



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - ICIAG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

RAYANE LOUISE CANDIDA DINIZ

DETECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* EM SEMENTES DE
CANOLA TRATADAS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA COLEÇÃO DE
ISOLADOS

Uberlândia

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - ICIAG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

RAYANE LOUISE CANDIDA DINIZ

DETECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* EM SEMENTES DE
CANOLA TRATADAS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA COLEÇÃO DE
ISOLADOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração
Produção Vegetal para obtenção do título de “Mestre”

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nilvanira Donizete Tebaldi

Uberlândia

2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

D585
2021
Diniz, Rayane Louise Candida, 1991-
DETECÇÃO DE Xanthomonas campestris pv. campestris EM
SEMENTES DE CANOLA TRATADAS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE
UMA COLEÇÃO DE ISOLADOS [recurso eletrônico] / Rayane
Louise Candida Diniz. - 2021.

Orientadora: Nilvanira Donizete Tebaldi.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Agronomia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.485>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Agronomia. I. Tebaldi, Nilvanira Donizete, 1970-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agronomia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 012/2021, PPGAGRO				
Data:	Vinte e cinco de agosto de dois mil e vinte e um	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	12:05
Matrícula do Discente:	11912AGR020				
Nome do Discente:	Rayane Louise Candida Diniz				
Título do Trabalho:	DETECÇÃO DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> EM SEMENTES DE CANOLA TRATADAS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA COLEÇÃO DE ISOLADOS				
Área de concentração:	Produção Vegetal				
Linha de pesquisa:	Controle e Manejo Integrado de Doenças				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, assim composta: Professores Doutores: Flavia Andrea Nery Silva - UFU; Joana Magalhães Godinho Nunes Vicente - University of Warwick e FERA Science; Alessandra Keiko Nakasone - EMBRAPA Amazônia Oriental; Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dra.: Nilvanira Donizete Tebaldi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Nilvanira Donizete Tebaldi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2021, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Andrea Nery Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2021, às 12:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joana Magalhaes Godinho Nunes Vicente, Usuário Externo**, em 25/08/2021, às 12:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Keiko Nakasone, Usuário Externo**, em 25/08/2021, às 14:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2963844** e o código CRC **53E59A2E**.

RAYANE LOUISE CANDIDA DINIZ

DETECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* EM SEMENTES DE
CANOLA TRATADAS E VARIABILIDADE GENÉTICA DE UMA COLEÇÃO DE
ISOLADOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Agronomia – Mestrado, área de concentração
em Produção Vegetal para obtenção do título de Mestre.

Uberlândia – MG, 25 agosto de 2021.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi (UFU)
(Orientadora)

Prof^ª. Dra. Joana Magalhaes Godinho Nunes Vicente (University of Warwick)

Dra. Alessandra Keiko Nakasone (Embrapa, Amazônia Oriental)

Prof^ª. Dra. Flávia Andrea Nery Silva (UFU)

A Deus.
Aos meus pais, Sirley (*in memoriam*) e Antônio.
Aos familiares e amigos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a oportunidade do recomeço.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante esse período.

Ao Dr. Gilberto Omar Tomm por colaborar com a doação de sementes de canola.

À Dra. Joana Magalhaes Godinho Nunes Vicente, Dra. Alessandra Keiko Nakasone, Dra. Flávia Andrea Nery Silva, pela gentileza e disponibilidade em compor minha banca de defesa de dissertação.

À minha orientadora Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi por toda a paciência, apoio e ensinamentos.

À técnica do Laboratório Dra. Lara Caroline Borges Moreira Mota pelo auxílio, pelas sugestões, ensinamentos e principalmente pela amizade.

Aos amigos, Alicionon Caetano, Gislaine Nascimento e Morgana Mamede, pela colaboração, companheirismo, ensinamentos e ajuda fundamental para execução do trabalho.

Ao meu pai e irmão por me incentivarem sempre a continuar rumo ao aprimoramento acadêmico.

Ao Lucas pelo apoio e ajuda em todas as etapas de realização desse trabalho.

À Manuela por tornar meus dias mais alegres.

A todos que estiveram presentes e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Caracterização cultural, bioquímica e molecular de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	33
Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos fragmentos gerados através de BOX-PCR a partir do DNA de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	36
Figura 2 - Agrupamento pelo método de UPGMA de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> de acordo com o índice de dissimilaridade obtido pelo primer BOX.....	37
Figura 3 - Agrupamento pelo método de UPGMA de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> de acordo com o índice de dissimilaridade obtido pelos primers ERIC1R e ERIC2	38
Figura 4 - Agrupamento pelo método de UPGMA de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> de acordo com o índice de dissimilaridade obtido por BOX-PCR e ERIC-PCR	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> provenientes de diferentes hospedeiros e locais, pertencentes à coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, da Universidade Federal de Uberlândia	23
Tabela 2- Diâmetro (mm) de colônias de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em diferentes meios de cultura, sem e com adição de ciclohexamida	27
Tabela 3- Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> , em diferentes meios de cultura, em unidades formadoras de colônia.....	28
Tabela 4- Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em diferentes lotes de sementes inteira e no extrato de sementes de canola, previamente tratadas com Thiram, em três meios de cultura	29

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT	II
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 A cultura da canola	15
2.2 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> , agente causal da podridão negra.....	16
2.3 Detecção de bactérias em meios de cultura semisseletivos	18
2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	19
2.5 Variabilidade genética baseada em rep-PCR.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Preparo da suspensão bacteriana.....	21
3.2 Meios de cultura para detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	21
3.3 Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em sementes inteiras e em extratos de sementes de canola previamente tratadas	22
3.4 Isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	22
3.4.1 Caracterização cultural, bioquímica e patogenicidade dos isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	24
3.4.2 Identificação de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> por PCR com primers específicos.....	24
3.4.3 Variabilidade molecular de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> pelos primers BOX e ERIC.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Meios de cultura para detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	26
4.2 Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em sementes de canola previamente tratadas	28
4.3 Caracterização cultural, bioquímica e molecular de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	31
4.4 Variabilidade genética de isolados de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>Campestres</i>	34
5 CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICE - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	52

RESUMO

DINIZ, R. L. C. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em sementes de canola tratadas e variabilidade genética de uma coleção de isolados 2021.** 53 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

A canola (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) é uma oleaginosa desenvolvida no Canadá a partir do melhoramento genético de plantas de colza, pode ser utilizada na produção de óleo comestível e biodiesel. A podridão negra causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) é uma das doenças mais destrutivas nesta cultura causando perdas na produção e produtividade. A bactéria pode sobreviver nas sementes e o uso de sementes sadias é recomendado no manejo da doença. Os objetivos do trabalho foram avaliar a eficiência de meios de cultura semisseletivos para a detecção de Xcc em sementes de canola tratadas e caracterizar cultural, bioquímica e molecularmente 34 isolados de Xcc de diversas brassicas incluindo cultivares de *B. oleracea* e *B. napus*. Para a detecção da bactéria nas sementes foram avaliados as sementes inteiras e o extrato de sementes, de seis lotes de sementes de canola, nos meios de cultura 523, NA, NSCAA e YDC, sem e com adição de ciclohexamida com três repetições cada, avaliando-se o diâmetro das colônias e número de colônias em UFC mL⁻¹. Os 34 isolados de Xcc foram caracterizados bioquímica, fisiológica e molecularmente, usando os *primers* específicos XCF/XCR e os universais (BOX, ERIC). Os meios de cultura 523, NA e NSCAA com a adição de ciclohexamida e a desinfestação das sementes quimicamente tratadas foram eficientes para a detecção da bactéria no extrato das sementes. Os isolados foram caracterizados cultural, bioquímica e molecularmente sendo 33 identificados como Xcc. Os isolados apresentaram variabilidade genética por BOX e ERIC-PCR, não sendo geralmente possível agrupá-los de acordo com a região geográfica e ou hospedeiro de origem.

Palavras chaves: *Brassica napus* L. var. *oleifera*. Caracterização bioquímica. PCR. Podridão negra.

ABSTRACT

DINIZ, R. L. C. **Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in treated canola seeds and genetic variability of a collection of isolates** 2021. 53 f. Dissertation (Master in Agronomy) – Institute of Agricultural Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais.

Canola (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) is an oilseed developed in Canada from the genetic improvement of rapeseed plants, which can be used in the production of edible oil and biodiesel. Black rot caused by the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) is one of the most destructive diseases in canola, occasioning losses in production and productivity. The bacteria can survive in the seeds and the use of healthy seeds is recommended in the management of disease. The objectives of this study were to evaluate and to compare the efficiency of semi-selective culture media for the detection of Xcc; to detect the presence of the bacteria in seed-treated canolas and to culturally, biochemically and molecularly characterize 34 isolates of Xcc from various brassicas including cultivars of *B. oleracea* and *B. napus*. For evaluation of the culture media an Xcc isolate was used in four media 523, NA, NSCAA and YDC, with and without cycloheximide fungicide with three replications in each; the efficiency of each medium was assessed from the diameter of the colonies and counting the number of colonies in CFU mL⁻¹. The 34 Xcc isolates were characterized biochemically, physiologically and molecularly, using specific primers XCF/XCR and universal (BOX, ERIC). The 523, NA and NSCAA culture media with the addition of cyclohexamide were efficient for the detection of the bacteria in the seed extract. The isolates were culturally, biochemically and molecularly characterized and 33 were identified as Xcc. The isolates showed genetic variability by BOX and ERIC-PCR, and it was not possible to group them according to geographic region and or host of origin.

Keywords: Biochemical test. Black rot. *Brassica napus*. Molecular analysis.

1 INTRODUÇÃO

A canola foi desenvolvida por melhoristas canadenses a partir de plantas de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) e é uma cultura relativamente nova no Brasil e possui grande potencial de expansão no país, devido a facilidade de adaptação em equipamentos e práticas culturais já empregadas em outras culturas e a rentabilidade econômica (TOMM, 2007). Seu cultivo foi recentemente introduzido no Triângulo Mineiro e sua adaptação na região do Cerrado é chamada de tropicalização, isso a torna uma opção rentável para o cultivo de segunda safra (PEGORARO, 2016).

A canola é a terceira oleaginosa mais cultivada no mundo, no Brasil, graças aos incentivos do programa nacional de uso e produção de biodiesel, houve expansão das áreas plantadas, principalmente no estado do Paraná e Rio Grande do Sul, com estimativa de 38,3 mil hectares para a safra de 2021, um aumento de 10% em relação ao ano anterior (CONAB, 2021). O cultivo de grãos da canola oferece diversos usos como produção de biodiesel, consumo humano e nutrição animal, por ser um suplemento proteico de ótima qualidade (JACOB-JUNIOR, et al., 2012).

Dentre as doenças que afetam a cultura da canola, a podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) é uma das mais importantes, pois afeta as safras das Brassicas em todo o mundo (VILLETH et al., 2009). No Brasil, Xcc é um dos patógenos bacterianos com o maior número de hospedeiros e ampla distribuição territorial (AMARAL, 2012). A bactéria sobrevive e dissemina-se principalmente através das sementes, podendo inclusive ser introduzida em novas áreas de cultivo, constituindo em importante fonte de inóculo primário (BILA et al., 2012). Diante disso, é importante a utilização de sementes certificadas e sadias, já que o controle químico é ineficaz (QUEZADO-DUVAL et al., 2021).

A disseminação bem-sucedida do patógeno ao redor do mundo pode ser associada ao comércio de longa distância frequente de sementes contaminadas (LEMA et al., 2012). No Brasil, as sementes de canola utilizadas para plantio são provenientes de outros países e frequentemente tratadas quimicamente com fungicidas. Porém, na maioria das vezes os fungicidas não são eficientes no controle da Xcc, por isso, torna-se necessário assegurar a qualidade das sementes a serem introduzidas e que estejam livres dessa bactéria.

Para a detecção de Xcc em sementes várias técnicas podem ser utilizadas como os meios de cultura semisseletivos NSCAA, BSCAA, FS, mCS20ABN (AMARAL, 2012; BATISTA, 2020; ISTA, 2014; TEBALDI et al., 2007). Os meios de cultura devem apresentar

sensibilidade, especificidade (GITAITIS; WALCOTT, 2007), confiabilidade, facilidade de preparo, baixo custo e a rapidez nos resultados. A detecção de patógenos associados às sementes é fator essencial para a adoção de práticas de controle, evitando assim a introdução do inóculo em áreas livres da doença (BARBOSA, 2007).

