria bacteriana do milho foram reclassificadas como *X. vasicola* pv. *vasculorum* (KARAMURA et al., 2015). Conforme estudos de Lang et al., (2017), as análises filogenéticas e de patogenicidade deram mais embasamento à atual classificação de Xvv como o agente causal da estria bacteriana do milho.

No Brasil, os estudos realizados incluíram diversas amostras foliares de milho coletadas em lavouras das regiões Norte, Oeste e Centro-Oeste do estado do Paraná. Os isolados obtidos destas amostras produziram colônias com características mucóides e de coloração amarela em meio ágar nutriente, típicas de bactérias do gênero *Xanthomonas* (LEITE et al., 2018). A patogenicidade dos isolados bacterianos para o milho foi confirmada pela inoculação em plântulas de milho suscetível à doença, onde foi possível observar o desenvolvimento de lesões semelhantes às das amostras provenientes do campo (LEITE et al., 2018). A bactéria obtida apresentou células no formato de bastonete, reação gram-negativa, não fluorescente e não fermentativa (LEITE et al., 2018). A análise de seqüências gênicas da região 16S do rDNA amplificadas por PCR, utilizando os iniciadores universais fD1 e rD1, revelou similaridade genética de 99% com Xvv estirpe SAM 119 (NCCPB No. 4614), patótipo do patovar, isolada de milho na África do Sul (LEITE et al., 2018).

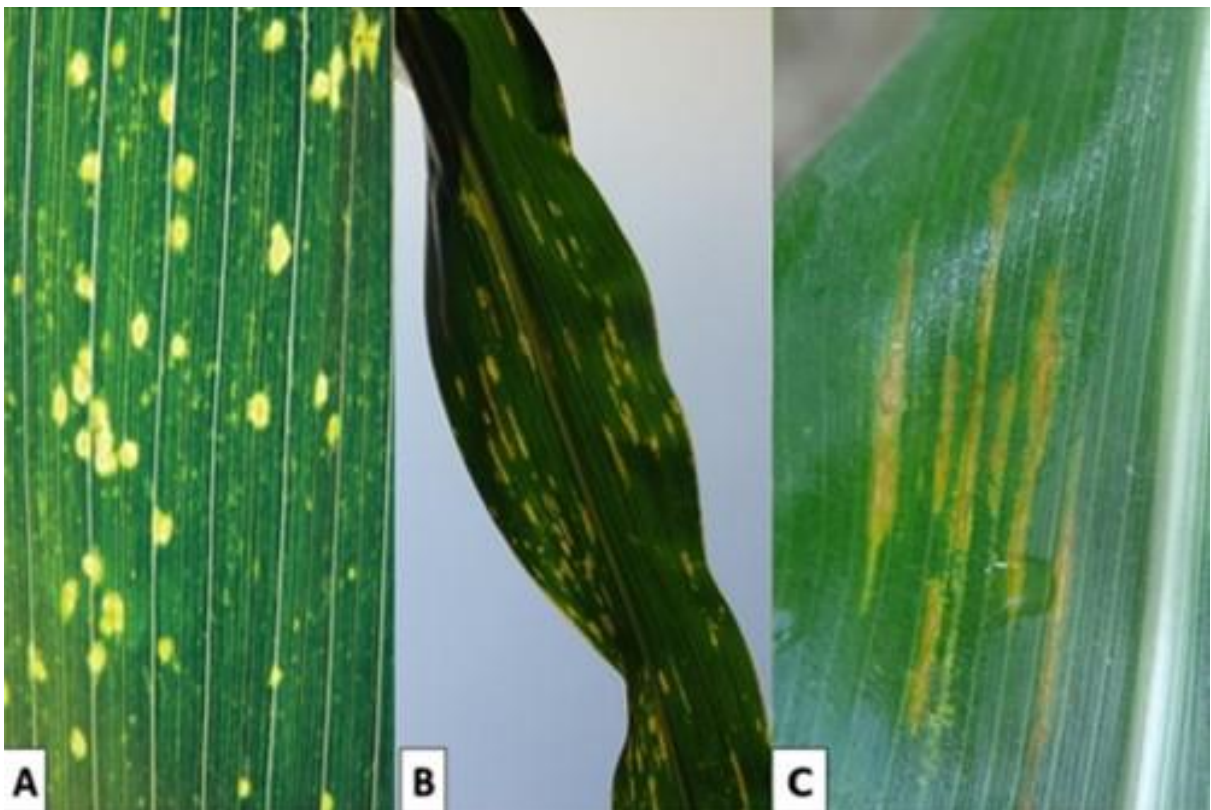
2.2.2 SINTOMATOLOGIA

Os sintomas foliares iniciais da estria bacteriana são pequenas pontuações translúcidas (2-3 mm) (Figura 2 A). Posteriormente, essas pontuações progridem para lesões alongadas e estreitas com bordas onduladas, circundadas por halo de coloração amarelada (Figura 2B). As lesões se mantêm restritas às regiões internervais da folha (Figura 2B). Outra característica é a translucência das lesões, quando observadas contra a luz pela parte abaxial da folha. Ainda em casos mais severos, as lesões podem tomar toda a área foliar e coalescer, formando uma grande área necrótica (JACKSON-ZIEMS et al., 2016; LEITE et al., 2018; PLAZAS et al., 2018;).

De acordo com Leite et al. (2018), os sintomas da doença podem ser observados em folhas de plantas ainda jovens e nas brácteas das espigas. Em condições

favoráveis, a bactéria pode exsudar formando pequenos cristais sobre as lesões (Figura 2C). Esses cristais possibilitam a disseminação da bactéria para outras folhas da planta e para plantas vizinhas.

Figura 2 – Sintomas de estria bacteriana do milho no tecido foliar. A, lesões iniciais no formato de pequenas pontuações; B, lesões alongadas e estreitas, restritas às regiões internervais; C, exsudação da bactéria no tecido foliar. Fontes: LEITE et al., 2018; Universidade de Nebraska, 2016.



2.2.3 EPIDEMIOLOGIA

A bactéria *Xv* pode sobreviver em restos culturais de milho de safras anteriores, infectando a planta através de aberturas naturais e ferimentos. A disseminação da bactéria pode ocorrer por água de irrigação ou de chuva associada a ventos (BRODERS 2017; LEITE et al., 2018;). Temperaturas elevadas favorecem a ocorrência severa da doença (BRODERS 2017; LEITE et al., 2018;). Exsudados bacterianos na superfície de folhas infectadas contribuem para o progresso epidêmico da doença durante o ciclo da cultura

(BRODERS, 2017). A bactéria penetra no hospedeiro através de aberturas naturais, como os estômatos, ou ferimentos. Pela sintomatologia da doença, é possível observar que a colonização do tecido foliar é normalmente limitada pelas nervuras principais da folha (LEITE et al., 2018).

2.2.4 SOBREVIVÊNCIA E TRANSMISSÃO DA BACTÉRIA

As bactérias apresentam limitação na produção de estruturas de sobrevivência, como por exemplo, esporos. Entretanto, apresentam outras formas de proteção e mecanismos de sobrevivência, quer seja em associação ou não com a planta hospedeira (BEDENDO; BELASQUE, 2018).

A cápsula bacteriana é uma estrutura externa presente na maioria das bactérias fitopatogênicas como *Xanthomonas* spp., *Clavibacter* spp., *Pseudomonas* spp., entre outras, representada por uma camada viscosa formada principalmente por polissacarídeos. Essa camada recobre toda a superfície externa da célula bacteriana, protegendo contra condições adversas do ambiente, como dessecação, antibiose, fagocitose, radiações, antibióticos entre outros (ROMEIRO, 1988; BEDENDO; BELASQUE, 2018).

As bactérias do gênero *Xanthomonas* apresentam uma diversidade complexa de interações no seu ciclo de vida, podendo sobreviver em plantas hospedeiras e não hospedeiras, no solo, em sementes, em restos culturais e em interação com insetos. As bactérias dentro de seu ciclo vital têm seu sítio de sobrevivência em maior ou menor proporção dependendo das condições do ambiente e de sua interação com o hospedeiro (MARCUIZZO, 2009).

Leben (1981), estudando a sobrevivência de bactérias, observou que bactérias associadas a restos culturais apresentam maior eficiência de sobrevivência do que livremente no solo. As fitobactérias do filoplano, como a *Xvv*, geralmente têm mais dificuldades de sobrevivência no solo, não suportando por muito tempo o antagonismo que sobre elas exerce todo o complexo biológico desse ambiente (HIRANO; UPPER, 1983; ROMEIRO, 1988). De acordo com Leben (1981), as bactérias associadas a restos culturais, em uma “posição protegida”, apresentam maiores condições de sobrevivência.

O gênero *Xanthomonas* é constituído por mais de uma centena de agentes fitopatogênicos comumente relacionados ao filoplano, causando manchas isoladas, que podem coalescer provocando queima e queda de folhas, lesões em frutos e ramos e mais raramente

invasões vasculares. Essas bactérias normalmente sobrevivem de uma safra para outra em restos culturais (KIRALY et al., 1970; BEDENDO; BELASQUE, 2018).

Gent et al. (2005) estudando a sobrevivência no solo de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *allii* observaram que nove meses após a colheita, a bactéria foi encontrada no perfil do solo em até 25 cm de profundidade. *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xpp) foi encontrada a 15 cm de profundidade e na palhada durante o inverno em áreas onde não se efetuou rotação de culturas (CHAVEZ; GRANADA, 1988). A sobreviver em restos culturais de videira também foi constatada para *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (NASCIMENTO; MARIANO, 2004). Estudos de Graham et al. (1987) revelaram a presença de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na superfície do solo após 120 dias da erradicação de plantas cítricas. No caso de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* (Xcg), Groth e Braun (1989) encontraram a bactéria sobrevivendo em resíduos da cultura na superfície do solo por até 85 dias, enquanto nos resíduos incorporados ao solo, a bactéria não sobreviveu não mais do que 33 dias.

Feet (1979) trabalhando com folhas de soja infectadas por Xcg na região de Londrina, PR, mantidas na superfície do solo e enterradas a 15 ou 30 cm de profundidade, conseguiu recuperar a bactéria aos 91 dias após o material ter sido enterrado. Por outro lado, no material deixado na superfície do solo, a bactéria foi recuperada durante 210 dias.

Dados preliminares de Ortiz-Castro et al. (2019) sugerem que Xvv sobrevive em resíduos de milho infectados da safra anterior. Com base em análise por qPCR, a Xvv presente em resíduos de milho na superfície e enterrado no solo durante um período de seis meses servem como inoculo primário para o desenvolvimento da doença, uma vez que o milho é frequentemente cultivado em sucessão. Conforme as sementes de milho são depositadas sob o resíduo, as plântulas emergem e entram em contato com a bactéria presente nesse resíduo e eventualmente são infectadas e desenvolvem a doença (ORTIZ-CASTRO, 2019). Assim, o resíduo infestado representa uma importante fonte potencial de inóculo para infecções iniciais dentro de uma lavoura. Por outro lado, a disseminação da bactéria por longas distâncias pode estar relacionada à transmissão por sementes, que se constitui em um veículo de sobrevivência e introdução de fitobactérias em novas áreas (ORTIZ-CASTRO, 2019).

Sementes de soja servem como fonte de sobrevivência para Xcg por até 30 meses (GRAHAM et al, 1987). Bianchini et al. (2005) encontraram Xpp sobrevivendo em sementes de feijoeiro após 15 anos. Estudos realizados no Canadá por Wallen e Sutton (1965) demonstraram que 0,5% de sementes infectadas por Xpp já são o suficientes para desencadear uma epidemia e causar perdas no campo.