Além da detecção da bactéria nas sementes é importante avaliar a variabilidade genética de isolados de Xcc, para desenvolver estratégias mais eficientes de controle da doença. Diferentes estudos encontraram alta variabilidade genética entre isolados de Xcc, oriundos de vários locais e provenientes de diversos hospedeiros (BATISTA, 2020; MELO, 2016; SILVA, 2006). A variabilidade genética dos isolados pode estar associada ao surgimento de novas espécies, patovares ou raças antes não associados à cultura (POPOVIC et al., 2019). A variabilidade genética dos isolados pode ser avaliada por métodos moleculares, como a análise de sequências multilocus (MLSA) (FARGIER et al., 2011), pelo sequenciamento completo do genoma (Whole Genome Sequencing ou WGS) (LEE et al., 2020) e ainda através da rep-PCR, que corresponde coletivamente aos protocolos de REP, ERIC e BOX-PCR. Cada uma dessas técnicas refere-se a famílias de sequências de DNA repetitivas e altamente conservadas que estão dispersas no genoma de diversas espécies bacterianas (SINGH et al., 2016).

O controle da podridão negra é difícil e geralmente realizado através do plantio com sementes livres da bactéria, eliminação de hospedeiros alternativos e restos culturais. A existência da alta variabilidade genética de Xcc dificulta a obtenção de genótipos resistentes à podridão negra, pois requer um conhecimento aprofundado sobre as características culturais, bioquímicas e moleculares desse patógeno.

Devido à recente introdução da canola no Triângulo Mineiro e poucas informações sobre a variabilidade genética de Xcc e a necessidade de se detectar a bactéria em sementes de canola, mesmo que estas estejam tratadas quimicamente, a fim de evitar a introdução de possíveis novas raças do patógeno, em novas áreas de cultivo, este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar e comparar a eficiência de meios de cultura semisseletivos para a detecção de Xcc; (ii) detectar a presença de Xcc em sementes de canola previamente tratadas; (iii) caracterizar cultural, bioquímica e molecularmente uma coleção de 34 isolados provenientes de culturas de *B. oleracea* e *B. napus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da canola

Atualmente no Brasil, se cultiva apenas canola de primavera pertencente à espécie *Brassica napus* L. var. *oleifera*, que foi desenvolvida através do melhoramento genético convencional da colza (*B. rapa* e *B. napus*), uma espécie oleaginosa pertencente à família Brassicaceae (crucíferas). Conforme descrito pelo Triângulo de U, *Brassica napus* (AACC), *Brassica juncea* (AABB) e *Brassica carinata* (BBCC) se originaram da hibridização entre duas das três espécies diplóides ancestrais, *Brassica rapa* (AA), *Brassica oleracea* (CC) e *Brassica nigra* (BB). Tornando o híbrido *B. napus* uma excelente cultivar comercial (LU et al., 2019).

A denominação canola é a abreviação de ‘Canadian Oil Low Acid’, termo utilizado para designar as cultivares (*B. napus*) que possuem teor de ácido erúico inferior a 2% no óleo e concentração de glucosinolatos menores que 30 µm por grama de matéria seca dos grãos (STEFANSSON; KONDRÁ, 1975). A canola é uma planta herbácea, anual, de clima temperado e seu ciclo varia de 107 a 160 dias dependendo de cada cultivar. Os grãos de canola atualmente produzidos no Brasil possuem em torno de 24 a 27% de proteína e, em média, 38% de óleo (TOMM, 2014).

O Canadá, União Europeia e China são os maiores produtores de grãos de canola, com participação de 28,0%, 27,6% e 18,3%, respectivamente, de toda a produção dessa oleaginosa no mundo em 2018/19 (Estados Unidos, 2020). A canola é a principal fonte para obtenção de biodiesel na Europa, onde 70% de sua produção são destinadas a este fim (TOMM, 2014).

A cultura se destaca como a terceira oleaginosa mais cultivada no mundo, sendo uma das principais fontes de óleo vegetal comestível e energia renovável, através da fabricação de biodiesel (TOMM, 2014). No Brasil a previsão para 2021 é de 48 mil toneladas, podendo atingir a melhor produção desde 2010. Os Estados do Rio Grande do Sul e Paraná são os principais produtores e também os responsáveis por essa produção (CONAB, 2021). Recentemente a cultura foi introduzido a região do Cerrado brasileiro (TOMM et al., 2004), e na Mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (NERY-SILVA, 2014). A adaptação da cultura nessa região é chamada de tropicalização (TOMM; RAPOSO, 2008), o que torna a canola uma opção rentável para o cultivo em segunda safra.

2.2 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra

A podridão negra, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc), descrita pela primeira vez por Garman em 1890, pertence à família *Lysobacteraceae* (syn: *Xanthomonadaceae*), ordem Xanthomonadales, classe Gammaproteobacteria, filo Proteobacteria, domínio Bacteria (GARRITY et al., 2004). Esse patógeno está presente em diversos países do mundo, e possui uma ampla gama de hospedeiros principalmente brássicas, sobrevive por até três anos em sementes (GRIESBACH et al., 2003), restos culturais e no solo, o que facilita sua disseminação e introdução em áreas livres do patógeno (VILLETH et al., 2009).

A bactéria Xcc é Gram-negativa, tem a forma de um bastonete reto, se movimenta através de um único flagelo polar. Produz colônias amarelas brilhantes, convexas, mucoide, em meio de cultura YDC, cresce a 35 °C, hidrolisa amido e esculina, produz ácido a partir de arabinose, alcaliniza leite de litmus. É aeróbica e não utiliza asparagina como fonte de carbono e nitrogênio (KADO, 2010; LUGO et al., 2013). A cor das colônias geralmente é amarela devido à presença do pigmento denominado xanthomonadina, presente no gênero *Xanthomonas* (HE et al., 2011).

O patógeno possui uma faixa ampla para desenvolvimento (5-36°C), tendo crescimento ótimo entre 28-30°C, com essas condições e presença de água de irrigação, de chuva ou de condensação, torna o ambiente favorável para a penetração da bactéria (AMORIM et al., 2016). O surgimento dos sintomas de podridão negra ocorre de 10 a 14 dias após a penetração do patógeno, que se dá através de aberturas naturais (estômatos e hidatódios) ou por ferimentos provocados a superfície da parte aérea (AMORIM et al., 2016). Sendo os hidatódios a principal porta de entrada para o patógeno, o sintoma característico da doença é a mancha em forma de “V” a partir dos bordos da folha, com o vértice voltado para o centro da folha (MARINGONI, 2005).

O gênero *Xanthomonas* sofreu diversas modificações genéticas com o passar dos anos, o qual tem surgido reclassificações de espécies e de patovares. Em 1995, Vauterin et al. descreveu uma nova reclassificação de *X. campestris* contendo apenas patovares que infectam as brássicas (pvs. *aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *campestris*, *incanae* e *raphani*). Além das diferenças quanto à patogenicidade e hospedeiros, inúmeras espécies e patovares tem sido caracterizada por raças, no qual, já foram descritas nove raças de Xcc com base na resposta de diferentes isolados bacterianos em oito linhas diferenciais de Brassica (VICENTE et al. 2001; FARGIER e MANCEAU 2007; JENSEN et al. 2010). Recentemente, possíveis duas novas

raças (raça 10 e 11) foram identificados em Portugal (CRUZ et al. 2017). Entre as raças de Xcc, as raças 1, 4 e 6 são as predominantes mundialmente (VICENTE et al. 2001; SINGH et al. 2016).

A doença está presente em todas as regiões produtoras de brassicas no Brasil, causando prejuízos as culturas e redução da produtividade (SEABRA et al., 2013). Os sintomas da doença podem ser observados em qualquer estágio fenológico da planta infectada, sendo inicialmente notada uma mancha clorótica, que evolui se tornando uma lesão necrótica com bordos amarelados, sendo as nervuras um fator limitante para o crescimento da lesão (AMORIM et al., 2016). Devido à sua ação sistêmica, a Xcc consegue colonizar os feixes vasculares, causando o escurecimento das nervuras, quando não destrói rapidamente o hospedeiro, o patógeno consegue atingir as partes florais e através do xilema do pedicelo, atingir a estrutura das siliquis alcançando o funículo, onde pode permanecer por até três anos no interior da semente, ocasionalmente, a bactéria atinge também o seu tegumento (SILVA, 2006).

Em sementes recém germinadas é possível notar margens escuras nos cotilédones, que com o passar do tempo secam e morrem, assim as plântulas infectadas tornam-se cloróticas e necróticas, murcham e morrem (WILLIAMS, 2007). O uso de sementes contaminadas por fitobactérias, mesmo em baixas quantidades, pode resultar em graves epidemias e perdas no campo, principalmente em um ambiente favorável (KOENRAADT et al., 2017).

A sobrevivência e disseminação de Xcc acontece principalmente através de sementes, se alojando na sua superfície e/ou no seu interior. Pode ainda se estabelecer em restos culturais fibrosos de plantas doentes, em plantas daninhas e em plantas doentes remanescentes no campo, ou ainda na superfície de plantas hospedeiras, como epífita, sem entrar em contato com o interior do tecido da planta, podendo sobreviver entre alguns meses até dois anos (GRIESBACH et al., 2003), dependendo das condições climáticas. As sementes que apresentam contaminantes se tornam fonte de inóculo primário e veículo de disseminação do patógeno a longas distâncias, a curtas distâncias o patógeno pode ser disseminado, por respingos de água de chuva ou de irrigação, geralmente a direção dos ventos predominantes, e ainda durante os tratos culturais (AMORIM et al., 2016).

De acordo com Schaad et al. (1980) a presença de apenas três sementes contaminadas com Xcc em um lote de 10.000, seria o capaz de iniciar uma epidemia no campo. O patógeno pode ainda, causar infecção assintomática, o que torna inviável a diagnose visual. Para o controle efetivo da doença é necessário a rotação de cultura e o plantio de sementes saudáveis, livres da presença do patógeno, sendo necessário a realização de testes em laboratórios para a detecção desse fitopatógeno, assegurando assim a qualidade das sementes (GITAITIS;

WALCOTT, 2007). O sucesso de programas de quarentena e de certificações de sementes está ligado ao desenvolvimento de tecnologias que permitam a detecção de bactérias em sementes, dessa forma, é necessário métodos de detecção específicos, sensíveis, rápidos e de fácil execução (BALADANI, 2009).

Um dos problemas relacionados à veiculação de bactérias pelas sementes está na vulnerabilidade dos métodos de detecção e quantificação desses organismos, que diversas vezes exigem equipamentos sofisticados, técnicos especializados, entre outros, o que acaba tornando a técnica mais onerosa (STEILMANN et al., 2019). Por outro lado, os métodos microbiológicos que utilizam meios de cultura conseguem viabilizar crescimento e quantificação da bactéria alvo, requerendo confirmação da identidade pelo teste de patogenicidade (FATMI et al., 2017).

2.3 Detecção de bactérias em meios de cultura semisseletivos

Vários métodos têm sido elaborados e recomendados para a detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes como, o plaqueamento em meios de cultura semisseletivos (TUMELERO et al., 2013), técnicas sorológicas, como ELISA (BILA et al., 2013) e imunofluorescência (TEBALDI et al., 2010) e técnicas moleculares como a PCR (INOUE et al., 2021).

Os meios semisseletivos constituem uma ferramenta importante para a detecção de um determinado patógeno, uma vez que os principais critérios para a avaliação do meio são a seletividade e a eficiência na detecção de patógenos, com alta supressividade para microrganismos contaminantes e baixa repressividade para bactérias fitopatogênicas que se deseja detectar e/ou quantificar (VIOLATTI; TEBALDI, 2016). Os meios de cultura para a detecção de bactérias em sementes devem apresentar alta sensibilidade, confiabilidade e rapidez nos resultados (MAMEDE; TEBALDI, 2020).

Entretanto, algumas vezes, os resultados são de difíceis interpretações, devido ao efeito da concentração de células e a intervenção de outros organismos presentes, ou à presença no extrato de substâncias capazes de inibir o crescimento da bactéria alvo. Apesar dessas desvantagens, os meios de cultura ainda são usados devido à sua simplicidade (TEBALDI et al., 2007). Meios de cultura semisseletivos, como o FS e mCS20ABN, são recomendados pela Associação Internacional de Teste de Sementes (ISTA) para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em sementes de brássicas, outros meios já foram descritos para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (SOARES,

2006), *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja (VIOLATTI; TEBALDI, 2016), *Pantoea ananatis* em sementes de milho (MAMEDE; TEBALDI, 2020).

2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Além da caracterização morfológica e bioquímica, várias técnicas moleculares têm sido utilizadas para detecção e caracterização de bactérias fitopatogênicas. Técnicas moleculares, baseadas na análise genômica, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), são rápidas, simples e mais sensíveis para a detecção de patógenos, quando comparadas às outras técnicas, pois são capazes de detectar pequenas quantidades do patógeno na amostra (SANKARAN et al., 2010), uma vez que amplificam uma parte específica do DNA do patógeno, através da utilização de *primers*. A combinação de meios semisseletivos com técnicas moleculares como a PCR tem se mostrado um método vantajoso e confiável para a detecção de espécies de *Xanthomonas* (LEE et al., 2009).

Em uma reação de PCR, é necessário conhecimento da sequência alvo do DNA que será amplificado, pois serão utilizados dois *primers* para definir de forma específica o fragmento a ser amplificado. Ou seja, são fornecidas sequências que farão com que se liguem as fitas opostas do DNA molde, bem nas extremidades da região a ser copiada. Os *primers* se ligam às suas sequências complementares na fita molde por pareamento de bases complementares, restringindo o fragmento de DNA que se deseja amplificar em uma reação com ciclos contínuos com a temperatura previamente definidos, na presença de bases nitrogenadas e da enzima Taq DNA polimerase (REECE et al., 2011).

O uso dos *primers* específicos XCF/XCR para *X. campestris* pv. *campestris* confirmaram a identidade dos isolados bacterianos (PARK et al., 2004) e foi capaz de detectar a bactéria em sementes, folhas e hastes de brássicas (BERG et al., 2005). Grimault et al. (2012) testaram 1.472 isolados bacterianos, por PCR com os *primers* específicos, com a identificação confiável e rápida de Xcc.

2.5 Variabilidade genética baseada em rep-PCR

Dentre as várias técnicas moleculares utilizadas em estudos da variabilidade genética, destaca-se a PCR baseada em elementos repetitivos (rep-PCR), sendo bastante utilizada para a

caracterização de isolados bacterianos e o estudo de padrões específicos obtidos a partir da amplificação de famílias de sequências de DNA repetitivos presentes nos genomas bacterianos (TSYGANKOVA et al., 2004). Essa técnica corresponde coletivamente aos protocolos REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR. As vantagens da rep-PCR sobre outros métodos de análise molecular incluem a capacidade de diferenciar espécies bacterianas intimamente relacionadas, além de ser um método de genotipagem altamente reprodutível, sendo simples, rápido, barato e confiável (STEPHENSON et al., 2009).

A técnica de ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) foi descrita inicialmente por Hulton et al., (1991) em regiões intergênicas dos cromossomos de enterobactérias. As sequências têm 126 pares de base (pb) de comprimento e estão restritas a regiões transcritas do genoma não se assemelham a nenhuma sequência de inserção já conhecida (HULTON et al., 1991). Para essa técnica são utilizados os *primers* ERIC1R e ERIC2 (LOUWS et al., 1994).

O BOX-PCR (BOX element) foi descrito pela primeira vez por Martin et al (1992), em que os autores descreveram um grupo de sequências de DNA altamente conservadas localizadas dentro de regiões intergênicas do cromossomo da bactéria *Streptococcus pneumoniae*. O genoma de *S. pneumoniae* contém cerca de 25 destes elementos BOX. De 5' a 3', os elementos BOX são compostos de três subunidades (boxA, boxB e boxC) que têm 59, 45 e 50 nucleotídeos de comprimento, respectivamente (MARTIN et al., 1992), dessa forma, para realizar tal análise utiliza-se o *primer* BOX A1R (LOUWS et al., 1994).

Essas técnicas têm sido utilizadas com sucesso em estudos de diversidade, bem como identificação e classificação de diversos isolados de Xcc (POPOVIC et al., 2019; ZACCARDELLI et al., 2008). Silva (2006) estudou a variabilidade fenotípica e genotípica de Xcc no Brasil por meio da análise metabólica (BiologTM) e eletroforese de campo pulsado, entre os 26 isolados estudados, quatro foram identificados como *X. campestris* pv. *raphani* (Xcr), sendo esse o possível primeiro relato de Xcr no Brasil. Melo (2016) encontrou alta variabilidade genética entre 159 isolados de Xcc, provenientes de quatro espécies de Brássicas oriundas do estado de Pernambuco. Batista (2020) observou alta variabilidade genética de Xcc, confirmando a presença de cinco raças do patógeno (raça 1, raça 3, raça 4, raça 6 e raça 9), entre 151 isolados bacterianos provenientes da couve flor, repolho, mostarda selvagem e brócolis espécies pertencentes ao gênero *Brassica* e um isolado de planta voluntária de tomate. No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre a variabilidade genética dos fitopatógenos, afim de aperfeiçoar os programas de melhoramento de plantas (RATHAUR et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e em casa de vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Campus Umuarama.

3.1 Preparo da suspensão bacteriana

Os isolados bacterianos utilizados pertencem à coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da UFU, eles foram recuperados e multiplicados em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24-48 horas a 28 °C.

As suspensões bacterianas foram preparadas em água filtrada esterilizada, ajustadas em espectrofotômetro ($OD_{550} = 0,5$), correspondendo a concentração aproximada de 1×10^9 UFC mL^{-1} .

3.2 Meios de cultura para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

O experimento foi realizado em esquema fatorial (4 meios de cultura x 2 ausência ou presença de ciclohexamida), com três repetições. A suspensão bacteriana foi realizada utilizando o isolado UFU F78 de Xcc, foi diluída em série (10^{-1} a 10^{-7}) e cultivada nos meios de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970), NA (SCHAAD et al., 2001), NSCAA (SCHAAD et al., 2001) e YDC (SCHAAD et al., 2001), com e sem adição do fungicida ciclohexamida 5 $\mu g mL^{-1}$. As placas foram incubadas em BOD a 28 °C por até cinco dias.

A eficácia de cada meio de cultura foi determinada a partir da quantificação do número de UFC mL^{-1} e diâmetro das colônias. Para a análise de normalidade dos dados os resultados obtidos em UFC mL^{-1} foram transformados em log x. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade pelo software R.

3.3 Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em sementes inteiras e em extratos de sementes de canola previamente tratadas

Para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* foram avaliados seis lotes de sementes de canola previamente tratadas com Thiram (70 g i.a /100 Kg de sementes), sendo cinco importados da Argentina, Hyola 76_A1, Hyola 76_A4, Hyola 571CL_A9, Hyola 433_A15, Hyola 433_A16 e um importado da Austrália, Hyola 43_A3. Foram utilizados apenas três meios de cultura semisseletivos, sendo eles o 523, NSCAA e YDC, com adição de ciclohexamida.

As sementes inteiras de canola com e sem desinfestação em hipoclorito de sódio a 1%, por 3 minutos, foram colocadas diretamente sobre os meios de cultura semisseletivos em placas de Petri. Foram avaliadas 200 sementes, com 8 repetições, de 25 sementes por uma placa de Petri. As placas foram incubadas a 28 °C por quatro dias e determinado a porcentagem de sementes com a presença da bactéria.

Para a detecção da bactéria em extrato de sementes, em erlenmeyer foram colocadas aproximadamente 1.000 sementes (= 3g), com e sem desinfestação e adicionados 6 mL de solução de NaCl 0,85% estéril e incubados em geladeira por 18 h. Os extratos das sementes foram diluídos em série e cultivados nos meios de culturas descritos anteriormente, com 3 repetições cada e incubados a 28 °C. Após quatro dias foi determinado o número de colônias por grama de sementes

Dez isolados bacterianos (UFU H125, H143, H145, H150, I23, I29, M6, M7, M8 e M9) obtidos na detecção em sementes foram caracterizados cultural, bioquímica e molecularmente, de acordo com a metodologia descrita abaixo.

3.4 Isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Os 34 isolados bacterianos de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Tabela 1), provenientes de diferentes hospedeiros, pertencentes à coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do ICIAG/UFU foram cultivados em meio de cultura 523 e incubados a 28 °C por 48 h.

TABELA 1. Isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* provenientes de folhas e de sementes de diferentes hospedeiros e locais. Uberlândia – MG, 2021.

Isolado	Hospedeiro	Planta	Local	Ano	Híbrido
UFU A4	Repolho	Folha	Uberlândia, MG	2009	
UFU A29	Couve	Folha	Uberlândia, MG	2009	
UFU B7	Repolho	Folha	Uberlândia, MG	2010	
UFU D12	Couve	Folha	Uberlândia, MG	2012	
UFU E28	Repolho	Folha	Uberlândia, MG	2013	
UFU E44	Brócolis	Folha	Valparaíso de Goiás, GO	2013	
UFU E47 (=E28)	Couve	Folha	Uberlândia, MG	2013	
UFU F34	Couve	Folha	Uberlândia, MG	2014	
UFU F57	Canola	Folha	Uberaba, MG	2014	Terola 10A40
UFU G89	Canola	Folha	Uberlândia, MG	2015	Hyola 570
UFU H51	Couve	Folha	Uberlândia, MG	2016	
UFU H62	Repolho	Folha	Uberlândia, MG	2016	
UFU H123	Acelga	Folha	Uberlândia, MG	2016	
UFU H124	Couve	Folha	Uberlândia, MG	2016	
UFU H148	Brócolis	Folha	Uberlândia, MG	2016	
UFU I43	Couve-flor	Folha	Uberlândia, MG	2017	
UFU F43	Canola	Semente	Mato Grosso	2014	Terola 10A40
UFU F63 ¹	Canola	Semente	Mato Grosso	2014	25A85
UFU F75 (=F63) ²	Canola	Semente	Mato Grosso	2014	25A85
UFU F77 (=F62) ³	Canola	Semente	Mato Grosso	2014	Terola 25A85
UFU F78 (=F62) ⁴	Canola	Semente	Mato Grosso	2014	Terola 25A85
UFU F81 (=F64) ⁵	Canola	Semente	Mato Grosso	2014	IBI OLA90
UFU G10	Canola	Semente	Uberaba, MG	2015	Terola 10A40
UFU G12	Canola	Semente	Serra do Salitre, MG	2015	Terola 10A40
UFU H125	Canola	Semente	Argentina	2016	Hyola 76 A_1
UFU H143 (=H127)	Canola	Semente	Austrália	2016	Hyola 43_A3
UFU H145 (=H129)	Canola	Semente	Argentina	2016	Hyola 76 A_4
UFU H150 (=H146)	Canola	Semente	Argentina	2016	Hyola 571 CL_A9
UFU I23	Canola	Semente	Argentina	2017	Hyola 433 A_16
UFU I29 (=I16)	Canola	Semente	Argentina	2017	Hyola 433 A_15

UFU M6 ⁶	Canola	Semente	Argentina	2021	Hyola 76 A_4
UFU M7 ⁶	Canola	Semente	Argentina	2021	Hyola 433 A_15
UFU M8 ⁶	Canola	Semente	Argentina	2021	Hyola 433 A_15
UFU M9 ⁶	Canola	Semente	Argentina	2021	Hyola 76 A_1

¹Isolado pouco virulento; ²Isolado colônia amarela escura, pouco virulento, ³Isolado com média virulência, ⁴Isolado colônia amarela clara, muito virulento, ⁵Isolado muito virulento; ⁶Isolados identificados com os *primers* específicos, não utilizados nas análises BOX e ERIC-PCR.

Fonte: A autora.

3.4.1 Caracterização cultural, bioquímica e patogenicidade dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Utilizando a chave de identificação proposta por Schaad et al. (2001), os isolados foram caracterizados culturalmente em meio de cultura 523 e colônias amarelas em meio YDC; bioquimicamente pelo metabolismo aeróbico ou anaeróbico no teste de oxidação e fermentação (O/F); utilização de asparagina como única fonte de carbono; reação de oxidase, catalase; crescimento à 37 °C, reação de hipersensibilidade em plantas de fumo e patogenicidade no hospedeiro.

A patogenicidade dos isolados foi avaliada pela inoculação da suspensão bacteriana por injeção em plantas saudáveis de Couve Manteiga cv. Geórgia (3 a 4 folhas), mantidas em casa de vegetação. As plantas foram mantidas em câmara úmida 24h antes e após a inoculação, observações diárias foram realizadas por até 14 dias para verificar o aparecimento dos sintomas (MIGUEL-WRUCK, et al., 2010).

3.4.2 Identificação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* por PCR com primers específicos

O DNA genômico bacteriano, de 27 isolados foi extraído utilizando o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) e quantificado (ng/μl) no NanoDrop (Thermo Scientific TM Nanodrop 2000/2000c Spectrophotometer).

Para os isolados UFU H143, H145, I29, M6, M7, M8 e M9 o DNA não foi extraído e suspensões bacterianas foram preparadas em 1 mL de água filtrada esterilizada, agitadas em Vortex, diluídas (aproximadamente 1×10^8 UFC mL⁻¹) e aquecidas em forno micro-ondas por

2 minutos.