Com base no comportamento de algumas espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas* é possível avaliar a importância da sobrevivência e transmissão desses patógenos em sementes. No caso de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas, doença de grande importância em brássicas, a bactéria tem sua principal forma de sobrevivência em sementes, sendo esta a fonte de inoculo primário desse patógeno (TEBALDI; PANIZZI; SADER, 2007). O agente causal do crestamento bacteriano comum do feijão (Xpp) pode sobreviver em sementes por até 15 anos em estado hipobiótico, infectando ou apenas infestando superficialmente as sementes (SCHUSTER; COYNE, 1974). A mancha angular, causada por *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm), uma das doenças mais preocupantes na cultura do algodão, também consegue sobreviver por até quatro anos em sementes (BRINKERHOFF; FINK, 1963). A bactéria ocasiona o apodrecimento das sementes antes mesmo da germinação, ou então pode afetar as plântulas recém emergidas (TUMELERO, 2012).

Entretanto, o potencial de transmissão de Xvv por sementes de milho ainda está em estudo. Arias et al. (2020) avaliaram a ocorrência de Xvv em sementes providas de campos infestados e posteriormente a sua transmissão, e descobriram que 22 dos 41 lotes de sementes coletados apresentaram-se positivos para Xvv (ORTIZ-CASTRO, 2019). Assim, é extremamente necessário avaliar o potencial de transmissão de Xvv por sementes e determinar se esta pode ser uma via de disseminação e transporte importante do agente causal da estria bacteriana do milho (ARIAS, 2018).

2.3 MÉTODOS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS EM SEMENTES

Com o avanço da biotecnologia, várias técnicas moleculares têm sido utilizadas em procedimentos com o objetivo de detectar, identificar e caracterizar patógenos de plantas em sementes (BARROCAS et al., 2009). As sementes contaminadas com fitopatógenos têm sido responsáveis por danos significativos, causando grandes prejuízos à todo sistema produtivo. Desta maneira, o diagnóstico preciso de patógenos em sementes é uma importante estratégia para o manejo de doenças, uma vez que previne sua entrada como inoculo inicial em áreas produtivas (GOULART, 2018). Assim, os testes de sanidade de sementes são fundamentais para o controle de doenças bacterianas em plantas, apresentando como objetivo fundamental a detecção e a identificação do patógeno de forma rápida e segura (MENTEN, 2005 CITADO POR TUMULERO, 2012).

A detecção de patógenos em sementes é essencial para garantir um sistema de produção altamente produtivo e assegurar a sustentabilidade das atividades agrícolas (BARROCAS et al., 2009). Entre as várias técnicas utilizadas para a detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes estão o cultivo em meios de cultura semi- seletivos e seletivos, a inoculação em plantas hospedeiras, e testes moleculares, entre outros (TEBALDI; PANIZZI; SADER, 2007; TUMULEIRO, 2012).

2.3.1 CULTIVO EM MEIOS DE CULTURA SEMI-SELETIVOS E SELETIVOS

Os meios de cultura possuem em suas composições nutrientes necessários para crescimento, desenvolvimento e multiplicação *in vitro* de microrganismos, sendo fundamentais para análises e identificação desses (MEHTA et al., 2005). O meio seletivo permite o crescimento de certos tipos de microrganismos e inibe o crescimento de outros. Ele contém inibidores, geralmente antibióticos, que tornam inviável o crescimento de contaminantes, sem inibir o microrganismo alvo (DEZORDI, 2006). Os meios semi-seletivos são importantes para o isolamento de bactérias fitopatogênicas de tecidos de plantas e solo e alguns podem ser tão sensíveis quanto outras técnicas, como a reação da polimerase em cadeia (PCR), ou mesmo mais sensíveis que técnicas imunológicas (ALVAREZ; LOU, 1985; WANG et al., 1999). Além disso, são fáceis de usar e menos dispendiosos (TOUSSAINT et al., 2001).

Os principais critérios para avaliação de um meio de cultura seletivo são a seletividade e a eficiência na detecção de patógenos, com alta supressividade para micro organismos saprófitos e baixa repressividade para bactérias fitopatogênicas que se deseja detectar ou quantificar (LOPES et al., 2008). Sua seletividade usualmente é conseguida utilizando fontes específicas de carbono e/ou antibióticos, entre outros inibidores do crescimento de microrganismos saprofiticos (LOPES et al., 2008; MEHTA et al., 2005).

Estudos de Peixoto et al. (2006), sobre meios seletivos para isolamento de *Xantomonas citri* pv. *viticola* (Xcv), mostraram redução do tamanho das colônias de 5 mm para 1,5 mm quando utilizaram o meio semi-seletivo. Dezordi (2006) também observou efeitos eficazes usando meio de cultura semi-seletivo para isolar Xcm. O autor indicou a utilização de meios semi-seletivos para a detecção de Xcm em análises de rotina da sanidade de sementes de algodão. Soares (2006), desenvolvendo meio seletivo para detecção de Xcm, obteve resultados eficientes, permitindo isolamento da bactéria com baixos índices de

contaminantes. Violatti e Tebaldi (2016) também observaram vantagens com o meio semi-seletivo quando comparado com o meio de rotina para detecção de Xpp em sementes de feijão, que proporcionou a recuperação de maior número de unidades formadoras de colônias. Além disso, facilitou a observação das colônias formadas e inibiu o crescimento de microrganismos indesejados.

Entretanto, as dificuldades na interpretação dos resultados podem ocorrer por subestimar ou superestimar a concentração correta do patógeno. Por outro lado, alguns meios de cultura podem não serem seletivos o suficiente para proporcionar a recuperação e visualização de colônias típicas da bactéria, dificultando a caracterização com base na morfologia das colônias. Desta maneira, os meios semi-seletivos ou seletivos podem minimizar esses efeitos (TUMULERO, 2012).

2.3.2 INOCULAÇÃO EM PLANTAS

As bactérias penetram nas plantas através de aberturas naturais como estômatos, lenticelas, hidatódios, e aberturas florais, e também por ferimentos. Uma vez no interior das plantas, podem colonizar os espaços intracelulares ou o tecido vascular, levando ao desenvolvimento de sintomas das doenças (BEDENDO; BELASQUE, 2018).

Um bom método de inoculação deve levar em consideração alguns fatores como possibilitar uma boa discriminação entre genótipos resistentes e suscetíveis, utilização de planta sadia e bem nutrida, padronização do estágio de desenvolvimento da planta, potencial de inoculo, método de inoculação adequado e condições ambientais. A observância desses fatores visa proporcionar condições ideais para o estabelecimento e desenvolvimento da doença (MARINGONI; TORRES 1999).

Dentre os métodos mais utilizados para inoculação de bactérias em plantas destacam-se a infiltração com seringa hipodérmica, ferimento com agulhas múltiplas, corte com tesoura, abrasão com pincel, e inoculação por pressão. Em estudos comparando os métodos de inoculação com agulhas múltiplas e o corte com tesoura, Silva et al. (2009) observaram que o método de agulhas múltiplas apresentou maior praticidade e eficiência durante a inoculação. Com esse método de inoculação foi possível ter uma delimitação mais controlada da área foliar inoculada, enquanto a técnica com tesoura não possibilitou obter um controle exato do tamanho do corte (SILVA et al., 2009).

Estudos de Ferreira e Tebaldi (2019) sobre métodos de inoculação de

Xanthomonas campestris pv. *passiflorae* (Xcp) em maracujazeiro relataram eficiência sobre o método de inoculação por aspersão sendo mais prático e rápido, na obtenção dos sintomas da doença e todos os genótipos avaliados foram suscetíveis à Xcp, também se observou nos estudos que os métodos de inoculação por tesoura e pinça tornam-se inviáveis devido aos danos causados nas plantas.

Como visto a inoculação em plantas é importante para o estudo e análise do comportamento do patógeno, assim como a determinação dos métodos de controle. Dependendo do tipo de análise, é necessário que o patógeno parasite a planta em um tempo estabelecido (AMORIM et al, 2018). Desta forma, a escolha de um método de inoculação eficaz é imprescindível (MATTOS et al., 2019)

2.3.3 TESTES MOLECULARES

A biologia molecular veio ao encontro dos interesses da fitopatologia, disponibilizando ferramentas que auxiliam na diagnose e identificação de patógenos que apresentam dificuldades para serem detectados e identificados por métodos tradicionais (BARROCAS et al., 2019). A detecção precoce de agentes patogênicos antes que as plantas sejam infectadas ou desenvolvam sintomas é essencial para a prevenção de doenças, disseminação de inóculo e de perdas econômicas. Portanto, procedimentos de diagnóstico devem ser capazes de detectar a menor quantidade do patógeno presente, ou seja, ter alta sensibilidade (CARNIELLI, 2014).

Uma das mais importantes vantagens que as técnicas de detecção baseadas em procedimentos moleculares têm é a capacidade em distinguir organismos estreitamente relacionados. Muitas vezes, a especificidade patogênica de uma espécie microbiana está relacionada à apenas uma base de um determinado gene. No entanto, o elevado grau de sensibilidade dessas técnicas permite a detecção de diferenças mínimas (LIVIENS; THOMMA, 2005)

Tradicionalmente, as bactérias são caracterizadas com base em critérios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Por outro lado, a biologia molecular tem auxiliado na identificação e detecção de vários fitopatógenos. Atualmente, seu uso é indispensável para a organização taxonômica e filogenética dos microrganismos (LOUWS et al., 1999). Embora as técnicas moleculares tenham sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a especificidade na detecção de bactérias, inibidores presentes no tecido

vegetal podem interferir na sua efetividade (TUMULEIRO, 2012).

2.3.3.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica considerada como um grande marco da biologia molecular, desenvolvida por Mullis e Faloona (1987) durante a década de 1980. A PCR ampliou as possibilidades da análise de DNA, expandindo a biologia molecular para novos campos, entre eles, a agricultura (OLIVEIRA, 2015). O método é caracterizado pela alta sensibilidade e especificidade, além de ser rápido e preciso. A PCR pode ser aplicada na análise de muitas amostras para detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas, mesmo quando presentes em pequenas quantidades e associadas à alta população saprofítica. É também uma importante opção para estudos epidemiológicos e para caracterização de microrganismos causadores de doenças (BARROCAS et al. 2009; OLIVEIRA, 2015).

A partir de quantidades mínimas de DNA alvo é possível pela técnica da PCR amplificar fragmentos utilizando diferentes variações desse procedimento básico (MULLIS e FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988). Além do DNA alvo, os reagentes necessários para realizar a reação são:

- i) Nucleotídeos na forma de trifosfatados (dNTPs), matéria prima base para a síntese de novas fitas de DNA;
- ii) Enzima Taq DNA-polimerase responsável pela síntese das novas fitas de DNA em solução tampão específica;
- iii) $MgCl_2$ doador estável de Mg^{2+} necessário para atividade da enzima Taq DNA- polimerase;
- iv) Iniciadores ou “primers” (forward e reverse) que são pequenos fragmentos de DNA que delimitam e complementam a região alvo de amplificação.

A necessidade de um par de iniciadores da reação decorre de que a polimerase é capaz de alongar uma fita complementar de ácido nucléico pré-existente, que lhe forneça a extremidade 3' livre onde serão adicionados os novos nucleotídeos. A enzima é inapta de iniciar a síntese de uma nova cadeia a partir da cadeia molde sem a presença desses iniciadores (OLIVEIRA, 2015).

A técnica de PCR abrange contínuas ampliações das regiões específicas do DNA do patógeno alvo, por esse motivo tem sido utilizada largamente na diagnose de

doenças de plantas (MIRANDA, 2011). Como desvantagem, a técnica da PCR convencional não fornece informações sobre a viabilidade dos patógenos e não permitem a detecção de bactérias diretamente nos extratos de sementes, por causa da presença de substâncias inibidoras da reação, e não é quantitativa (BARROCAS, 2009). Variações da PCR convencional foram desenvolvidas para aumentar a sensibilidade diagnosticada das amostras (HAAS; TORRES, 2018)

Artigo

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DA TRANSMISSÃO DE *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* POR SEMENTES E RESÍDUOS DE MILHO

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram determinar o potencial de transmissão de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv) para plântulas de milho a partir de sementes infestadas com a bactéria e de resíduos vegetais provenientes de plantas com estria bacteriana. Foram realizados dois procedimentos para detecção da bactéria, a técnica de PCR utilizando os iniciadores específicos para Xvv, Xvv3F / Xvv3R, e o reisolamento em meio de cultura. Para este estudo foram obtidos mutantes de Xvv resistentes à rifampicina. A presença de Xvv foi examinada em sementes de milho do híbrido IPR164 artificialmente infestadas com suspensão bacteriana na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹, aos um, cinco, 10, 15, 30 e 60 dias após a infestação artificial. A transmissão de Xvv a partir de resíduos vegetais foi estudada em três condições: resíduos depositados na superfície do solo após a semeadura (RS), resíduos incorporados ao solo antes da semeadura (RSI) e resíduos associados às sementes (RAS). A transmissão de Xvv, tanto das sementes como do resíduo vegetal, para as plântulas de milho foram monitoradas e avaliadas com base na manifestação de sintomas de estria bacteriana durante quatro semanas após a semeadura. Plântulas que apresentaram sintomas suspeitos de estria bacteriana foram testadas em laboratório para a presença de Xvv pela técnica de PCR. A presença de Xvv nas sementes de milho foi detectada até 60 dias após a infestação artificial com a bactéria. A transmissão de Xvv via sementes para as plântulas de milho ocorreu até 30 dias após a infestação artificial das sementes com a bactéria. Ocorreu transmissão de Xvv para plântulas de milho a partir dos resíduos vegetais provenientes de plantas com estria bacteriana, independente destes resíduos estarem na superfície, incorporados ao solo ou associados às sementes. Na transmissão de Xvv via sementes e resíduos vegetais foram observados sintomas de estria bacteriana basicamente em folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3 das plântulas de milho.

Palavras-chave: Transmissão. Estria bacteriana. Resíduos vegetais. Sementes. *Zea mays*.

DETERMINATION OF THE TRANSMISSION POTENTIAL OF *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* THROUGH SEEDS AND DEBRIS OF MAIZE

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine the potential for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv) transmission through infested seeds and infected maize debris to plants. In the study, maize seeds of the hybrid IPR164 were artificially infested with the bacterial leaf streak bacterium. Two procedures were used for the detection of the bacterium, the PCR technique using the primers Xvv3F / Xvv3R, specific for Xvv, and re-isolation in culture medium. For this study, rifampicin resistant Xvv mutants were obtained. Seeds were artificially infested with a bacterial suspension of the Xvv rifampicin resistant mutant at a concentration of 10^8 CFU mL⁻¹. The presence of Xvv in the seeds was examined at one, five, 10, 15, 30 and 60 days after the artificial infestation. The transmission of Xvv via plant debris was examined under three conditions: plant residues placed on the soil surface after seed sowing (RS), residues incorporated into the soil before sowing (RSI) and residues mixed with maize seeds (RMS). In the transmission of Xvv, the plants were monitored and evaluated for the presence of symptoms of bacterial leaf streak for four weeks after seed sowing. Plants that showed symptoms of the disease were sampled and examined in laboratory for the confirmation of the presence of Xvv using the PCR technique. The presence of Xvv in the maize seeds was detected up to 60 days after the artificial infestation with the Xvv bacterium. The transmission of Xvv from seeds to the maize seedlings occurred up to 30 days after the artificial infestation of the seeds. The Xvv bacterium was also transmitted to the maize seedlings from the plant debris regardless of whether the residues were on the surface, incorporated in the soil or mixed with the seeds. In the transmission of Xvv from seeds and plant debris, the symptoms of bacterial leaf streak were observed basically in the leaves of the vegetative stages V1, V2 and V3 of the maize seedlings.

Keywords: Transmission. Bacterial leaf streak. Plant debris. Seeds. Zea mays

3 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é largamente cultivado e tem grande importância socioeconômica mundial. Nas últimas décadas, o milho passou a ser a principal cultura agrícola, com mais de um bilhão de toneladas produzidas em diferentes países ao redor do mundo. Concomitantemente à sua importância em termos de produção, é um dos principais cereais utilizados como fonte energética nas alimentações animal e humana, e em vários segmentos industriais (SOLOGUREN, 2015; CONTINI et al., 2019). No entanto, a ocorrência de doenças tem acompanhado toda essa evolução da cultura do milho (CASELA; FERREIRA; PINTO, 2006).

Uma das crescentes preocupações para a cultura é a doença foliar causada pela bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv), a estria bacteriana do milho. Essa doença foi relatada pela primeira vez nas Américas em 2016, ocorrendo em proporções epidêmicas em alguns estados americanos (BRODERS, 2017). Recentemente, foi também relatada em países da América do Sul, como Argentina e Brasil (BRODERS, 2017; LANG et al., 2017; LEITE et al., 2018; PLAZAS et al., 2018). Nos Estados Unidos da América (EUA), a estria bacteriana foi constatada em diversas cultivares de milho e em milho pipoca (ARIAS et al., 2020).

A ocorrência de danos econômicos em lavouras de milho está diretamente relacionada às condições climáticas, presença de inoculo inicial, susceptibilidade da cultivar e do estágio fisiológico da planta no momento da infecção pela bactéria (CANTO et al., 2018). Em algumas regiões dos EUA, a doença alcançou níveis de incidência e de severidade acima de 90% e 50%, respectivamente, em híbridos que se mostraram altamente suscetíveis à doença (BRODERS, 2017).

O impacto na produção causado por diferentes espécies de *Xanthomonas* em diversas culturas pode variar de 20 a 50% (HIRANO; UPPER, 1983). Perdas de rendimento de até 40% foram observadas em lavouras de trigo com ocorrência severa de *Xanthomonas translucens* nos EUA (FORSTER et al., 1986). Há relatos de perda de rendimento causado por *X. translucens* pv. *undulosa* de cerca de 20% quando 50% da folha bandeira do trigo foi infectada (ADHIKARI et al., 2011). Perdas causadas por Xvv podem também ser tão severas, inviabilizando a colheita de lavouras inteiras, com significativa quebra na produção (ALMEIDA, 2003).

A forma pela qual a Xvv foi introduzida tanto na América do Norte como na do Sul é desconhecida, porém, é muito provável que tenha ocorrido via sementes infestadas.

Essa possibilidade aumenta consideravelmente quando é analisado o comportamento de algumas espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas* que são transmitidas via sementes, como em algodão, brássicas, feijão, cebola, tomate e pimenta (TEBALDI; PANIZZI; SADER, 2007; ARIAS et al., 2020). Essas bactérias também foram detectadas em resíduos vegetais de culturas como feijão, algodão, cebola, e uva, entre outras (GRAHAM et al., 1987; CHAVES; GRANADA, 1988).

Em estudos recentes, Arias et al. (2020) examinaram a importância das sementes de milho na transmissão da bactéria Xvv para plântulas e o desenvolvimento epidêmico da estria bacteriana. Os autores verificaram a ausência de transmissão sistêmica da bactéria para as plantas, porém sugeriram que a contaminação das sementes por Xvv é principalmente superficial. Estudos de Ortiz Castro, (2019) mostraram que restos de cultura de milho deixados na superfície do solo são provavelmente uma importante fonte de inóculo primário para o desenvolvimento da estria bacteriana em sistemas contínuos de produção de milho. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo determinar o potencial de transmissão de Xvv via sementes, bem como a importância de resíduos provenientes de plantas de milho com estria bacteriana no desenvolvimento da doença.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DE MUTANTES DE *XANTHOMONAS VASICOLA* PV. *VASCULORUM* RESISTENTES À RIFAMPICINA

O isolado RL1 de Xvv da coleção de bactérias fitopatogênicas do laboratório de Bacteriologia do IDR-PR (LEITE et al., 2018) foi utilizado para obter mutantes resistentes à rifampicina. Os mutantes do isolado RL1 de Xvv resistentes à rifampicina foram obtidos através do plaqueamento da bactéria em meio de cultura com gradiente do antibiótico. Ao meio de cultura ágar nutriente (AN) (5 g de peptona, 3 g de extrato de carne, 15 g de ágar, 1 L de água) foi adicionado o antibiótico rifampicina para a concentração final de 2,5 mg L⁻¹ de meio de cultura, após autoclavagem.

A suspensão bacteriana foi preparada em água destilada esterilizada e ajustada em espectrofotômetro para D.O._{600nm} = 0,1, correspondendo à aproximadamente 1 X 10⁸ UFC mL⁻¹. Dessa suspensão, 100 µL foram diluídos e plaqueados no meio de cultura AN contendo rifampicina. As placas foram mantidas a 28°C por 72 horas. As colônias da bactéria que se desenvolveram foram novamente transferidas para o meio de cultura contendo o antibiótico e incubadas horas a 28°C por 24h. A identidade dos mutantes bacterianos obtidos foi confirmada por PCR utilizando iniciadores específicos para Xvv. A patogenicidade dos mutantes de Xvv foi confirmada pela inoculação em plantas do milho híbrido IPR164 no estágio vegetativo V3, mantidas em casa de vegetação.

4.2 FONTE DAS SEMENTES DE MILHO

Nos testes de patogenicidade dos mutantes de Xvv e nos estudos de transmissão da bactéria via sementes e a partir de resíduos vegetais foi utilizado o milho híbrido IPR164. As sementes foram obtidas junto ao Setor de Comercialização do IDR – Paraná, Londrina, PR, e a sanidade em relação à Xvv foi confirmada por PCR utilizando iniciadores específicos para a bactéria e por isolamentos em meio de cultura.

4.3 INFESTAÇÃO ARTIFICIAL DE SEMENTES DE MILHO COM XVV

A infestação das sementes do milho híbrido IPR164 com o mutante de Xvv RL4^{rif+} foi realizada em amostras de 38 g. As sementes foram imersas em 40 mL da suspensão bacteriana do mutante RL4^{rif+} de Xvv na concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹, contendo 0.02% de Tween 20. As sementes foram mantidas imersas na suspensão bacteriana por 8 horas sob agitação suave. Posteriormente, o excesso de líquido foi descartado e as sementes foram submetidas à secagem por 24 horas em temperatura ambiente. Após a secagem, as sementes foram guardadas em sacos de papel Kraft e armazenadas em câmara fria a 8 °C.

4.4 DETECÇÃO DE XVV EM SEMENTES DE MILHO

A presença de Xvv e de células viáveis da bactéria nas sementes de milho foi examinada utilizando as técnicas da PCR e de reisolamento da bactéria em meio de cultura. As sementes foram examinadas para a presença de Xvv aos um, cinco, 10, 15, 30 e 60 dias após a infestação artificial.