Para a identificação da espécie de *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, o DNA dos 34 isolados bacterianos foram amplificados usando o par de *primers* específicos XCF (5'-CGA TTC GGC CAT GAA TGA CT-3') e XCR (5'-CTG TTG ATG GTG GTC TGC AA-3'), que amplifica um fragmento de aproximadamente 535 pb (PARK et al., 2004).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 12,5 µL, utilizando de 50 ng µL⁻¹ de DNA genômico (ou, 2 µL da suspensão bacteriana), 1X tampão de PCR 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 1,0 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP e 1,25 U de Taq DNA polimerase. A reação de amplificação foi realizada em termociclador ThermoHybaid: Omn-E com as seguintes condições: um ciclo para desnaturação do DNA a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 57 °C por 15 segundos e 72 °C por 30 segundos, e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corados com SYBR Safe, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

Para os isolados que não tiveram sua identidade confirmada pelos *primers* específicos XCF/XCR, foram utilizados os iniciadores específicos para *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*: Xcr_59F (5' -GCA AAA GTT AGT CGC ATC CGA CAA G- 3') e Xcr_59R (5' -CTC AAT TTT GTC CTG TGC ACT C- 3'), que amplifica um fragmento de 679 pb (RUBEL et al., 2019). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 12,5 µL, utilizando de 50 ng µL⁻¹ de DNA genômico (ou, 2 µL da suspensão bacteriana), 1X tampão de PCR 10X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP e 1,25 U de Taq DNA polimerase. A reação de amplificação foi realizada em termociclador ThermoHybaid: Omn-E com as seguintes condições: um ciclo para desnaturação do DNA a 94 °C por 5 minutos, 25 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 57 °C por 40 segundos e 72 °C por 45 segundos, e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corados com SYBR Safe, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

3.4.3 Variabilidade molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pelos *primers* BOX e ERIC

Para o estudo da divergência genética foram utilizados os *primers* BOX e ERIC. Os DNAs cromossômicos de cada isolado foram amplificados pela sequência repetitiva do *primer* BOX A1- R (5' – CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G – 3'), ERIC1-R (5' – ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C - 3') e ERIC2 (5' - AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G -

3') (LOUWS et al., 1994). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 12,5 μL , utilizando de 50 ng μL^{-1} de DNA genômico (ou, 2 μL da suspensão bacteriana), 1X tampão de PCR 10X, 3,0 mM de MgCl_2 , 1,0 μM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP e 1 U de Taq DNA polimerase. A reação de amplificação foi realizada em termociclador ThermoHybaid: Omn-E.

As amplificações para o *primer* BOX foram realizadas utilizando um ciclo para a desnaturação a 95 °C por 7 minutos, seguida por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 53 °C por 1 minuto e 65 °C durante 8 minutos, e extensão final a 65 °C por 15 minutos.

Para os *primers* ERIC as amplificações foram realizadas utilizando um ciclo para a desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 52 °C por 1 minuto e 65 °C durante 5 minutos, e extensão final a 65 °C por 15 minutos.

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em múltiplos géis de agarose a 1,0%, corados com SYBR Safe, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados. Para analisar o padrão de bandas formado nos géis, foi utilizado o marcador de peso molecular da KASVI de 1kb. A corrida de cada gel teve duração de 2h40min com voltagem e amperagem a 80.

Para os dendrogramas, os dados foram analisados considerando a presença e ausência das bandas. A matriz de distância foi construída através do método UPGMA (“unweighted pair group method with arithmetic mean”), utilizando o coeficiente de Jaccard, com o programa Genes (CRUZ, 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Meios de cultura para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Houve interação significativa entre os meios de cultivo e o uso do fungicida ciclohexamida. Para a detecção de Xcc, o meio NA sem adição de ciclohexamida (3,17), apresentou o maior diâmetro da colônia em comparação com os outros meios de cultura (Tabela 2), enquanto o meio YDC (1,33) apresentou o menor diâmetro, e ambos diferiram significativamente dos demais. Com a adição de ciclohexamida não houve diferença significativa entre os meios NA (2,2), NSCAA (1,5), 523 (1,37) e YDC (1,97) para o diâmetro da colônia.

Tabela 2. Diâmetro (mm) de colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em diferentes meios de cultura, sem e com adição de ciclohexamida. Uberlândia – MG, 2021.

Meios de cultura	Sem ciclohexamida	Com ciclohexamida
NA	3,17 Aa	2,20 Ba
NSCAA	1,40 Abc	1,50 Aa
523	2,23 Ab	1,37 Ba
YDC	1,33 Ac	1,97 Aa
CV%	19,82	

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey a 0,05

Fonte: A autora.

O diâmetro das colônias de Xcc foram estatisticamente iguais na presença e ausência de ciclohexamida nos meios de cultura NSCAA e YDC, após o quarto dia de cultivo. Ou seja, a adição desse fungicida não influenciou o crescimento bacteriano nesses meios de cultura (Tabela 2). Porém, a adição do ciclohexamida nos meios de cultura NA e 523 reduziu o diâmetro das colônias, mas sem prejuízo à sua visualização. Mamede e Tebaldi (2020) ao analisarem o diâmetro de *Pantoea ananatis* observaram resultados semelhantes utilizando um meio semisseletivo para a sua detecção.

O meio semisseletivo CCM também reduziu o tamanho das colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* (PEIXOTO et al., 2006). Para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja o meio semisseletivo MXG também reduziu o diâmetro das colônias (VIOLATTI; TEBALDI, 2016).

Não houve interação significativa entre os meios de cultura estudados e o uso de ciclohexamida ao analisarmos o número de unidades formadoras de colônias (UFC). Ou seja, o fungicida não influenciou no número de colônias desenvolvidas (Tabela 3). O número de colônias de Xcc foram estatisticamente iguais na presença e ausência de ciclohexamida nos meios de cultura NA, NSCAA e 523, aos quatro dias após o cultivo da bactéria.

Os meios de cultura YDC com e sem ciclohexamida, tiveram as menores médias em relação aos números de colônias desenvolvidas, diferindo estatisticamente dos demais meios. A presença do fungicida ciclohexamida não influenciou no número de colônias de *X. campestris* pv. *campestris*, ou seja, este fungicida pode ser incorporado aos meios de cultura, para facilitar a detecção da bactéria alvo e inibir o crescimento de microrganismos saprófitas.

Tabela 3. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, em diferentes meios de cultura, em unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹). Uberlândia – MG, 2021.

Meios de cultura	Com ciclohexamida	Sem ciclohexamida
NSCAA	9,7 x10 ⁹ a	9,5 x10 ⁹ a
523	9,3 x10 ⁹ a	9,4 x10 ⁹ a
NA	9,6 x10 ⁹ a	9,5 x10 ⁹ a
YDC	8,3 x10 ⁹ b	8,6 x10 ⁹ b
CV%	1.88	

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Tukey a 0,05.

Fonte: A autora.

Os meios de cultura avaliados apresentaram baixa repressividade e alta supressividade, uma vez que eles foram capazes de suprimir a presença de saprófitas e as colônias de Xcc conseguiram se desenvolver nos meios. Resultados semelhantes são encontrados nos meios de cultura FS e mCS20ABN, ambos recomendados para a detecção de Xcc pela Associação Internacional de Teste de Sementes (ISTA, 2014). Outros autores também encontraram resultados similares no desenvolvimento de meios semisseletivos, como Frare (2006), na detecção de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e Moraes et al., (2010) na detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão.

Dessa forma, verificou-se que os meios 523, NA e NSCAA, com ou sem a adição de ciclohexamida, podem ser recomendados para a detecção da bactéria em análise de rotina em laboratório.

4.2 Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em sementes de canola previamente tratadas

A bactéria foi detectada nas sementes dos seis genótipos avaliados (Tabela 4). No meio de cultura YDC, a bactéria foi detectada nas sementes inteiras dos genótipos Hyola 76_A4, Hyola 433_A15, com e sem desinfestação, respectivamente; e no extrato de sementes dos genótipos Hyola 76_A1 e Hyola 43_A3, com desinfestação. Para o meio de cultura 523, a bactéria foi detectada no extrato de sementes dos genótipos Hyola 76_A1, Hyola 76_A4, e no Hyola 433_A15, com e sem desinfestação, respectivamente. No meio de cultura NSCAA houve a detecção da bactéria em sementes inteira dos genótipos Hyola 76_A1, Hyola

433_A15, com e sem desinfestação, respectivamente; e no extrato de sementes dos genótipos Hyola 571CL_A9 e Hyola 433_A16, com e sem desinfestação respectivamente.

As sementes foram divididas em dois grupos, sem e com desinfestação com hipoclorito de sódio afim de retirar o excesso de produto químico para avaliar se o mesmo iria interferir na detecção da Xcc nas sementes. Na detecção da bactéria utilizando sementes inteiras não desinfestadas foi observado a presença da bactéria em dois genótipos de canola, por isso ao utilizar essa técnica não é necessário retirar o excesso de produto químico, uma vez que, o composto ativo Thiram não inibiu o crescimento bacteriano. Entretanto, na detecção utilizando o extrato de sementes desinfestadas a bactéria foi detectada em quatro genótipos de canola, em função disso, ao utilizar essa técnica, é importante desinfestar as sementes, para evitar efeito residual químico do produto no extrato.

Ao avaliar sementes inteiras a bactéria foi detectada apenas nos genótipos Hyola 76_A1, Hyola 76_A4 e Hyola 433_A15, no entanto, quando utilizado o extrato das sementes, o patógeno foi detectado em todos os genótipos. Tal resultado pode estar relacionado com o número de sementes utilizadas no extrato (1.000 sementes), uma vez que para avaliar o método de sementes inteiras, foram utilizadas apenas 200. Além disso, outro fator que pode alterar o resultado é a posição de Xcc nos tecidos vegetais do grão, pois o patógeno tem a capacidade de colonizar o endosperma e embrião das sementes (WOLF et al., 2019).

Tabela 4. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em sementes inteiras e no extrato de sementes de canola, previamente tratadas com Thiram, sem e com desinfestação com hipoclorito de sódio, em diferentes meios de cultura semisseletivos. Uberlândia – MG, 2021.

Genótipos	Sem desinfestação			Com desinfestação		
	YDC	523	NSCAA	YDC	523	NSCAA
Hyola 76_A1 (UFU H125 e M9)	-	-	-	E	E	S
Hyola 43_A3 (UFU H143)	-	-	-	E	-	-
Hyola 76_A4 (UFU H145 e M6)	S	-	-	-	E	-
Hyola 571CL_A9 (UFU H150)	-	-	-	-	-	E
Hyola 433_A15 (UFU I29, M7 e M8)	S	E	S	-	-	-
Hyola 433_A16 (UFU I23)	-	-	E	-	-	-

E: presença da bactéria no extrato das sementes, S: presença da bactéria em sementes inteiras, – ausência da bactéria.

Fonte: A autora.

Não foi possível determinar o número de UFC/mL/g de Xcc, pois houve o crescimento esporádico de algumas colônias, em ambas as técnicas nos diferentes meios de cultura, sugerindo baixa contaminação das sementes e também em função do número de sementes utilizado. Resultados semelhantes foram obtidos na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (TUMELERO, 2012) e na detecção de *Pantoea ananatis* (MAMEDE; TEBALDI, 2020) que somente detectaram e não conseguiram quantificar a bactéria nos meios de cultura.

Os resultados observados nas amostras de sementes mostram baixa repressividade dos meios de cultura 523, YDC e NSCAA com adição de ciclohexamida. Resultados semelhantes foram observados na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja (VIOLATTI; TEBALDI, 2016), na detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho (MAMEDE; TEBALDI, 2020), na detecção de Xcc em sementes de brócolis (TEBALDI et al., 2007).

Todos os dez isolados (UFU H125, H143, H145, H150, I23, I29, M6, M7, M8 e M9) (Tabela 5) apresentaram as seguintes características culturais e bioquímicas em meio de cultura: colônias amarelas em meio YDC, com algumas variações na tonalidade, convexas, brilhantes, circulares, bordas lisas, crescimento a 37 °C, Gram negativa, oxidação/fermentação: aeróbio estrito, catalase positiva, asparagina e oxidase negativa. A variação observada deu-se quanto à reação de hipersensibilidade em fumo (negativa para os isolados UFU H125, I23 e M9).

Os isolados bacterianos obtidos das sementes foram patogênicos em plantas de couve, sendo que no sétimo dia após a inoculação foi possível observar a reprodução dos sintomas de lesão em forma de “V” nas margens das folhas, de coloração amarela a marrom, com bordos amarelos e nervuras escurecidas. A partir do aparecimento das lesões necróticas foi realizado o reisolamento da bactéria, confirmando os Postulados de Koch.