4.4.1 DETECÇÃO DE XVV PELA TÉCNICA DA PCR

4.4.1.1 EXTRAÇÃO DE DNA EM SEMENTES INFESTADAS ARTIFICIALMENTE COM XVV

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Ausubel et al. (2003), com pequenas modificações. As sementes foram imersas em 40 mL de solução tampão fosfato (pH 7,0), contendo 0,02% de Tween 20, e agitadas a 140 rpm a 28°C por 2 horas. Posteriormente, foram coletados 10 ml do líquido e centrifugados a 5.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf 5415C (Eppendorf North América, Framingham, MA, EUA) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 2 mL de água e novamente centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente e o pellet foi ressuscitado em 567 µl de tampão de extração (TE), 30 µl de 10% SDS e 3 µl de proteinase K (20 mg mL⁻¹). Após agitação, os tubos foram mantidos a 37° C por 1 hora e em seguida foram acrescentados 100 µl de NaCl 5M e 80 µl de solução

CTAB/NaCl. Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados por 10 minutos a 65°C. Posteriormente, foram adicionados 780 µl de clorofórmio/álcool iso-amílico (24:1), e agitado por 10 minutos e novamente centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 600 µl do sobrenadante para novo microtubo e adicionado o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool-iso-amílico (25:24:1). Após agitação por 10 minutos, os tubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 450 µl do sobrenadante para novo microtubo e adicionado 270 µl de isopropanol para precipitar o DNA. O tubo foi invertido lentamente e mantido a -80°C por 10 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 14.000 rpm por 20 a 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado ao DNA 1 mL de etanol 70%, e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado, e o pellet secado, redissolvido em 50 µl de TE e armazenado a 4°C.

4.4.1.2 TÉCNICA DA PCR CONVENCIONAL COM INICIADORES ESPECÍFICOS PARA XVV

O DNA extraído das amostras de sementes foi submetido à reação de PCR com iniciadores específicos para Xvv, Xvv3_F, Xvv3_R (Lang et al., 2017) (Tabela 1). A PCR foi realizada em volume final de 25 µL, incluindo 1 µL de DNA, 2,5 µL de tampão para PCR 10 X, 1 µL de cada iniciador a 10 µM, 0,8 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP 5 mM, 1 µL de DNA polimerase GoTaq (Promega Corp., Madison, WI, EUA), 16,7 µL de água ultrapura.

A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada com desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 30 s a 94 °C, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi submetido à eletroforese a 6 V/cm², em gel de agarose 0,7% (p/v) em tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA, pH 8,0). O gel foi corado com Syber Gold (Thermo Fisher Scientific, Jaguaré, SP, Brasil), visualizado sob luz UV e fotodocumentado pelo sistema L-PIX (Scienlabor, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Tabela 1- Iniciadores da PCR específicos para *Xanthomonas vasicola* pv. *vascolorum* utilizados no estudo.

Região alvo	Iniciador	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temp. (°C) ^a
Putative membrane protein	<i>Xvv3_F</i>	CAAGCAGAGCATGGCAAAC	207	55
	<i>Xvv3_R</i>	CACGTAGAACCGGTCTTTGG		

^aTemperatura de anelamento. Fonte: Lang et al., 2017.

4.4.2 DETECÇÃO DE XVV POR REISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA

Para detecção de Xvv em meio de cultura, 19 g das sementes artificialmente infestadas com a bactéria foram imersas em 40 mL de solução tampão Tween fosfato (pH 7,0), contendo 0,02% de Tween 20, em frascos Erlenmeyer de 120 mL e agitadas em incubadora/agitador de bancada Ethik (Ethiktechnologic, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a 140 rpm em temperatura de 28°C por 4 horas. Posteriormente, 100 µL do líquido da lavagem das sementes foram plaqueados em triplicata em AN acrescido de 2,5 mg L⁻¹ de rifampicina. As placas foram mantidas a 28°C por 72 horas. Após esse período, as placas foram examinadas para a presença de colônias típicas de Xvv. As colônias com características de Xvv foram contadas e submetidas ao teste de PCR para confirmação de identidade.

4.5 TRANSMISSÃO DE XVV PARA PLANTAS

4.5.1 TRANSMISSÃO VIA SEMENTES

Nos estudos da transmissão de Xvv a partir de sementes para plantas foram utilizadas sementes infestadas artificialmente aos um, cinco, 10, 15, 30 e 60 dias após a infestação, como descrito no item 4.3. As sementes foram semeadas em vasos contendo mistura de solo:areia:esterco (3:1:1). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação semi-climatizada após a semeadura. Após a germinação, foi realizado raleio, mantendo cinco

plantas por vaso. Para cada tratamento, dias após a infestação artificial das sementes com Xvv, foram semeados dez vasos. As plantas foram monitoradas e avaliadas quanto à manifestação de sintomas de estria bacteriana durante quatro semanas após a semeadura. As folhas que apresentaram sintomas suspeitos da doença foram coletadas e analisadas em laboratório para determinar a presença da bactéria Xvv pela técnica de PCR. Sementes isentas de Xvv foram incluídas no estudo como controle negativo. Essas sementes passaram por assepsia, sendo três minutos em álcool 70% , dois minutos em hipoclorito de sódio 1% e três minutos em água, previamente à semeadura.

4.5.2 TRANSMISSÃO VIA RESÍDUOS VEGETAIS

Os resíduos vegetais foram obtidos a partir da coleta de plantas de milho sintomáticas para estria bacteriana em áreas de lavouras comerciais nas regiões Norte e Oeste do estado do Paraná. No estudo também foram utilizadas amostras de folhas com sintomas da doença provenientes de plantas do milho híbrido IPR 164 inoculadas artificialmente e mantidas em casa de vegetação. As amostras de folha foram trituradas utilizando moinho analítico básico modelo A11 BASIC, marca IKA (IKA BRASIL, Campinas, SP, Brasil) para obter os resíduos vegetais. A presença de Xvv nos resíduos foi confirmada em laboratório utilizando a técnica da PCR.

No estudo da transmissão de Xvv a partir dos resíduos vegetais foram avaliados três tratamentos (Tabela 2). Para os três tratamentos, as sementes do milho híbrido IPR 164 foram semeadas em vasos contendo mistura de solo:areia:esterco (3:1:1). Os vasos foram mantidos sob condições de casa de vegetação semi-climatizada durante todo o período experimental. Após a germinação, foi realizado raleio, mantendo cinco plantas por vaso. O experimento foi inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento.

Tabela 2 – Tratamentos avaliados no estudo da transmissão de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* a partir de resíduos vegetais contaminados com a bactéria da estria bacteriana.

Tratamento	Descrição^a
1	Resíduo vegetal depositado na superfície do solo (RS)
2	Resíduo vegetal incorporado ao solo (RIS)
3	Resíduo vegetal misturado às sementes (RAS)

^aNos tratamentos 1 e 2 foram utilizados 13 g de resíduo vegetal triturado por vaso. No tratamento 3 foram misturados às sementes 3 g de resíduo vegetal triturado por 50 sementes, antes da semeadura.

As plantas de milho foram monitoradas e avaliadas quanto à manifestação de sintomas de estria bacteriana periodicamente até o estágio vegetativo V3. As plantas que apresentaram sintomas suspeitos de estria bacteriana foram amostradas e as amostras foram analisadas em laboratório para determinar a presença de XvV pela técnica de PCR utilizando iniciadores específicos para a bactéria.

4.5.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE FOLHAS DE MILHO COM SINTOMAS SUSPEITOS DE XVV

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Murray e Thompson (1980), com pequenas modificações. As folhas coletadas foram cortadas em pequenos pedaços e 500 mg foram macerados em 3 mL de tampão de extração CTAB + 0,2% de β -mercaptoetanol. Os extratos obtidos foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e mantidos a 65°C por 30 minutos, com agitação por inversão após 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm em microcentrífuga Eppendorf 5415C (Eppendorf North América, Framingham, MA, EUA) por 5 minutos. Foram recuperados 700 μ L do sobrenadante, transferidos para novo tubo, e adicionado volume igual de clorofórmio-álcool isso-amílico (24:1). Os microtubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. Novamente, foram transferidos 600 μ L do sobrenadante para novo tubo e adicionado 360 μ L de isopropanol, seguido de agitação. As amostras foram mantidas a -20° C durante 30 minutos. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido. Após a

centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet obtido foi seco à temperatura ambiente. O pellet foi ressuspensionado em 100 µL de tampão TE e armazenado a -20°C. As amostras foram submetidas à técnica de qPCR utilizando iniciadores específicos para a bactéria da estria bacteriana do milho como descrito no item 4.4.1.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

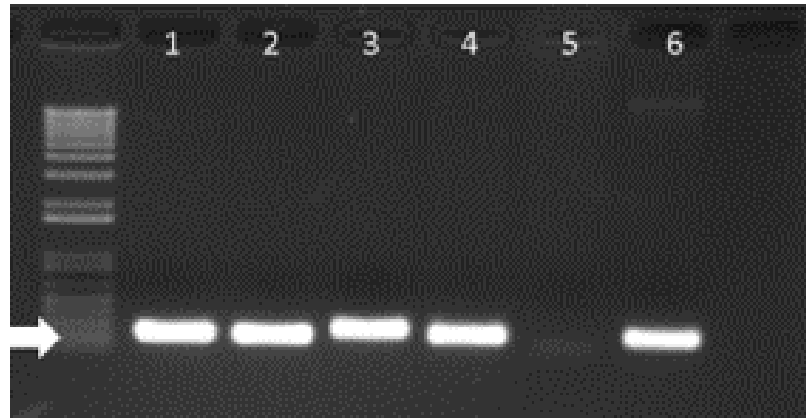
Na análise dos dados dos experimentos de transmissão de Xvv a partir de sementes e resíduos vegetais foi utilizada a análise de Deviance (ANODEV), considerando o modelo linear generalizado cuja distribuição foi definida como binomial. O efeito do tratamento foi testado pelo teste Qui-quadrado ($p \leq 0,05$). Os contrastes de Tukey foram realizados utilizando o pacote emmeans ('Estimated Marginal Means') (LENTH, 2018). Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R Core Team, 2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DE MUTANTES DE XVV RESISTENTE À RIFAMPICINA

Foram obtidos quatro mutantes do isolado RL1 de Xvv resistentes à rifampicina, RL2^{rif+}, RL3^{rif+}, RL4^{rif+} e RL5^{rif+}. Todos os mutantes apresentaram colônias com características mucoides e lisas, e de coloração amarela, semelhantes às do isolado original RL1. A identidade dos mutantes foi confirmada como Xvv com base em teste de PCR (Figura 3).

Figura 3 – Produto de PCR com amplificação a partir do DNA de mutantes do isolado RL1 de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* resistentes à rifampicina. 1, RL2^{rif+}; 2, RL3^{rif+}; 3, RL4^{rif+}; 4, RL5^{rif+}; 5, controle negativo; 6, controle positivo. Marcador de peso molecular 1 Kb Plus. A flecha indica fragmento de 200 pb produzido com o par de iniciadores Xvv3F / Xvv3R.



Em estudos realizados por Silva et al. (2012), o antibiótico rifampicina também mostrou eficácia para obtenção do mutante Xcv^{rif} de tecidos de videira infectados com *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv). Assim como os resultados obtidos no presente estudo, Silva et al. (2012) e Naue (2013) com Xcv e Kobayasti (2012) com Xpp também obtiveram mutantes bacterianos resistentes à rifampicina com características culturais e patogênicas semelhantes ao isolado original. Esses resultados corroboram para viabilizar a utilização da rifampicina como agente seletivo.

A patogenicidade dos mutantes bacterianos foi confirmada pela inoculação

em plantas de milho do híbrido IPR 164, sendo observado o desenvolvimento de lesões típicas de estria bacteriana nas folhas (Figura 4). Os mutantes de Xvv resistentes à rifampicina foram preservados em tampão fosfato e mantidos à temperatura ambiente. Nos estudos desenvolvidos foi utilizado o mutante RL4^{rif+}.