Os primers XCF/XCR específicos para *X. campestris* pv. *campestris* confirmaram a identidade de nove isolados bacterianos detectados nas sementes de canola, gerando um fragmento de DNA de tamanho aproximado de 535 pb, em concordância com Park et al. (2004). Somente o isolado UFU I23 não foi confirmado como Xcc ou Xcr usando os pares de primers específicos, no entanto foi patogênico em plantas de couve.

De acordo com a caracterização cultural, bioquímica, fisiológica, molecular, e patogenicidade no hospedeiro os nove isolados detectados nas sementes de canola foram identificados como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Apesar das sementes serem quimicamente tratadas com Thiram, o produto não inibiu a detecção e o crescimento de Xcc em meio de cultura. Com a recente introdução da canola no

Triângulo Mineiro é necessário que as sementes a serem utilizadas sejam livres da bactéria, mesmo que as sementes estejam tratadas quimicamente com fungicida, ainda é possível a detecção da bactéria nas sementes. O uso de sementes livres da bactéria evitará introdução da bactéria e de possíveis raças ainda não descritas no país. Atualmente, nove raças são propostas para Xcc, sendo as raças 1 e 4 predominantes no mundo (VICENTE; HOLUB, 2013). Por isso a importância dos testes de detecção na bactéria nas sementes de canola, mesmo que estejam tratadas quimicamente.

A escolha de um meio de cultura para a detecção da bactéria em sementes depende da eficiência e da sensibilidade na recuperação do patógeno alvo, além de ser reproduzível, de baixo custo e de fácil preparo (BARBOSA, 2007). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2009) e a ISTA (2014) recomendam a utilização do extrato da sementes, mas os dois métodos de detecção da bactéria nas sementes tiveram resultados semelhantes.

A utilização do extrato da sementes é uma técnica menos laboriosa, mais econômica no preparo dos meios de cultura e possibilita a utilização de um maior número de sementes, ao compararmos com o uso de sementes inteiras. A taxa de transmissão da bactéria é baixa e por isso, requer um maior número de sementes para a sua detecção. De acordo com Lee et al. (2009) a presença 0,03% de sementes contaminadas com Xcc em um lote seria o suficiente para iniciar uma epidemia no campo, sob condições favoráveis de temperatura e umidade. Dessa forma é evidente a importância da utilização de meios de cultura e o número de sementes a serem utilizados na detecção da bactéria em sementes, evitando a ocorrência de epidemias.

4.3 Caracterização cultural, bioquímica e molecular de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Todos os 34 isolados apresentaram as seguintes características culturais e bioquímicas em meio de cultura: colônias amarelas em meio YDC, com algumas variações na tonalidade, convexas, brilhantes, circulares, bordas lisas, crescimento a 37 °C, Gram negativos, oxidação/fermentação: aeróbio estrito, catalase positiva, asparagina e oxidase negativa (Quadro 1). A variação observada deu-se quanto à reação de hipersensibilidade em fumo (negativa para os isolados UFU H62, H125, H148, I23 e M9), e teste de patogenicidade (negativo para o isolado UFU F75).

Os isolados testados apresentaram características semelhantes, próprias do gênero *Xanthomonas* e da espécie *X. campestris* (KRIEG; HOLT, 1984). O resultado negativo no teste de Gram (RYU, 1940), a não utilização de asparagina como a única fonte de carbono e o fato de serem aeróbicos estritos confirmam sua classificação nesse gênero. Entre outras características, o crescimento à 37 °C, a reação de catalase, oxidase, hipersensibilidade e teste de patogenicidade permitiram incluir os isolados testados na espécie *X. campestris* pv. *campestris* (BRADBURY, 1986).

Apenas o isolado UFU F75 não apresentou patogenicidade na couve. Esse isolado é proveniente da reinoculação com o isolado UFU F63, que nos testes iniciais apresentou pouca virulência. Devido ao tempo de armazenamento, o isolado pode ter perdido sua virulência pois o mesmo teve seu DNA amplificado pelos *primers* específicos para Xcc. A perda de virulência de alguns isolados já foi relatada por Vicente et al. (2001) que a atribuíram às condições de preservação e de variações na agressividade de Xcc (Cruz et al., 2017). Ou pode ainda, apresentar especificidade de hospedeiro, uma vez que o isolado é proveniente da canola. Miguel-Wruck et al. (2010) observaram relativo grau de especificidade entre 33 isolados obtidos de várias regiões do Brasil e do exterior, inoculados em oito espécies de brássicas e alguns isolados não causaram doença em uma ou mais das brássicas inoculadas.

Assim, é importante identificar o patógeno por meio de *primers* específicos e estudar sua variabilidade genética por meio de *primers* universais utilizando a ferramenta de PCR.

Entre os 34 isolados bacterianos, 33 foram amplificados com o par de *primers* XCF/XCR específico para Xcc, gerando um único fragmento de aproximadamente 535 pb, confirmando a identidade da bactéria como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Estes resultados estão de acordo com Park et al. (2004) e Popović et al. (2019) que identificaram a presença da bactéria Xcc associadas a diversas espécies de brássicas, como a colza, couve-flor, couve e repolho através da técnica da PCR, utilizando tais *primers*.

O DNA do isolado UFU I23 não foi amplificado com os pares de *primers* específico para Xcc, XCF/XCR e Xcr_59F/Xcr_59R específico par *X.c.* pv. *raphani*, mas foi patogênico à couve. Isso pode ter ocorrido, devido aos problemas nos *primers* ou o isolado pode corresponder a um outro patovar da espécie *X. campestris*, uma vez que diferentes patovares causam doença em plantas da família Brassicaceae, como pv. *aberrans*, *armoraciae*, *barbareae* e *incanae* (Melo, 2016).

QUADRO 1. Caracterização cultural, bioquímica e molecular de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Uberlândia – MG, 2021.

Isolado	Colônia: características culturais	Cor	Gram	O/F	Asparagina	YDC	Catalase	Oxidase	T°C 37°	HR fumo	Hospedeiro	PCR Xcc	PCR Xcr	Resultado
UFU A4	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU A29	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU B7	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU D12	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU E28	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU E44	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU E47	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU F34	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU F43	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU F57	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU F63	Circular, borda lisa, brilhante, opaco	Amarelo escuro	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU F75	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	-	+		<i>X. campestris</i>
UFU F77	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU F78	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU F81	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU G10	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU G12	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU G89	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU H51	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU H62	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	-	+	+		Xcc
UFU H123	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU H124	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU H125	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	-	+	+		Xcc
UFU H143	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo claro	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc

Continua

Continuação

Isolado	Colônia: características culturais	Cor	Gram	O/F	Asparagina	YDC	Catalase	Oxidase	T°C 37°	HR fumo	Hospedeiro	PCR Xcc	PCR Xcr	Resultado
UFU H145	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU H148	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	-	+	+		Xcc
UFU H150	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo claro	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU I23	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo escuro	-	O	-	+	+	-	+	-	+	-	-	X <i>campestris</i>
UFU I29	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo escuro	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU I43	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU M6	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU M7	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo escuro	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU M8	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo escuro	-	O	-	+	+	-	+	+	+	+		Xcc
UFU M9	Circular, borda lisa, convexa, brilhante, opaco	Amarelo	-	O	-	+	+	-	+	-	+	+		Xcc

Fonte: A autora.

4.4 Variabilidade genética de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*

Na análise de agrupamento (Figura 1) por BOX-PCR foi observada variabilidade genética entre os isolados. Com similaridade de 50% houve formação de oito grupos, com bandas distintas que variaram entre 400 e 3000 pb (Figura 2). Alguns isolados apresentaram 100% de similaridade genética, sendo eles UFU H123, UFU H124 e UFU H125; UFU H143 e UFU H145. O grupo II alocou 4 isolados UFU A4, UFU D12, UFU E28 e UFU E47, todos os isolados desse grupo possuem a mesma origem, do Município de Uberlândia, apesar de apresentarem hospedeiros diferentes. O grupo VI alocou 3 isolados UFU G12, UFU G89 e UFU G10, todos são provenientes da canola. Entretanto, para os demais grupos foi observado que o local de origem e o hospedeiro não são fatores hegemônicos na determinação da similaridade genética dos isolados, uma vez que, não há relação evidente entre a composição dos grupos com o local de origem ou com o hospedeiro.

Em ERIC-PCR (Figura 2) foram formados 2 grupos com similaridade aproximada de 23% observando bandas de 100 a 3000 pb. No grupo I alguns isolados apresentaram 100% de

similaridade genética, sendo eles UFU H124 e UFU H125; UFU E47 e UFU F34. O grupo II alocou 4 isolados, UFU A29, UFU D12, UFU H148 e UFU B7.

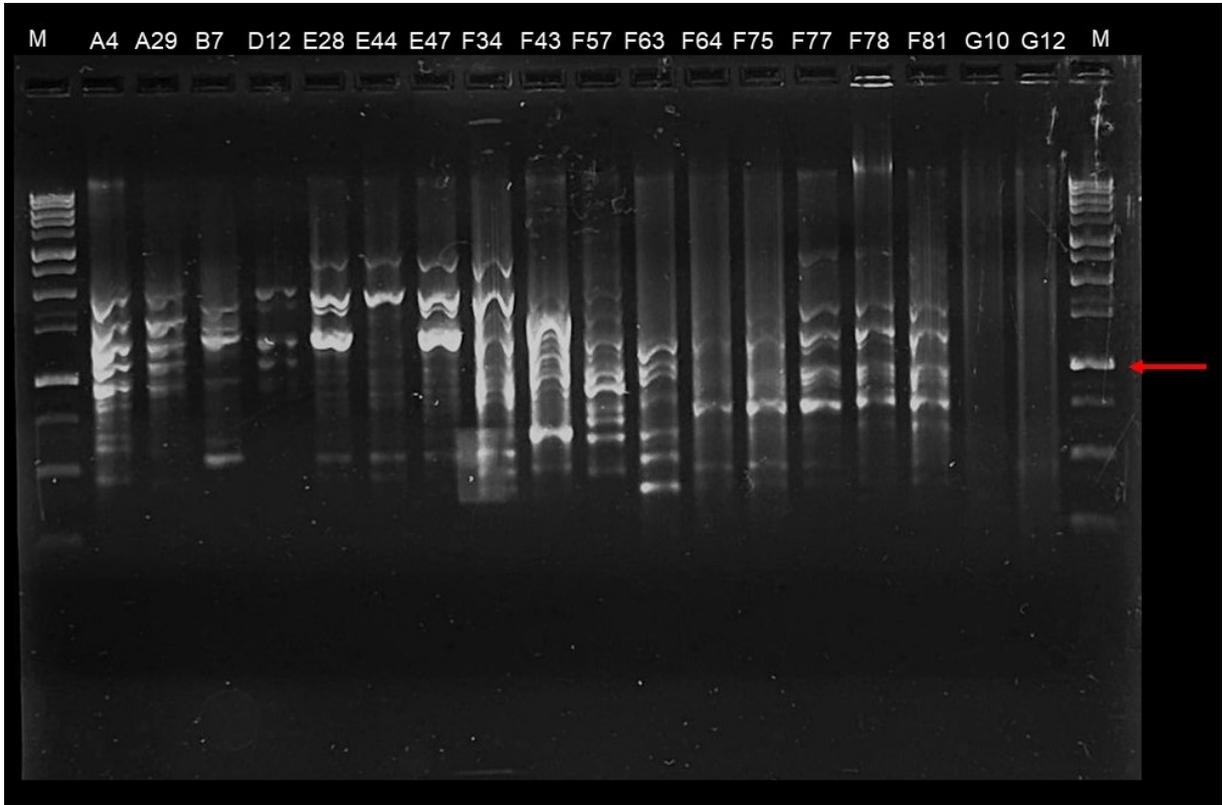
Na formação de subgrupos, considerando o hospedeiro de origem, foram observadas formações de subgrupos com similaridade de 89% entre os isolados UFU H143 e UFU H145; 86% entre UFU F57 e UFU G10; 80% entre UFU F75 e UFU F77; 76,9% entre UFU F81 e UFU G12.

Quando avaliados em conjunto os *primers* ERIC e BOX-PCR (Figura 3), considerando uma similaridade genética de 27%, foi observada a formação de 3 grupos. Os isolados UFU H124 e UFU H125 apresentaram 100% de similaridade genética. Todos os isolados provenientes da canola, com exceção do UFU H125, foram alocados no grupo II, apresentando apenas 33% de similaridade.

A análise utilizando elementos repetitivos do genoma bacteriano, tais como REP, ERIC e BOX, têm sido muito utilizada para analisar a diversidade genética de Xcc em vários países como Israel (VALVERDE et al., 2007), Nepal (JENSEN et al., 2010), Espanha (LEMA et al., 2012), Índia (SINGH et al., 2016), Estados Unidos (LANGE et al., 2016), Portugal (CRUZ et al., 2017), Taiwan (BURLAKOTI et al., 2018).

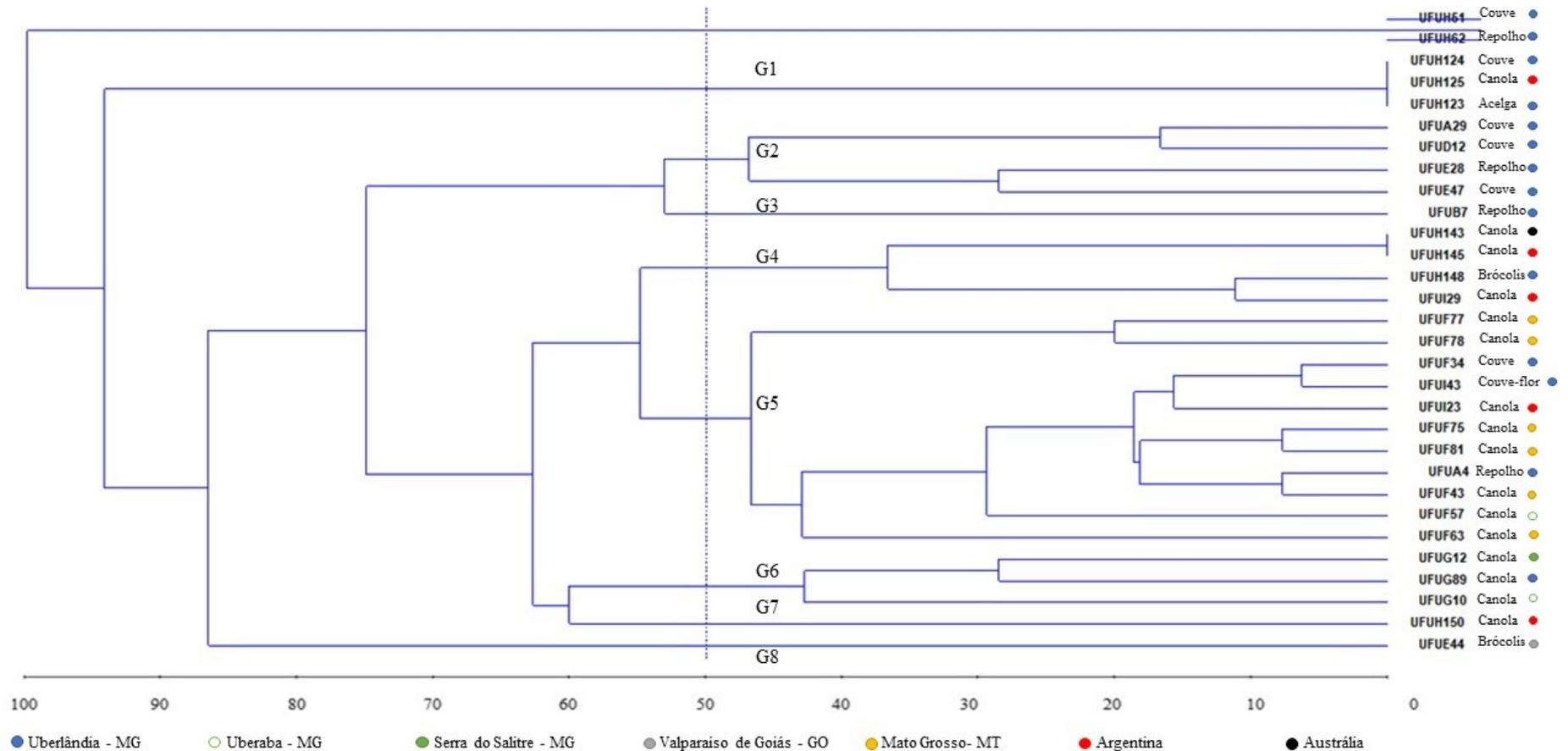
Não foi possível relacionar os grupos formados em BOX, ERIC-PCR, na avaliação conjunta com ambos os *primers*, com o local de origem ou com o hospedeiro. Existe variabilidade genética entre os isolados, pois há uma variação na distribuição das sequências BOX e ERIC, indicando a existência de variação genotípica dos isolados. No entanto, os isolados provenientes do mesmo hospedeiro e/ou do mesmo local de origem não se enquadraram no mesmo grupo, mas em diversos subgrupos espalhados pelo dendrograma. Resultados semelhantes foram encontrados em 141 isolados de Xcc de diferentes brássicas na Itália (ZACCARDELLI et al., 2008), de 75 isolados provenientes de oito espécies de brássicas, na Índia (RATHAUR et al., 2015) e de 147 isolados oriundos de sete espécies de brássicas na Sérvia (POPOVIC et al., 2019). Portanto, há variabilidade genética entre os isolados de Xcc avaliados, sendo o BOX e ERIC uma ferramenta útil a ser empregada para estudo de diversidade genética de isolados bacterianos.

FIGURA 1- Eletroforese em gel de agarose 1% dos fragmentos gerados através de BOX-PCR a partir do DNA de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. M: marcador molecular (1 kb DNA Ladder RTU – KASVI). A seta indica 1500 pb.



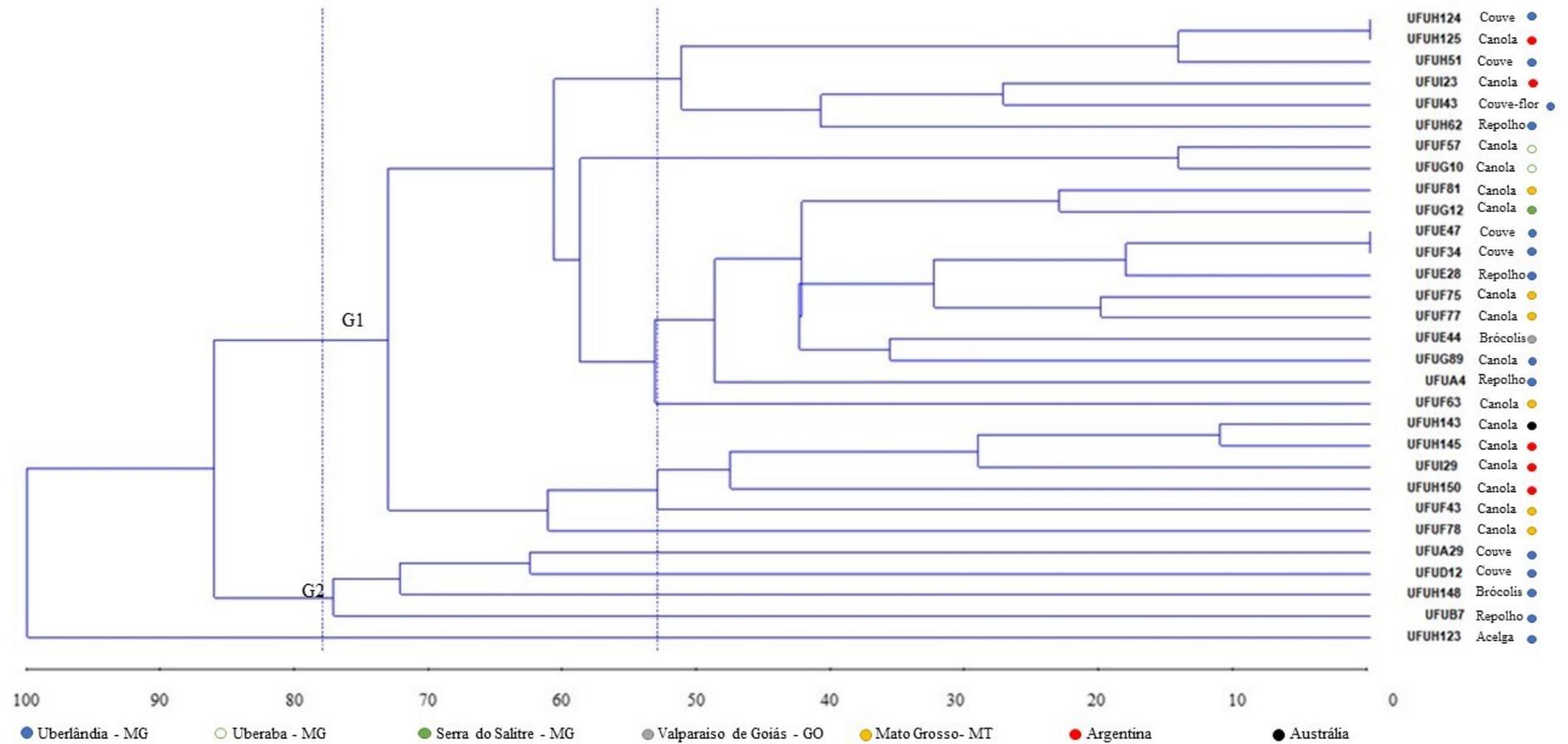
Fonte: A autora.

FIGURA 2- Agrupamento pelo método de UPGMA de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* de acordo com o índice de dissimilaridade obtido pelo *primer* BOX. Coeficiente de correlação cofenética (r): 0,999



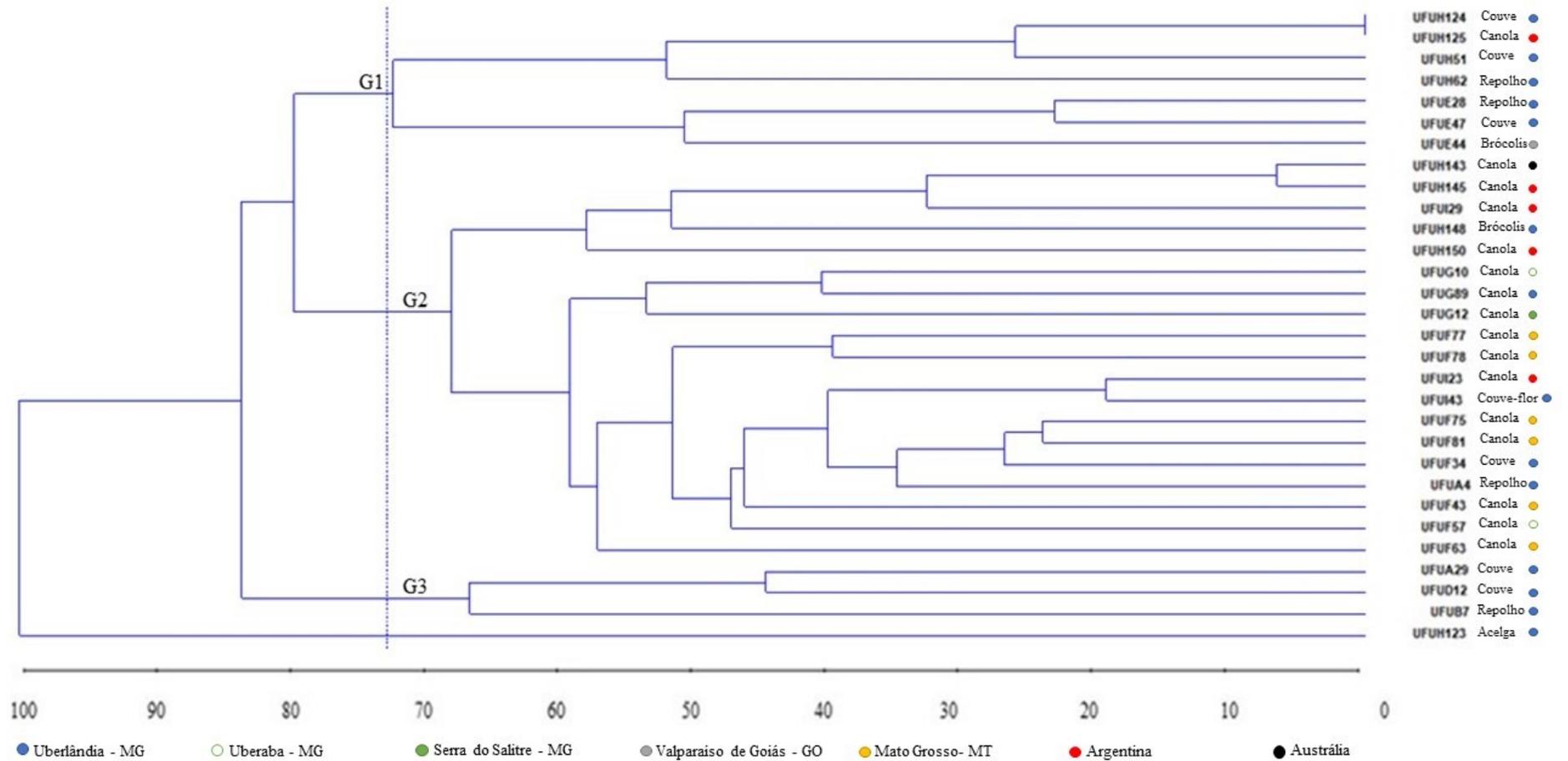
Fonte: A autora.