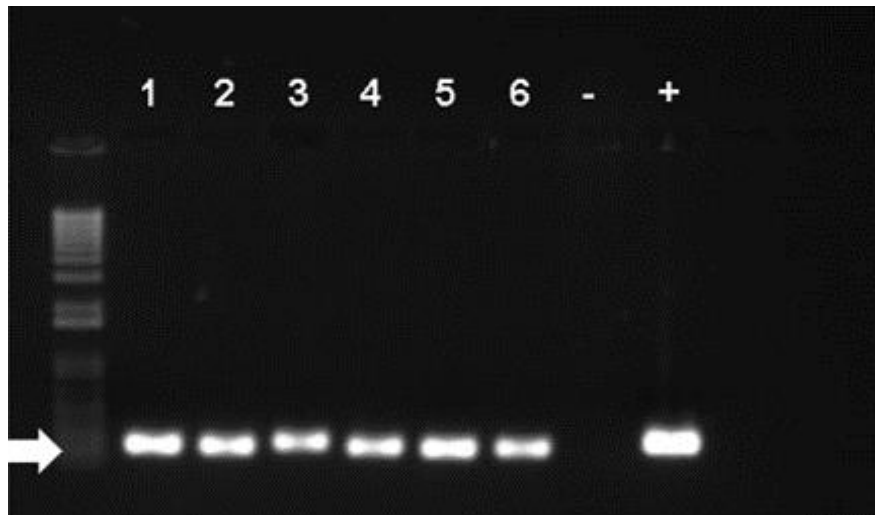
Figura 4 – Sintomas de estria bacteriana em folhas de milho do híbrido IPR 164 inoculados com mutantes do isolado RL1 de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* resistente à rifampicina. A, RL2^{rif+}; B, RL3^{rif+}; C, RL4^{rif+}; D, RL5^{rif+}.



5.2 INFESTAÇÃO ARTIFICIAL DE SEMENTES DE MILHO COM XVV

Sementes de milho do híbrido IPR 164 foram artificialmente infestadas com o mutante RL4^{rif+} de Xvv e examinadas para a presença de células viáveis da bactéria até 60 dias após a infestação bacteriana. A presença da bactéria nas sementes foi constatada por PCR até 60 dias após a infestação artificial, quando foi realizada a última amostragem (Figura 5).

Figura 5 – Produto da reação da PCR para sementes de milho do híbrido IPR 164 artificialmente infestadas com o mutante RL4^{rif^r} de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Dias após a infestação artificial: 1, um; 2, cinco; 3, 10; 4, 15; 5, 30; 6, 60. -, controle negativo; +, controle positivo. Marcador com peso molecular de 1 Kb Plus. A flecha indica fragmento de 200 pb produzido com o par de iniciadores Xvv3F / Xvv3R.



Estudos relacionados à recuperação de bactérias fitopatogênicas de sementes artificialmente e naturalmente infestadas podem ser controversos. Silvia (2013) e Torres, et al., (2009) detectaram a presença de Xpp em 38,3% e 50% dos lotes de sementes de feijão infestadas artificialmente. Entretanto, Arias et al. (2020) obtiveram resultados contraditórios com Xvv em amostras de sementes de milho naturalmente e artificialmente infestadas com a bactéria da estria bacteriana. Estudando 43 lotes de sementes de milho infestados naturalmente, detectaram Xvv em muitas das amostras em testes da PCR, porém não foi possível obter a recuperação da bactéria em plaqueamento em meio de cultura. Por outro lado, a bactéria Xvv presente em lotes artificialmente infestados foi prontamente recuperada.

Em nossos estudos, a quantidade de células viáveis de Xvv nas sementes de milho do híbrido IPR 164 infestadas artificialmente variou de 4,95 a 2,51 log₁₀ UFC g⁻¹ do primeiro ao sexagésimo dia após a infestação artificial, respectivamente (Tabela 3). Houve redução de 2,44 log₁₀ UFC g⁻¹. A identidade das bactérias obtidas no reisolamento foi confirmada como Xvv com base em teste de PCR (Figura 6).

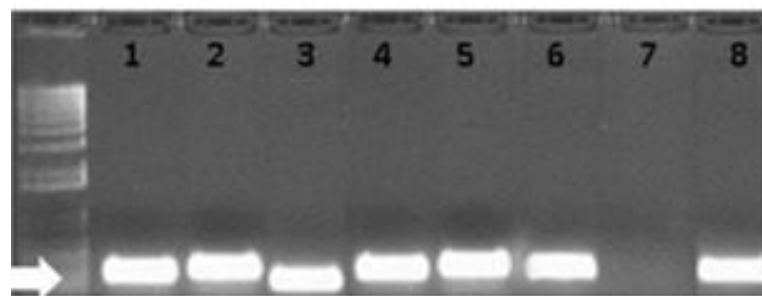
Tabela 3 - Presença de células viáveis de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* em sementes de milho do híbrido IPR 164 durante diferentes períodos após a infestação artificial com o mutante RL4^{rif+}.

Dias após infestação ^a	População de Xvv ^b (Log ₁₀)
1	4,95 a
5	4,85 b
10	4,56 c
15	4,46 c
30	3,23 d
60	2,51 e

^aDias após a infestação artificial das sementes com suspensão de 1×10^8 UFC mL⁻¹ do mutante RL4^{rif+} de *X. vasicola* pv. *vasculorum*.

^bMédias obtidas de três repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = 10,55%.

Figura 6 – Produto da reação da PCR de colônias recuperadas de sementes de milho do híbrido IPR 164 artificialmente infestadas com o mutante RL4^{rif+} de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Dias após a infestação artificial: 1, um; 2, cinco; 3, 10; 4, 15; 5, 30; 6, 60; 7, controle negativo; 8, controle positivo. Marcador com peso molecular de 1 Kb Plus. A flecha indica fragmento de 200 pb produzido com o par de iniciadores Xvv3F / Xvv3R.



Vários estudos têm evidenciado a presença de bactérias fitopatogênicas associadas à sementes. Tumulero (2012) confirmou a presença de *X. citri* subsp. *malvacearum* (Xcm) em sementes de algodão. Entretanto, foi impossível a quantificação da bactéria por

reisolamento em meio de cultura devido ao crescimento esporádico de algumas colônias e à grande quantidade de contaminantes. Resultados semelhantes foram obtidos por Almeida et al. (2003) que somente detectaram a presença de Xcm, porém não conseguiram quantificar a bactéria em plaqueamento em meio de cultura. Arias et al. (2020) constataram níveis baixos de Xvv em sementes de milho colhidas em lavouras infectadas naturalmente com a bactéria da estria bacteriana. Os autores sugeriram que uma população limite de $3,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ seria necessária para o desenvolvimento de sintomas de estria bacteriana. Goto (1992) relatou a presença de *X. vesicatoria* causando sintomas de manchas foliares em tomate com uma população de 10^6 UFC mL⁻¹. Por outro lado, estudos de Schaad e Forster (1995) reportam o isolamento prontamente de *Xanthomonas translucens* em sementes de trigo, sugerindo uma concentração mínima de 10^3 UFC mL⁻¹ para que a doença se desenvolvesse. Entretanto, as sementes de trigo estão mais expostas *in situ* à contaminação pela bactéria *X. translucens* do que as sementes de milho para Xvv, visto que em milho normalmente as sementes estão protegidas pela palha da espiga (ARIAS et al., 2020).

5.3 TRANSMISSÃO DE XVV VIA SEMENTES

Este estudo sobre a transmissão de Xvv via sementes infestadas artificialmente foi realizado sob condições de casa de vegetação. Após quatro semanas da semeadura foram observados os primeiros sintomas de estria bacteriana nas plântulas de milho, como listras castanho-amarelas nas folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3 (Figura 7). Entretanto, alguns sintomas atípicos, como, por exemplo, queima de folhas, foram também observados (Figura 7). Cabe ressaltar que os sintomas de estria bacteriana foram observados somente nas folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3, em ambos os estudos.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os obtidos por Arias et al. (2020). Os autores não observaram sintomas nos tecidos da casca das sementes e nem evidências de colonização sistêmica de plantas pela bactéria da estria bacteriana. Esses resultados indicam que a contaminação das sementes de milho por Xvv ocorre basicamente de forma superficial, provavelmente aderida externamente na superfície das sementes. Essas evidências são reforçadas pela observação de que somente folhas dos estádios vegetativos iniciais das plântulas de milho, V1, V2 e V3, foram infectadas pela bactéria da estria bacteriana.

Figura 7- Sintomas típicos de estria bacteriana e atípicos em folhas de plântulas de milho do híbrido IPR 164 obtidas a partir de sementes infestadas artificialmente com suspensão na concentração de 10^8 UFC mL^{-1} do mutante RL4^{rif+} de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, 4 semanas após a semeadura. 1 e 3, sintomas típicos de estria bacteriana; 2 e 4, sintomas atípicos.



Com base nas análises estáticas de Deviance, no primeiro ensaio foi observada diferença significativa na incidência de plântulas com estria bacteriana somente entre as sementes infestadas aos cinco e 60 dias previamente à semeadura (Tabela 4). Os demais tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Enquanto as plântulas produzidas a partir de sementes infestadas com Xvv 60 dias antes da semeadura não apresentaram sintomas de estria bacteriana, mais de 40% das plântulas provenientes de sementes infestadas com a bactéria cinco dias antes da semeadura apresentaram sintomas da doença (Tabela 4). Além disso, plântulas de milho obtidas de sementes infestadas artificialmente 30 dias antes da semeadura também apresentaram sintomas de estria bacteriana. No segundo ensaio também foram observadas sintomas da doença em plântulas

obtidas a partir de sementes infestadas artificialmente com a Xvv até 15 dias antes da semeadura (Tabela 4). Assim, os resultados deste estudo indicam o potencial de transmissão da Xvv via sementes para plântulas de milho a partir de contaminações ocorridas até pelo menos 30 dias após a infestação com a bactéria da estria bacteriana.

Tabela 4 – Incidência de plântulas de milho do híbrido IPR 164 com sintomas suspeitos de estria bacteriana e com confirmação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* por PCR em relação ao tempo da infestação artificial das sementes com o mutante RL4^{ri+}.

Dias após a infestação	Plântulas com sintomas suspeitos (%)		Plântulas com confirmação de Xvv por PCR (%)	
	Ensaio I	Ensaio II	Ensaio I	Ensaio II
1	66 b	56 b	24,2 ab	42,9 b
5	38 ab	46 ab	42,0 b	26,1ab
10	36 ab	30 ab	27,0 ab	13,3 ab
15	26 a	34 ab	15,4 ab	11,8 ab
30	24 a	20 ab	8,3ab	0 a
60	10 a	12 a	0 a	0 a
Controle	14 a	18 ab	0 a	0 a

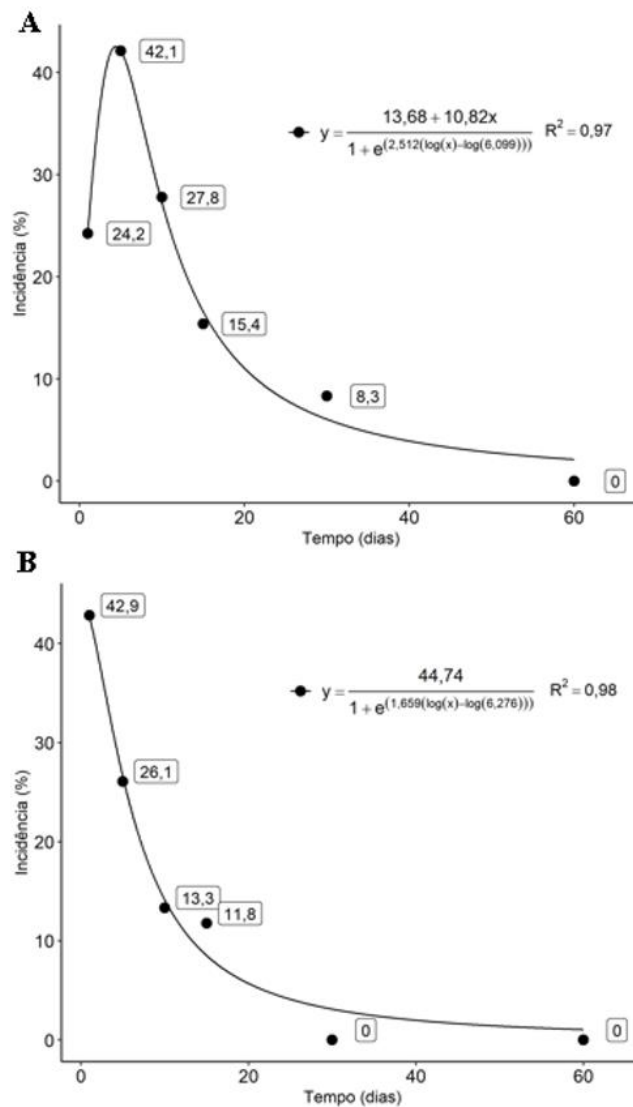
*Medias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A incidência de estria bacteriana foi maior nas plântulas produzidas a partir de sementes recém infestadas com Xvv, reduzindo significativamente ocorrência da doença conforme aumentou o tempo entre a infestação artificial com a bactéria e a semeadura (Tabela 4; Figura 8). No primeiro ensaio, houve maior incidência da doença nas plântulas obtidas das sementes semeadas até o quinto dia após a infestação artificial, com valores superiores a 40% de plântulas infectadas (Tabela 4; Figura 8A). Entretanto, ocorreu redução significativa na incidência de plântulas doentes nas semeaduras realizadas a partir de 30 dias após a infestação das sementes com a bactéria Xvv (Tabela 4; Figura 8).

Cabe salientar que no segundo ensaio foi observado comportamento semelhante na transmissão da bactéria Xvv das sementes para as plântulas de milho (Figura 8B). Não foi observada transmissão da bactéria para as plântulas da semeadura realizada 30 dias após a infestação artificial das sementes (Tabela 4; Figura 8B). Na semeadura realizada

aos 60 dias após a infestação artificial das sementes também não foi possível obter comprovação por teste da PCR para as plântulas com sintomas suspeitos de estria bacteriana (Tabela 4). No entanto, a bactéria foi detectada por PCR nas sementes artificialmente infestadas (Figura 5). A baixa população viável da bactéria nas sementes pode não ter sido suficiente para infectar as plântulas e, conseqüentemente desenvolver a doença.

Figura 8- Curva de progresso da incidência de estria bacteriana em plântulas de milho do híbrido IPR 164 em relação ao período da infestação artificial de sementes com o mutante RL4^{rif+} de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. A, ensaio I; B, ensaio II.



Regressões logísticas pelo teste T com p-valor significativo a 5%.

Estudos de Arias et al. (2020) mostraram lotes de sementes de milho naturalmente contaminados com Xvv da ordem de 0,1 e 0,5%. Entretanto, os autores não observaram transmissão da bactéria presente nas sementes para as plântulas de milho. Em contraste, no presente estudo foi evidenciada a transmissão de Xvv a partir de sementes contaminadas para as plântulas de milho até 30 dias após a infestação artificial, incluindo o desenvolvimento de sintomas típicos da doença nas folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3. A presença da bactéria Xvv nessas plântulas foi confirmada por testes da PCR e pela sua recuperação em plaqueamento em meio de cultura.

Theodoro et al, (2011) detectaram *X. citri* subsp. *malvacearum* (Xcm) até os 20 dias após a imersão de sementes de algodão em suspensão bacteriana. Entretanto, não foi possível detectar a transmissão de Xcm das sementes para as plântulas em duas safras experimentais, sendo isto justificado pelas condições ambientais não terem sido favoráveis ao desenvolvimento da doença. Bianchini et al. (2005) detectaram *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (Xpp) em sementes de feijoeiro após 15 anos. Estudos realizados por Wallen e Suttom (1965) demonstraram que 0,5% de sementes infectadas por Xpp já seria suficiente para desencadear uma epidemia em lavouras de feijão e causar danos a campo.

Sintomas de estria bacteriana foram observados somente em folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3 das plântulas de milho provenientes de sementes infestadas artificialmente com Xvv. Cabe salientar que a incidência da doença foi maior nas folhas do estágio vegetativo V1, com aproximadamente 25% de folhas doentes para ambos os ensaios (Tabela 5). Por outro lado, a incidência da estria bacteriana foi menor nas folhas do estágio vegetativo V3 (Tabela 5). O efeito não significativo entre o tempo de infestação artificial das sementes e a ocorrência da doença nas folhas dos diferentes estádios vegetativos das plantas (Figura 9; Tabela 5) corrobora para evidenciar que em sementes de milho provavelmente ocorre contaminação superficial por Xvv, não havendo colonização e multiplicação da bactéria ou infecção interna das sementes. Os resultados obtidos são consistentes com estudos de Arias et al. (2020) que também observaram sintomas de estria bacteriana somente nas primeiras folhas verdadeiras das plântulas de milho obtidas de sementes artificialmente infestadas com a bactéria.

Tabela 5 - Incidência de estria bacteriana em folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3 de plântulas de milho do híbrido IPR 164 obtidas de sementes infestadas artificial com o mutante RL4^{rif+} de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* e interação entre o período de infestação das sementes e o estágio vegetativo das folhas.

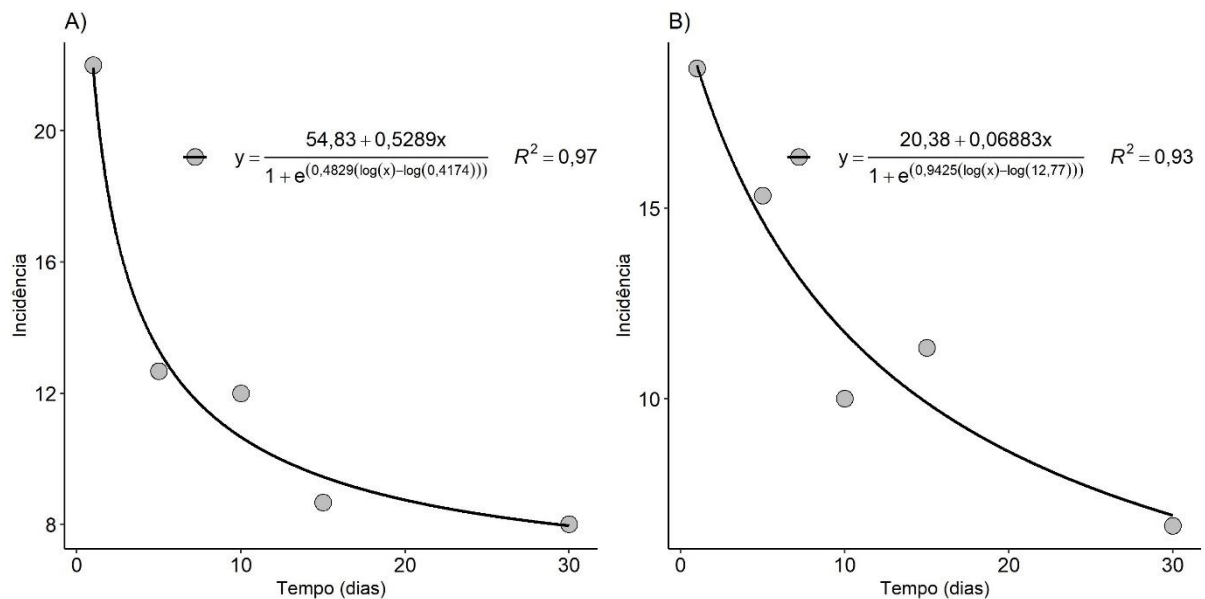
Estádio ^a	Incidência	
	Ensaio 1	Ensaio 2
V1	25,6 a ^b	25,2 a
V2	9,6 b	8,4 b
V3	2,8 c	3,6 b
Tempo (A)^c	< 0,001*	< 0,002*
Estádio (B)^d	< 0,001*	< 0,001*
A x B^e	0,091 ns	0,253 ns

^aFolhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3 das plântulas de milho.

^bMédias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

^cFatores: tempo de infestação das sementes à semeadura, estágio vegetativo da planta e interação entre tempo e estágio vegetativo. *, p-valor significativo a 5%; ns, não significativo a 5% de probabilidade.

Figura 9- Regressão logística do progresso da incidência de estria bacteriana em folhas dos diferentes estádios vegetativos das plântulas de milho em relação ao tempo de infestação artificial das sementes com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. A, ensaio I; B, ensaio II.



5.4 TRANSMISSÃO DE XvV A PARTIR DE RESÍDUOS VEGETAIS

Nesse estudo foi investigado o potencial de resíduos de milho como fonte primária de inóculo para o desenvolvimento da estria bacteriana em plantas de milho. Assim, como nos estudos de transmissão via sementes, os sintomas da doença foram observados nas primeiras folhas das plântulas de milho, incluindo as folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3, independente da disposição dos resíduos vegetais (Figura 10; Tabela 7). Além disso, foram observados sintomas típicos de estria bacteriana como também alguns sintomas atípicos nas folhas das plântulas de milho (Figura 10).

Plantas de milho com sintomas suspeitos de estria bacteriana foram observadas nos três tratamentos incluídos neste estudo, independente da disposição dos resíduos (Tabela 6). Entretanto, os resíduos depositados na superfície do solo (RS) e os incorporados ao solo (RIS) foram mais efetivos em transmitir a bactéria da estria bacteriana para as plântulas de milho (Tabela 6).

Como mencionado anteriormente, os sintomas de estria bacteriana foram observados somente em folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3, independente da disposição dos resíduos vegetais (Tabela 7). Entretanto, a maior incidência de sintomas da doença foi observada nas folhas do estágio vegetativo V1 (Tabela 7). Já para as folhas do estágio vegetativo V3, sintomas de estria bacteriana foram observados somente em plântulas quando os resíduos foram incorporados ao solo (Tabela 7). Esses resultados são semelhantes aos obtidos para a transmissão de XvV via sementes infestadas com a bactéria, onde somente folhas dos estádios V1, V2 e V3 apresentaram sintomas de estria bacteriana.

Figura 10 – Sintomas típicos e atípicos de estria bacteriana em plantas do híbrido de milho IPR 164 em estudo da transmissão de *Xanthomonas vasicola* pv. *vascolorum* a partir de resíduos vegetais após 14 dias da semeadura. 1, 2 e 3, sintomas típicos de estria bacteriana; 4, 5 e 6, sintomas atípicos.



Tabela 6- Incidência de plântulas de milho do híbrido IPR 164 com sintomas de estria bacteriana e detecção por PCR em relação ao tipo de associação de resíduos vegetais infectados com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*.

Tratamento ^a	Plantas com sintomas suspeitos ^b (%)	Plântulas com confirmação de Xvv por PCR (%)
RS	64 a	18,8 ^c a
RIS	60 a	23,3 a
RAS	48 a	8,3 ab
Controle	12 b	0 b

^aRS, resíduos depositados na superfície do solo; RIS, resíduos incorporados ao solo; RAS, resíduos associados às sementes.

^bPorcentagem de plantas com sintomas suspeitos de estria bacteriana.

^cMédias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7 – Incidência de estria bacteriana em folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3 de plântulas de milho do híbrido IPR 164 em relação ao tipo de associação de resíduos vegetais infectados com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*.

Tratamento ^a	Incidência (%) ^b		
	V1 ^c	V2	V3
RAS	0.40 Aa ^d	0.08 Ab	0 Ab
RIS	0.36 Aa	0.16 Ab	0.08 Ab
RS	0.46 Aa	0.18 Ab	0 Ac

^aRAS, resíduos associados às sementes; RIS, resíduos incorporados ao solo; RS, resíduos depositados na superfície do solo.