FIGURA 3- Agrupamento pelo método de UPGMA de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* de acordo com o índice de dissimilaridade obtido pelos *primers* ERIC1R e ERIC2. Coeficiente de correlação cofenética (r): 0,886.



Fonte: A autora.

FIGURA 4- Agrupamento pelo método de UPGMA de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* de acordo com o índice de dissimilaridade obtido por BOX-PCR e ERIC-PCR. Coeficiente de correlação cofenética (r): 0,873.



Fonte: A autora.

5 CONCLUSÕES

Apesar de não serem recomendados pela ISTA, os meios de cultura 523, NA e NSCAA com a adição de ciclohexamida foram eficientes para a detecção da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em sementes de canola quimicamente tratadas. Mesmo com a baixa amostragem, a bactéria foi detectada nos seis lotes de sementes avaliados, portanto, eles podem ser usados nas análises de rotina em laboratório.

O uso do extrato da semente foi eficiente, econômica e de fácil execução para a detecção da bactéria em sementes de canola tratadas quimicamente e previamente desinfestadas.

Apenas 32 isolados apresentaram características culturais, bioquímicas e foram identificados como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Os *primers* específicos XCF/XCR identificaram 33 isolados como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

O isolado UFU F75 não causou patogenicidade no hospedeiro, mas teve sua identidade confirmada pela PCR com os *primers* XCF/XCR.

O isolado UFU I23 não teve sua identidade confirmada pela PCR com os *primers* XCF/XCR e Xcr_59F/Xcr_59R.

Os isolados de Xcc apresentaram variabilidade genética em BOX e ERIC-PCR, não sendo possível agrupá-los de acordo com a região geográfica e o hospedeiro de origem.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, L. S. **Avaliação de meios semi-seletivo e técnicas moleculares para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. 2012. 37 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/4406/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 1 mar. 2020.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. São Paulo: Editora Ceres, 2016. v. 2.
- BALANI, D. M. **Detecção e identificação de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodoeiro por meio de técnicas moleculares**. 2009. 63 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-15032010-171547/publico/Denise_Balani.pdf. Acesso em: 6 abr. 2020.
- BARBOSA, J. F. **Inoculação e detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2007. 135 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/2786/2/TESE_Inocula%C3%A7%C3%A3o%20e%20detec%C3%A7%C3%A3o%20de%20Xanthomonas%20axonopodis%20pv.%20malvacearum%20em%20sementes%20de%20algod%C3%A3o%20%28Gossypium%20hirsutum%20L.%29.pdf. Acesso em: 7 abr. 2020.
- BATISTA, J. N. G. **Podridão negra das crucíferas no Brasil: etiologia e estratégias de manejo em couve-flor**. 2020. 137 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/41437>. Acesso em: 30 jul. 2021.
- BERG, T.; TESORIERO, L.; HAILSTONES, D. L. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in Brassica seed. **Plant Pathology**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 416–427, 15 June. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01186.x>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2005.01186.x>. Acesso em: 5 nov. 2020.
- BILA, J.; MONDJANA, A.; MORTENSEN, C. N.; LUND, O. S. **Podridão negra de repolho em Mocambique: estratégias para o manejo sustentável da doença: manual de Campo**. Copenhagen: DSHC, 2012. Disponível em: <https://curis.ku.dk/ws/files/40808051/manual>. Acesso em: 11 jun. 2021.
- BILA, J.; MORTENSEN, C. N.; ANDRESEN, M.; VICENTE, J. G.; WULFF, E. G. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* race 1 is the main causal agent of black rot of Brassicas in Southern Mozambique. **African Journal of Biotechnology**, Moçambique, v. 12, n. 6, p. 602–610, 6 Feb. 2013. DOI: [10.5897/AJB12.2455](https://doi.org/10.5897/AJB12.2455). Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/126632>. Acesso em: 8 jul. 2021.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. England: CAB International: 1986.

BURLAKOTI, R. R.; CHEN, J. R.; HSU, C. F.; BURLAKOTI, P.; KENYON, L. Molecular characterization, comparison of screening methods, and evaluation of cross-pathogenicity of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) strains from cabbage, choy sum, leafy mustard and pak choi from Taiwan. **Plant Pathology**, Oxford, v. 67, n. 7, p. 1589-1600, 17 Apr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12857>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12857>. Acesso em: 20 jun. 2021.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 8, safra 2020/21, n. 9, nono levantamento, junho. 2021. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/37417_b8ca7d7975dafd0ff48ba4d5887bb0b0. Acesso em: 25 jul. 2021.

CRUZ, C. D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>. Acesso em: 10 mai. 2021.

CRUZ, D. As hortaliças e o registro de agrotóxicos. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 31, n. 2, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hb/a/YzZSCNQ4rtq8PV4TQ997f9p/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 12 jul. 2021

CRUZ, J.; TENREIRO, R.; CRUZ, L. Assessment of diversity of *Xanthomonas campestris*. pathovars affecting cruciferous plants in Portugal and disclosure of two novel *X. campestris* pv. *campestris* races. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 99, n. 2, p. 403–414, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i2.3890>. Disponível em: <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/3890>. Acesso em: 13 mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399p. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf. Acesso em: 10 ago. 2021.

UNITED STATES. Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **Oilseeds: world markets and trade**. Washington: USDA, 2020. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>. Acesso em: 10 dez. 2020.

FARGIER, E.; FISCHER-LE SAUX, M.; MANCEAU, C. A multilocus sequence analysis of *Xanthomonas campestris* reveals a complex structure within crucifer-attacking pathovars of this species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 34, n. 2, p. 156–165, 2011. DOI: 10.1016/j.syapm.2010.09.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21193279/>. Acesso em: 25 out. 2020.

FARGIER, E.; MANCEAU, C. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, p. 805–818, 2007. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-3059.2007.01648.x>. Acesso em: 12 jul. 2021.

FATMI, M. B.; WALCOTT, R. R.; SCHAAD, N.W. **Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other plating material**. 2nd. ed. St. Paul: APS Press, 2017.

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

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Bergey’s manual of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2004.

GITAITIS, R.; WALCOTT, R. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 371-397, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094321>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094321>. Acesso em: 16 set. 2020.

GRIMAUULT, V.; ANDRO, C.; POLITIKOU, A. PCR as a new identification method of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp. seed. **Seed Testing International**, Switzerland, n. 143, p. 35-38. Disponível em: https://www.seedtest.org/upload/cms/user/STI_143_April_2012_webwitherrata.pdf. Acesso em: 19 abr. 2021.

GRIESBACH, E.; LÖPTIEN, H.; MIERSCH, U. Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson in cabbage *Brassica oleracea* L. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Heidelberg, v. 110, n. 5, p. 461-475, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03356123>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03356123>. Acesso em: 3 jul. 2021.

HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, and other Enterobacteria. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 5, n. 4, p. 25–834, 1991. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 18 ago. 2021.

HE, Y. W.; WU, J.; ZHOU, L.; YANG, F.; HE, Y. Q.; JIANG, B. L.; BAI, L.; XU, Y.; DENG, Z.; TANG, J. L.; ZHANG, L. H. *Xanthomonas campestris* diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and is associated with xanthomonadin biosynthesis, cell viability, antioxidant activity, and systemic invasion. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 24, p. 948- 957, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-11-0031>. Disponível em: https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-02-11-0031?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 01 ago. 2021.

INOUE, Y.; FUJIKAWA, T.; TAKIKAWA, Y. Detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and pv. *raphani* by multiplex polymerase chain reaction using specific primers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 105, p. 51991–2002, 2021. Japan. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11159-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11159-4>. Acesso em: 25 ago. 2021.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 7-019a: Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Brassica spp. chapter 7, seed health testing methods. **International Rules for Seed Testing**. Bassersdorf, Switzerland, 2014. Disponível em: <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/SH-07-019a-2014.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2021.

JACOB JUNIOR, E. A.; MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; RODRÍGUEZ QUILÓN, I.; MAIA, M. de S.; ALTISENT, J. M. D. Changes in canola plant architecture and seed physiological quality in response to different sowing densities. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 34, n. 1 p. 014 - 020, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000100002>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbs/a/QnwqTqktjWtqtzqvWyHn4H/?lang=en>. Acesso em: 1 abr. 2020.

JENSEN, B. D.; VICENTE, J. G.; ROBERTS, S. J.; MANANDHAR, H. K. Occurrence and diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in vegetable Brassica fields in Nepal. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 298–305, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0298>. Acesso em: 4 jun. 2021.

KADO, C. I. **Plant bacteriology**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2010.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976, 1970. DOI: 10.1094/Phyto-60-969. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Abstracts/Phyto60_969.htm. Acesso em: 06 ago. 2019.

KOENRAADT, H.; HAILSTONES, D. L.; IGNATOV, A.; SCHAAD, N. W. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Crucifer Seeds. In: FATMI, M. B.; WALCOTT, R. R.; SCHAAD, N.W. **Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other plating material**. 2nd. ed. Saint Paul: APS Press, 2017.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 1984. v.1.

LANGE, H. W.; TANCOS, M. A.; CARLSON, M. O.; SMART, C. D. Diversity of *Xanthomonas campestris* isolates from symptomatic crucifers in New York State. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 106, n. 2, p. 113-122, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-15-0134-R>. Disponível em: https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PHYTO-06-15-0134-R?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org. Acesso em: 8 jul. 2021.

LAVIOLA, B. G.; SANTOS, A.; GOMES, E. S.; ROCHA, L. S.; BORGES, M.; MENDONÇA, S.; GOUVÊA, J. A.; RODRIGUES, E. V. **Performance de genótipos de canola nas condições de Cerrado**. Brasília, DF: EMBRAPA Agroenergia, 2019. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 20). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1117451>. Acesso em: 05 ago. 2021.

LEE, Y. A.; SUNG, N.; LIU, T. F.; LEE, Y. S. Combination of Chromogenic Differential medium and estA-Specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 21, p. 6831–6838, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01653-09>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01653-09>. Acesso em: 8 jan. 2021.

LEE, Y.; YANG, P.; HUANG, P.; HUANG, S. Characterization, phylogeny, and genome analyses of nonpathogenic *Xanthomonas campestris* strains isolated from brassica seeds. **Phytopathology**, Saintt. Paul, v. 10, n. 5, p. 981-988. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-19-0319-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-08-19-0319-R>. Acesso em: 15 ago. 2021.

LEMA, M.; CARTEA, M. E.; SOTELO, T.; VELASCO, P.; SOENGAS, P. Discrimination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races among strains from northwestern Spain by Brassica spp. genotypes and rep-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v. 133, p. 159–169, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9929-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-011-9929-5>. Acesso em: 10 jul. 2021.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DeBRUIJN, F. J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 2286-2295. 1994. DOI:10.1128/aem.60.7.2286-2295.1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201645/>. Acesso em: 21 maio 2021.

LU, K.; WEI, L.; LI, X.; WANG, Y.; WU, J.; LIU, M.; ZHANG, C.; CHEN, Z.; XIAO, Z.; JIAN, H.; CHENG, F.; ZHANG, K.; DU, H.; XINCHAO, C.; QU, C.; QIAN, W.; LIU, L.; WANG, R.; ZOU, Q.; YING, J.; XU, X.; MEI, J.; LIANG, Y.; CHAI, Y.; TANG, Z.; WAN, H.; NI, Y.; HE, Y.; LIN, N.; FAN, Y.; SUN, W.; LI, N.; ZHOU, G.; ZHENG, H.; WANG, X.; PATERSON, A. H.; LI, J. Whole-genome resequencing reveals *Brassica napus* origin and genetic loci involved in its improvement. **Nature Communications**, Chongqing, v. 10, p. 1154, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09134-9>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-09134-9>. Acesso em: 28 ago. 2021.

LUGO, A. J.; ELIBOX, W.; JONES, J. B.; RAMSUBHAG, A. Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* affecting crucifers in Trinidad. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 136, p. 61-70, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0138-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-012-0138-7>. Acesso em: 22 fev. 2021.

MAMEDE, M. C.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 46, n. 1, p. 36-40, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/198561>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/zK9nfQsZpVGMK7HzwQQkFDL/?lang=pt>. Acesso em: 13 jun. 2021.

MARINGONI, A. C. Doenças das Crucíferas. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap. 31, p. 285-291.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERY, P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 20, n. 13, p. 3479-3483, 1992. DOI: 10.1093/nar/20.13.3479. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1630918/>. Acesso em: 3 set. 2021.

MELO, E. A. de. **Estrutura de população e caracterização filogenética de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* do estado de Pernambuco**. 2016. 92 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/bitstream/tede2/5983/2/Edilaine%20Alves%20de%20Melo.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2021.

MIGUEL-WRUCK, D. S.; OLIVEIRA, J. R. D.; DIAS, L. A. D. S. Especificidade de hospedeiro nas interações *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*-brássicas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 129-133, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052010000200004>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/FnKn8b98SgWC3dzf9yrySJc/?lang=pt>. Acesso em: 30 jun. 2021.

MORAES, M. H. D.; FRARE, V. C.; OTTONI, J.; BALANI, D. M.; VAZ MONDO, V. H.; MENTEN, J. O. M. 2010. Avaliação de dois meios de cultura semi-seletivos para a detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 35, n. 6, p. 385-389. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762010000600009>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/tpp/a/Fzsmdvdd8kv9X6x4m7jYVsH/?lang=pt>. Acesso em: 28 jul. 2021.

NERY-SILVA, F. A.; GARCIA, M. F.; TOMM, G. O.; ALVES, M. de P.; ABRÃO, A. S.; PEREIRA, A. C.; SILVA, R. J.; LEMES, T. H. de A. Ocorrência de *Cercospora* sp. em canola na região do Cerrado Mineiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE CANOLA, 2017, Passo Fundo. **Anais [...]**, Passo Fundo: Embrapa, 2017. p. 222-226. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/170110/1/CNPT-ID44248.pdf>. Acesso em: 20 maio 2021.

PARK, Y. J.; LEE, B. M.; HO-HAHN, J.; LEE, G. B.; PARK, D. S. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by PCR using species-specific primers based on hrpF gene sequences. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, n. 4, p. 419-23, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.002>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501304000734>. Acesso em: 5 jul. 2021.

PEGORARO, A. **Inserção da canola em sistema de cultivo na microregião de curitibanos-SC**. 2016, 41 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/165177>. Acesso em: 14 maio 2021.

PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1317-1320, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000400045>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/Ddc68XJm5y9mKDKLPgnrp5x/?lang=pt>. Acesso em: 23 abr. 2021.

POPOVIĆ, T.; MITROVIĆ, P.; JELUŠIĆ, A.; DIMKIĆ, I.; MARJANOVIĆ-JEROMELA, A.; NIKOLIĆ, I.; STANKOVIĆ, S. Genetic diversity and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from *Brassica napus* and six *Brassica oleracea* crops in Serbia. **Plant Pathology**, Oxford, v. 68, n. 8, p. 1448-1457, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13064>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ppa.13064>. Acesso em: 20 dez. 2020.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; MELO, R. A. C.; SOARES, A. F. T. **Suscetibilidade de cultivares de couve à podridão negra no Distrito Federal**. Brasília, DF: EMBRAPA Hortaliças, 2021. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento/ Embrapa Hortaliças). Disponível em: <https://www.embrapa.br/hortaliças/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1132594/suscetibilidade-de-cultivares-de-couve-a-podridao-negra-no-distrito-federal>. Acesso em: 14 jan. 2021.

RATHAUR, P. S.; SINGH D.; RAGHUWANSHI, R.; YADAVA, D. K. Pathogenic and Genetic Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races Based on Rep-PCR and Multilocus Sequence Analysis. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 10, p. 317, 2015. DOI:10.4172/2157-7471.1000317. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/pathogenic-and-genetic-characterization-of-xanthomonas-campestris-pvcampestris-races-based-on-reppcr-and-multilocus-sequence-analysis-2157-7471-1000317.pdf>. Acesso em: 26 jul. 2020.

REECE, J. B.; URRY, L. A.; CAIN, M. L., WASSERMAN, S. A.; MINORSKY, P. V.; AND JACKSON, R. B. **Forensic evidence and genetic profiles**. 10th ed. San Francisco: Pearson, 2011.

RUBEL, M. H., HOSSAIN, M. R., NATH, U. K.; NATARAJAN, S.; LEE, J. H.; JUNG, H. J; KIM, H. T.; PARK, J. I; NOUET I. S. Development of a PCR test for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*. **Australasian Plant Pathology**, Suncheon, v. 48, p. 179–182, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13313-019-0614-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13313-019-0614-z>. Acesso em: 12 jul. 2021.

RYU, E. A simple method for differentiation between Gram-positive and Gramnegative organisms without staining. **Kitazato Archives od Experimental Medicine**, Tokyo, v. 17, p. 58-63, 1940.

SANKARAN, S.; MISHRA, A.; EHSANI, R.; DAVIS, C. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. **Computers and Electronics in Agriculture**, New York, v. 72, n. 1, p. 1-13, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.02.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168169910000438>. Acesso em: 27 ago. 2021.

SCHAAD, N. W.; SITTERLEY, W. R.; MUMAYDAN, H. Relation of incidence of seedborne *Xanthomonas campestris* to black rot of crucifers. **Plant Disease**, Rochester, v. 64, p. 91–92, 1980. DOI:10.1094/PD-64-91. Disponível em: https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1980Abstracts/PD_64_91.htm. Acesso em: 19 jun. 2020.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3rd ed. Saint Paul: APS Press, 2001.

SEABRA, S. J.; LALLA, J. G.; GOTO, R.; MARINGONI, A. C.; VILLAS BOAS, R. L.; ROUWS, J. R. C.; ORIANI, E. E. Suscetibilidade à podridão negra e produtividade de brócolis em função de doses de nitrogênio e potássio. **Horticultura Brasileira**, Recife, v. 31, n. 3, p. 426-431, 2013. Brasília, DF. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000300013>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hb/a/9GnrJPG8w6FSvx6rtnrbDDc/?lang=pt>. Acesso em: 6 set. 2021.

SILVA, M. R. **Diversidade genética de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* no Brasil**. 2006. 80 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2006. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/1076/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2021.

SINGH, D.; RATHAUR, P. S.; VICENTE, J. G. Characterization, genetic diversity and distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races causing black rot disease in cruciferous crops of India. **Plant Pathology**, Oxford, v. 65, p. 1411–1418, 2016. Oxford, England. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.12508>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12508>. Acesso em: 1 jul. 2021.

SOARES, J. **Desenvolvimento de meio semi-seletivo para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro**. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016. Disponível em: <http://tede.upf.br/jspui/bitstream/tede/561/1/2006JucenaraSoares.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2021.

STEILMANN, P.; DENARDIN, N. D.; RAAB, M.; MENEZES, A. C.; DESTEFANO, S. A. L. Detecção, quantificação e identificação de fitobactérias em sementes de trigo. **Nativa**, Sinop, v. 7, n. 4, p. 349-355, 2019. DOI:<http://dx.doi.org/10.31413/nativa.v7i4.6710>. Disponível em: <https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/nativa/article/view/6710>. Acesso em: 15 jun. 2021.

STEFANSSON, B. R.; KONDRÁ, Z. P. Tower Summer Rape. **Canadian Journal Plant Science**, Canadá, v. 55, p. 343-344, 1975. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjps75-053>. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/pdf/10.4141/cjps75-053>. Acesso em: 11 set. 21.

STEPHENSON, D. P.; MOORE, R. J.; ALLISON, G. E. Comparison and utilisation of repetitive element PCR for typing *Lactobacillus* isolated from the chicken gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 21, p. 6764- 6776, Nov. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-09>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.01150-09>. Acesso em: 3 out. 2020.

TEBALDI, N. D.; PANIZZI, R. de C.; SADER, R. Detecção, transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 416-418, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052007000400018>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/KywLSDw65j7VFCKfnhvgHgx/?lang=pt>. Acesso em: 9 mar. 2021.

TEBALDI, N. D.; PETERSI, J.; SOUZA, R. M.; CHITARRA, L. G.; VAN DER ZOUWEN, P.; BERGERVOET, J.; VAN DER WOLF, J. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry, immunostaining and direct viable counting. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, 4, 213-222, 2010. Brasília, DF. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762010000400002>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/tpp/a/Ntjpf5b7YwLw33dmVhggWgP/abstract/?lang=en>. Acesso em: 24 nov. 2020.

TOMM, G. O. **Indicativos tecnológicos para produção de canola no Rio Grande do Sul**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2007. (Sistemas de Produção, 3). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/p_sp03_2007.pdf. Acesso em: 5 maio 2021.

TOMM, G. O. **Cultivo de Canola**. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2014. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao1f6_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=3703&p_r_p_-996514994_topicoId=3024. Acesso em: 5 maio 2021.

TOMM, G. O.; RAPOSO, R. W. C. Tropicalização da canola. *In*: SIMPÓSIO SOBRE INOVAÇÃO E CRIATIVIDADE NA EMBRAPA, 1., 2008, Brasília, DF. [**Trabalhos apresentados**]. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/Tropicalizacao%20da%20canola%20076.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2021.

TOMM, G. O.; SOARES, A. L. S.; MELLO, M. A. B.; DEPINÉ, D. E.; FIGER, E. **Desempenho de genótipos de canola em Goiás**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004. 11 p. (Comunicado Técnico Online, 118). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_col118.htm. Acesso em: 26 ago. 2021.

TSYGANKOVA, S. V.; IGNATOV, A. N.; BOULYGINA, E. S.; KUZNETSOV, B. B.; KOROTKOV, E. V. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* revealed by novel rep PCR primer. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 845-853, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-004-2726-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-004-2726-7#Abs1>. Acesso em: 3 abr. 2021.

TUMELERO, A. I. **Detecção, quantificação e transmissão de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* em sementes de algodão**. 2012. 131 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012. Disponível em: <http://tede.upf.br/jspui/bitstream/tede/420/1/2012AndreiaIraciTumelero.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2021.

TUMELERO, A. I.; DENARDIN, N. A.; GOMÉZ, D. E. Evaluación de medios de cultivo para *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* a partir de semillas de algodón. **Química viva**, Buenos Aires, v. 12, n. 2, p. 91-102, 2013. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/863/86328550003.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2021.

VALVERDE, A.; HUBERT, T.; STOLOV, A.; DAGAR, A.; KOPELOWITZ, J.; BURDMAN, S. Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, p. 17-25, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01456.x>. Disponível em: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2006.01456.x>. Acesso em: 12 dez. 2020.

VICENTE, J. G.; CONWAY, J.; ROBERTS, S. J.; TAYLOR, J. D. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races and related pathovars. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 5, p. 492-499, 2001. Saint Paul, MN. DOI: 10.1094/PHYTO.2001.91.5.492. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18943594/>. Acesso em: 18 dez. 2020.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to Brassica crops. **Molecular plant pathology**, Chichester, v. 14, n. 1, p. 2-18, 2013. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23051837/>. Acesso em: 25 nov. 2020.

VILLETH, G. R.; REIS, F. B.; TONIETTO, A.; HUERGO, L.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; FRANCO, O. L.; MEHTA, A. Comparative proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the susceptible and the resistant cultivars of *Brassica oleracea*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 298, n. 2, p. 260-266, 2009. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01728.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19663914/>. Acesso em: 19 jan. 2021.

VIOLATTI, M. R.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 3, p. 268-270, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2127>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/CnGJB5kXzjVLH883YpRTXdG/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 06 abr. 2021.

VAN DER WOLF, J.; KASTELEIN, P.; DA SILVA JÚNIOR, T. A. F.; LELIS, F. V.; VAN DER ZOUWEN, P. Colonization of siliques and seeds of rapid cycling *Brassica oleracea* plants by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* after spray-inoculation of flower clusters. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 154, p. 445–461, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01668-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-019-01668-4>. Acesso em: 10 set. 2021.

WILLIAMS, P. H. Black rot. *In*: RIMMER, S.R.; SHATTUCK, V.I.; BUCHWALDT, L. (ed.). **Compendium of brassica diseases**. Saint Paul: APS Press, 2007. p. 60-62.

ZACCARDELLI, M.; CAMPANILE, F., SPASIANO, A. Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene hrcC. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 118, p. 299–306, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9115-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-007-9115-y>. Acesso em: 15 jun. 2021.

APÊNDICE - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Meio 523 (Kado & Heskett, 1970)

Sacarose – 10g

Extrato de Levedura – 4g

Caseína ácida hidrolisada – 8g

K₂HPO₄ – 2g

MgSO₄ – 0,3g

Ágar – 15g

H₂O destilada – 1000 ml

Meio YDC (Schaad et al., 2001)

Glicose/Dextrose – 20g

Extrato de levedura – 10g

CaCO₃ – 20g

Ágar – 15g

H₂O destilada – 1000 ml

Meio NSCAA (Schaad et al., 2001)

Peptona – 5g

Extrato de carne – 3g

Amido solúvel – 15g

Ágar – 15g

H₂O destilada – 1000 ml

Meio NA (Schaad et al., 2001)

Peptona – 5g

Extrato de carne – 3g

Ágar – 15g

H₂O destilada – 1000 ml