^bPorcentagem de folhas com sintomas de estria bacteriana.

^cEstádio vegetativo.

^dMédias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Estudos realizados por Ortiz-Castro, (2019) não evidenciaram o potencial de transmissão de Xvv a partir de resíduos infectados para plântulas de milho. Os autores também estudaram a degradação desses resíduos quando dispostos na superfície ou incorporados ao solo, observando uma maior degradação nas amostras incorporadas ao solo do que naquelas mantidas na superfície. Entretanto, a redução na população de Xvv em

resíduos incorporados ao solo não foi significativamente diferente da redução da população da bactéria nos resíduos mantidos na superfície do solo (Ortiz-Castro, 2019).

A capacidade de sobreviver em restos culturais foi também estudado por Chaves e Granada (1988) para *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli*. A bactéria foi detectada a 15 cm de profundidade no solo e na palhada durante o inverno em áreas onde não havia sido efetuada rotação de culturas. Resultados semelhantes também foram obtidos com restos culturais de videira para *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (NASCIMENTO; MARIANO, 2004).

O solo também possui um ambiente diversificado no qual suas características químicas, físicas e biológicas influenciam o desempenho dos mecanismos de sobrevivência de fitopatógenos (MENZIES, 1963). É de conhecimento que bactérias do gênero *Xanthomonas* são pouco adaptadas à sobrevivência no solo, tendo suas populações reduzidas em um curto espaço de tempo (SILVA, 2015). As variações nas condições abióticas também podem explicar a sobrevivência de Xvv em detritos do hospedeiro. De acordo com Ortiz Castro, (2019), há uma correlação positiva entre a água e a disseminação de Xvv. A bactéria pode ser transferida de restos de milho para novas plantas através de respingos de água de chuva ou irrigação no início da estação de crescimento. Desta maneira, a baixa taxa de transmissão da bactéria a partir de resíduos vegetais observada no presente estudo também pode ser justificada pelas plantas se encontrarem em um ambiente com oscilações de temperatura e umidade, fatores que podem ter influenciado no desenvolvimento da doença. De acordo com Srivastava e Bais (1987), a temperatura possui efeito pronunciado na sobrevivência de bactérias no solo. Ao avaliarem a capacidade de sobrevivência de *Xanthomonas citri* pv. *glycines*, observaram que a bactéria sobreviveu por um período maior, por até 60 dias, em condições de temperaturas mais baixas. Por outro lado, a sobrevivência foi menor em temperaturas mais elevadas, sendo de até 30 dias (SRIVASTAVA; BAIS, 1987). Os autores concluíram que em temperaturas mais elevadas a decomposição dos tecidos vegetais é mais rápida, tornando a bactéria menos protegida, o que conseqüentemente colabora para uma rápida diminuição de sua população. De acordo com o observado no presente estudo e corroborando com os resultados de Ortiz-Castro, (2019), a transmissão de Xvv a partir de resíduos vegetais apresenta um potencial baixo e não uniformemente distribuído, dificultando a transmissão da bactéria para as plantas emergentes.

6 CONCLUSÕES

A presença de *X. vasicola* pv. *vasculorum* em sementes de milho é detectada até 60 dias após a infestação artificial com suspensão bacteriana.

A transmissão de *X. vasicola* pv. *vasculorum* de sementes para plântulas de milho ocorre até 30 dias após a infestação artificial.

Ocorre transmissão de *X. vasicola* pv. *vasculorum* para plântulas de milho a partir de resíduos vegetais provenientes de plantas com estria bacteriana, independente destes resíduos vegetais estarem na superfície, incorporados ao solo ou associados às sementes.

Na transmissão de *X. vasicola* pv. *vasculorum* via sementes ou resíduos vegetais são observados sintomas de estria bacteriana basicamente em folhas dos estádios vegetativos V1, V2 e V3 das plântulas de milho.

7 REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, T. B.; GURUNG, S.; HANSEN, J. M.; BONMAN, J. M. Pathogenic and genetic diversity of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* in North Dakota. **Phytopathology**, Vol. 102, No. 4, Salinas, CA, jan.2012.
- ALMEIDA, I. M. G. **Gomose da cana-de-açúcar no Brasil. Instituto Biológico.** Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/rifib/IX_RIFIB/almeida1.PDF. Acesso: 15 ago.2020
- ALVAREZ, A. M.; LOU, K. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. **Plant Disease**, Saint Paul, v.69, n.12, p.1082-1086, 1985.
- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**, 5 ed. Editora Agronômica Ceres Ltda. v 1, São Paulo. 2018. 573p
- ARIAS, S. L.; BLOCK, C. C.; MAYFIELD, D. A.; SANTILLANA, G.; STULVBERG, M. J.; BRODERS, K. D.; JACKSON-ZIENS, T. A.; MUNKVOLD, G. P. Occurrence in seeds and potential seed transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in maize in the United States. **APS Publications**, 2020.
- ARIAS, S.; BLOCK, C. C.; MAYFIELD, D. A.; BRODERS, K.; JACKSON-ZIEMS, T. A.; MUNKVOLD, G. P. Potential for seed transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* on maize collected from fields in the United States. **ICPP BOSTON**, 2018.
- BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; FIGUEIRA, A. R.; SOUZA, R. M.; ISHIDA, A. K. N.; ZACARONI, A. B.; ROCHA, H. S. **Uso de técnicas moleculares para diagnose de patógenos em sementes. EMBRAPA.** Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/880126/1/ia2531.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2020
- BEDENDO, I. P.; BELASQUE, J. Bactérias fitopatogênicas. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**, UFV, volume 1, p.143-160 cap.9, 2018.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. V.2. Doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 333-349
- BORÉM, A.; GIÚDICE, M. P. Cultivares transgênicos. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). **Tecnologias de produção de milho**. Viçosa: UFV, 2004. p. 85-108.
- BRINKERHOFF, L. A.; FINK, G. B. **Semente infectada internamente como fonte de inóculo para o ciclo primário de crestamento bacteriano do algodão**, 1963. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19641101657>. Acesso: 10 nov. 2020
- BRITO, A. H.; VON PINHO, R. G.; PEREIRA, J. A. R.; BALESTRE, M. Controle químico da Cercosporiose, Mancha Branca e dos grãos ardidos em milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 5, p. 629-635, 2013.

BROEDERS, K. **Status of bacterial leaf streak of corn in the United States.**2017. Disponível em: <https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1267&context=icm>. Acesso em: 04 abr. 2020

CANTO, P.; LUZ, M.; LANZA, N.; MATOSO, P.; CAMPOS, C.; OLIVEIRA, A.; SCHUSTER, I. **Estria bacteriana do milho: *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*.** Edição Informe. Disponível em: https://lpht.com.br/storage/2020/03/InformeTecnicoLPHT_Ed.01.pdf . Acesso em: 12 ago. 2020

CARNIELLI, L. Detecção molecular de *Fusarium guttiforme*, agente etiológico da fusariose do abacaxizeiro. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória – ES, 2014. Disponível em: <http://repositorio.ufes.br/bitstream/10/1884/1/Dissertacao%20Lorena%20Carnielli.pdf>

CASELA, C. A.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**, 2006. Disponível em: https://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/doencas.html. Acesso: 12 ago.2020

CHAVEZ, L. C.; GRANADA, G. A. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, causal agent of a bacterial disease of bean, under conditions in the Cauca Valley, Colombia. **Fitopatologia Colombiana**, v.12, n.1, p.9-14,1988.

COELHO, J. D. Milho: Produção e Mercado. **Etene**. Fortaleza, v.5, n.140 p. 1-8, nov. 2020.

CONAB. Acompanhamento da safra Brasileira de Grãos. **Compêndio de estudos Conab**, safra 2020/21, 2020. Disponível em: safradegraos/item/download/33690_71305588b650dfe376aa0011b986350b. Acesso: 02 abr.2020

CONAB. Observatório agrícola: Acompanhamento da safra brasileira de grãos. **Compêndio de estudos Conab**, safra 2019/20, 2020. Disponível em: https://www.conab.gov.br/infoagro/safras/graos/boletimdasafraadegraos/item/download/30348_aa345b3df6694e420f12eedc8ffb970d. Acesso: 02 abr.2020

CONTINI, E.; MOTA, M. M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R. A.; SILVA, A. F.; SILVA, D. D.; MACHADO, J. R. A.; COTA, L. V.; COSTA, R. V.; MENDES, S. M. **Milho: caracterização e desafios tecnológicos. Brasília: Embrapa.**(Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2), 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195075/1/Milho-caracterizacao.pdf>. Acesso em: 05jun. 2020

COUTINHO, T. Bacterial leaf streak of maize: Study on host specificity and cultivar susceptible. 1988. **Tese doutorado** – University of Natal, Pietermaritzburg, 1988.

CRUZ, J.C.; MAGALHÃES, P.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; MOREIRA, J. A.A. **Milho: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Ed. Embrapa Informação Tecnológica – Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2011

DERAL. **Safra de verão no Paraná. Governo do Estado do Paraná.** Editora Agricultura. Disponível em: <http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=110232&tit=Safra-de-verao->

no-Parana-deve-chegar-a-242-milhoes-de-toneladas. Acesso em 20 mar. 2021

DEZORDI, C. Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). 2006. **Tese de Doutorado**. USP. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11135/tde-10082006-163250/en.php>

DUARTE, J. de O.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. Análise de custos de produção de milho transgênico x não transgênico, **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas – MG, v.1, p. 1-24, dez. 2005.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de Milho. **Guaíba: Agropecuária**, v. 18, p. 360, 2000.

FEET, W. F. Survival of *Pseudomonas glycinea* and *Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis* in leaf debris and soybean seed in Brazil. **Plant Dis. Rep.**, v. 63, n. 1, p. 79-83, 1979

FERREIRA, P.S.F.; TEBALDI, N.D. Métodos de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em maracujazeiro e biofertilizantes na inibição do crescimento bacteriano in vitro. **Summa phytopathol.** vol.45 no.2 Botucatu Apr./June 2019.

FIESP. **Safra Mundial de Milho 2019/20 - 1o Levantamento do USDA**. Disponível em: <https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/attachment/file-20190516191800-boletimmilhomaio2019/>. Acesso em: 02 abr. 2020

FORSTER, R. L.; MIHUTA-GRIMM, L.; SCHAAD, N.W. 1986. Black joff of wheat and cevada. **University of Idaho**, Série de informações atuais n° 784 , p. 2. 1986.

GENT, D. H.; LANG, J. M.; SCHWARTZ, H. F. et al. Epiphytic Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 558-564, jun. 2005.

GOTO, M. Fundamentals of bacterial plant pathology. **Academic Press**. San Diego, 341p 1992.

GOULART, A. C. P. **Fungos em sementes de sojas: Detecção, Importância e Controle**. **EMBRAPA**, 2ed Brasília – DF: Embrapa , 2018.

GRAHAM, JH.; MCGUIRE, RG.; MILLER, JW. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* em restos de plantas cítricas e solo na Flórida e na Argentina. **Plant Disease**, v. 71, n. 12, pág. 1094-1098, 1987.

GROTH, D. E.; BRAUN, E. J. Survival, seed transmission, and epiphytic development of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in the north-central United States. **Plant Disease**, St. Paul, v.73, n.4, p.326-330, 1989.

GUTH, G. A. Milho. In: CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento Agropecuário. **Perspectivas para a Agropecuária**. Volume 6 – Safra 2018-19. 104. 2018 Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos> .

HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Rev Científica de Medicina Veterinária**, n.26, v. 14, n. 26. jan.

2016.

HIRANO, SS.; UPPER, CD. Ecologia e epidemiologia de patógenos bacterianos foliares de plantas. **Revisão anual de fitopatologia**, v.21, p. 243-270, 1983.

JACKSON-ZIEMS, T.; KORUS, KA.; ADESEMOYE, T.; VAN METER, J. Bacterial Leaf Streak of Corn Confirmed in Nebraska, Other Corn Belt States 26 de agosto de 2016. **CropWatch** Disponível em: <http://cropwatch.unl.edu/2016/bacterial-leaf-streak-corn-confirmed-nebraska>. Acesso em: 04 abr. 2020

JARDINE, D. J.; CLAFIN, L. E. **Compendium of corn diseases**. 4th. ed. St. Paul: Scientific Society, 2016.

KARAMURA, G.; SMITH, J.; STUDHOLME, D.; KUBIRIBA, J.; KARAMURA, E. Comparative pathogenicity studies of the *Xanthomonas vasicola* species on maize, sugar cane and banana. **African Journal of Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 385-400, 2015.

KIRALY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLIMOSY, F.; VÖROS, J. Methods in Plant Pathology. Budapest, 1970. 509 p. In KIRALY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLIMOSY, F.; VÖROS, J. **Methods in Plant Pathology**. Budapest, 1970. 509 p.

KOBAYASTI, L. Inoculação, transmissão e detecção por BIO-PCR de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. **Tese de Dissertação**. Universidade Federal de Lavras UFLA, 2012. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/632/1/TESE%20Inocula%C3%A7%C3%A3o%20transmiss%C3%A3o%20e%20detec%C3%A7%C3%A3o%20por%20Bio-PCR%20de%20Xanthomonas%20axonopodis%20pv.%20phaseoli%20em%20sementes%20de%20feij%C3%A3o.pdf>

LANG, J. M.; DUCHARME, E.; CABALLERO, J. I.; LUNA, E.; HARTMAN, T.; ORTIZ-CASTRO, M.; KORUS, K.; RASCOE, J.; JACKSON-ZIEMS, T. A.; BROEDERS, K.; LEACH, J. E. Detection and characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. causing bacterial leaf streak of corn in the United States. **APS Publications**, v. 107, n. 11, pág. 1312-1321, 2017.

LEBEN, C. How plant pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, v. 65, p. 633-7, 1981.

LEITE JR, R. P.; CUSTÓDIO, A. A. P.; MADALOSSO, T.; ROBAINA, R. R.; DUIN, I.M.; SUGAHARA, V. H. **Estria Bacteriana do Milho no Paraná, IAPAR**, 2018. Disponível em: http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/IP160-Estria_Bacteriana.pdf. Acesso em: 02 abr.2020

LIVIENS, B.; THOMMA, B. P. H. J. Desenvolvimentos recentes em matrizes de detecção de patógenos: implicações para patógenos de plantas fúngicas e uso na prática. **APS Publications**, Holanda Vol. 95, No. 12, 2005.

LOPES, L. P.; ALVES, P. F. R.; ZANDONÁ, C.; NUNES, M. P.; MEHT, Y. R. Meio semi-seletivo para detectar *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro e sua erradicação através do tratamento de sementes com o fungicida tolylfluanid. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 3, p. 287-288, mai. 2008.

LOUWS, F.; RADEMAKER J.L.W.; BRUIJN F.J. The three Ds of PCR – Based genomic

analysis of phyto-bacteria. Diversity Detection na Disease Diagnosis. *Ann Rev Phytopatol.*, v.37 p. 81-125, 1999

MAPA, **Manual de Análise Sanitária de Sementes**, ed.1 Brasília – DF: MAPA, 2009.

MARCUZZO, L. L. Aspectos epidemiológicos de sobrevivência e de ambiente no gênero *Xanthomonas*. **ÁGORA**. Rev.de divulgação científica, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2009.

MARINGONI, A. C.; TORRES, J. P. Métodos de inoculação, estádios de desenvolvimento fenológico da planta e reação de cultivares de feijoeiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 23, n. 1, p. 124-129, 1999

MATTOS, A.P.; GABRIEL, L.C.; ANGELOTTI, P.; RISSATO, B.B.; MACHADO, B.R.; SCHAW-ESTRADA, K.R.F. Métodos de inoculação de *Xanthomonas gardneri* em micro-tomateiro. *In: XI EPCC – ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTIFICA. XI EPCC anais eletrônicos*. Maringá – PR, UNICESUMAR, 2019 P. Disponível em: <http://rdu.unicesumar.edu.br/bitstream/123456789/3597/1/AMANDA%20DO%20PRADO%20MATTOS.pdf>

MEGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PALVA, E. **Fisiologia do milho**. 2002. Disponível em: <http://docsagencia.cnptia.embrapa.br/milho/circul22.pdf>. Acesso em: 02 abr.2020

MEHTA, Y. R.; BOMFETE, C.; BOLOGNINI, V. Um meio de ágar semi-seletivo para detectar a presença de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em caroço de algodão naturalmente infectado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, vol.30 no.5 set./out. 2005.

MENZIES, J.D. Sobrevivência de patógenos microbianos de plantas no solo. **The Botanical Review**, v. 29, n. 1, p.79-122, 1963.

MIRANDA, T. D. Otimização da PCR para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videiras assintomáticas. **Monografia** (Licenciatura em Ciências Biológicas)—Consórcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília, Universidade Estadual de Goiás, Brasília, 2011. Disponível em: <https://bdm.unb.br/handle/10483/1835>

MOTA, R. P. D. Agressividade, caracterização molecular de isolados de *Pantoea ananatis* e nanoparticulas no controle da bactéria na cultura do milho. 2019. 56f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – **Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia – MG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.4>

MULLIS, K. B.; FALOONA, A. F. Especificidade do DNA *in vitro* por meio de uma ação em cadeia catalisada por polimerase. **Métodos em enzimologia**, New York, v. 115, n. 1, p. 335-349,1987.

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 301-307 2004.

NAUE, C. R. Tratamento de bacelos, sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv.*viticola* em tesouras de raleio, desinfestação dessa ferramenta e de água utilizada na produção de mudas de videira. **Dissertação Doutorado**. Universidade Federal de Ribeirão Preto - UFRP,

2013 Disponível em:
<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/bitstream/tede2/6488/2/Carine%20Rosa%20Naue.pdf>

OLIVEIRA, M. I. S. Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção simultânea de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Fusarium solani* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. 78 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015. Disponível em:
<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/8762/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Maythsulene%20In%C3%A1cio%20de%20Sousa%20Oliveira%20-%202015.pdf>

ORTIZ-CASTRO, M. C. Understanding the disease ecology of the corn bacterial leaf streak pathogen *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. **Colorado State University**. Colorado State University (Tese de Doutorado). Fort Collins, Colorado, 2019. Disponível em:
https://mountainscholar.org/bitstream/handle/10217/197391/OrtizCastro_colostate_0053N_15620.pdf?sequence=1&isAllowed=y

PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. V. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1317-1320, 2006.

PEREIRA, O. A. P.; CARVALHO, R. V.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho. In: CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas, Agronômica Ceres São Paulo v 2, 2005

PINTO, N. F. J. A.; SANTOS, M. A.; WRUCK, D. S. M., Principais doenças da cultura do milho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 233, p. 82-94, jul./ago. 2006

PLAZAS, M. C.; DE ROSSI, R. L.; BRÜCHER, E.; GUERRA, F. A.; VILARÓ, M.; GUERRA, G. D.; BRODERS, K. 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.; 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**, Ontario, v. 12, p. 183-186, 1990.

ROMEIRO, R. S. Fundamentos de Bacteriologia de Plantas. Viçosa, **Imprensa Universitária**, UFV, 1988.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-direct ed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science, Toyohashi**, v. 239 p. 487-491. jan. 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2448875/>

SCHAAD, N. W.; FORSTER R. L. A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. **Phytopathology**. v. 75, n.3 p. 260 – 263, 1985

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

SILVA da, A; SANTOS, dos I; BALBINOT, A.L; MATEI, G; OLIVEIRA, P.H. Reação de genótipos de feijão ao crestamento bacteriano comum, avaliado por dois métodos de

inoculação. **Ciênc. agrotec.** Edição Especial, Lavras, v. 33, p. 2019-2024, jan. 2009

SILVA, A. M. F.; MENEZES, E. F.; SOUZA, E. B. S.; MELO, N. F.; MARIANO, R. L. R. Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura** v. 34, n. 3, p. 757-765, 2012.

SILVA, J. C., Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no solo, no filoplano e na rizosfera de plantas daninhas. Botucatu, SP., 62 f. **Dissertação** (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/136026>

SOARES, J. Desenvolvimento de meio semi-seletivo para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro. **Dissertação** (mestrado) f.57 Universidade de Passo Fundo - UPF, Passo Fundo, 2006. Disponível em: <http://tede.upf.br/jspui/bitstream/tede/561/1/2006JucenaraSoares.pdf>

SOLOGUREN, L. Demanda mundial cresce e Brasil tem espaço para expandir produção. **Visão agrícola**, v. 13, n. 1, p. 8-13, dez. 2015.

SOUZA, L. T.; PEREIRA, J. A. R.; SOUZA, T. T. Avaliação da produtividade de milho e controle de doenças foliares. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v.7 n.3 2015.

SRIVASTAVA, S. S. L.; BAIS, B.S. Survival and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* causing leaf pustules of soybean. **Indian Journal of Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 22-23, 1987.

STULBERG, M.; SANTILLANA, G.; STUDHOLME, D.; KASIBORSKI, B.; ORTIZ-CASTRO, M.; BROEDERS, K.; ARIAS, S.; BLOCK, C.; MUNKVOLD, G. P.; RASCOE, J. Genomics-informed molecular detection of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* strains causing severe bacterial leaf streak of corn. **APS Publications**, v. 110, n.6 , p. 1-24, jan. 2020.

TEBALDI, N. D.; PANIZZI, R. C.; SADER, R. Detecção, transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolis. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 3, p. 290-293, 2007.

THEODORO, G. D. F., CORREIA, H. D. C., & CHUMPATI, A. A. Avaliação da transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* via semente-algodoeiro em condições de campo, no cerrado sul-mato-grossense. **Biosci. Jornal**. Uberlândia, v. 27, n. 5, p. 701-705, set/out. 2011

TORES, J. P.; SILVA JR., T. A. F.; MARINGONI, A. C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathologica** vol. 35 n. 2 Botucatu, Apr./June 2009

TOUSSAINT, V; MORRIS, C.E.; CARISSE, O. Um novo meio semisseletivo para *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, o agente causal da mancha bacteriana da folha da alface. **APS Publications**. v. 85, n. 2, p. 131-136, fev. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.2.131>

TROJAN, D. G. Manejo de doenças na cultura do milho; óleos essenciais, fungicidas e híbridos. 2016. 236 f. **Tese** (Doutorado em Agricultura) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa - PR 2016. Disponível em: <https://tede2.uepg.br/jspui/bitstream/prefix/2306/1/DAIANE%20GARABELI%20TROJAN.p>

df

TUMELERO, A. I. Detecção, quantificação e transmissão de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodão. 2012. 114 f. **Tese** (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012. Disponível em: <http://tede.upf.br/jspui/handle/tede/420>

USDA-NASS, 2018. Crop production summary. In: **United States Department of Agriculture USDA**, ed. National Agricultural Statistics. Disponível em: <http://www.nass.usda.gov>. acesso em: 02 abril. 2020

VIOLATTI, M. R.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica** v. 42, n. 3, p. 268-270, jul-set. 2016.

WALLEN, V. R.; SUTTON, M. D. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh. on field bean in Ontario. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 43, p. 437-46, 1965.

WANG, Z. K.; COMSTOCK, J. C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N. W. Comparison of PCR, BIO-PCR, ELISA and isolation on semi selective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 245-252, 1999.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 21, p. 153- 177, 1988