

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DESENVOLVIMENTO DE qPCR PARA DETECÇÃO DE
Xanthomonas oryzae EM SEMENTES DE ARROZ

Ismail Teodoro de Souza Júnior
Eng. Agr., M.Sc. UFPel

Tese apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Ênfase em Fitopatologia

Porto Alegre (RS), Brasil
Janeiro de 2014

ISMAIL TEODORO DE SOUZA JUNIOR
Engenheiro Agrônomo - UFMG
Mestre em Ciências - UFPel

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOCTOR EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 30.01.2014
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 22.10.2014
Por

VALMIR DUARTE
Orientador - PPG Fitotecnia

GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

MARCELO GRAVINA DE MORAES
PPG Fitotecnia

ANDREIA MARA ROTTA DE OLIVEIRA
FEPAGRO

ANDREA BITTENCOURT MOURA
UFPel

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade
de Agronomia

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me oferecer mais essa oportunidade na vida, sem ele seria impossível cumprir mais essa etapa.

Aos meus pais, Ismail Teodoro e Milza Maria e meus irmãos Zélia, Amauri, Alcides e Maura, pelo apoio e motivação para a realização deste trabalho.

Ao professor Valmir Duarte, pela disponibilidade de orientação, conselhos e ensinamentos transmitidos ao longo dessa jornada.

Ao professor Marcelo Gravina de Moraes, pelo auxílio, orientação e grande contribuição para que esse trabalho fosse realizado.

Aos pesquisadores e professores Dra. Andréia Mara Rotta de Oliveira, Dr. Émerson Medeiros Del Ponte, Dr. Paul Nicholson, Dr. José Mauricio Fernandes, Dr. Roberto Lanna Filho, Dra. Andréa Bitencourt Moura e Dra. Casiana M. Vera-Cruz pela colaboração.

Aos demais professores, pelos ensinamentos transmitidos ao longo do doutorado.

Aos colegas do laboratório Yuliet Franco Cardoza, Jacqueline Flores Schimtz, Júlia Soares Mombelli, Mauren de Oliveira Santos, Miguel Verran e Bruna Canabarro Pozzebon, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos e colegas, Daniela, Nageli, Fernanda, Larissa, Paulo, Rita, Janaina, Leilane, Guilherme, Leonardo, Camila, Caroline, Sara, Julie, Ana,

Gustavo, Vladimir, Dana, Bárbara, Carla e Tiago pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade pela amizade e colaboração.

Ao programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de ser um de seus alunos.

À CAPES e ao CNPQ, pela disponibilização de bolsa de estudos.

A todos, o meu muito obrigado.

DESENVOLVIMENTO DE qPCR PARA DETECÇÃO DE *Xanthomonas oryzae* EM SEMENTES DE ARROZ¹

Autor: Ismail Teodoro de Souza Júnior

Orientador: Valmir Duarte

RESUMO

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (Xoo) e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc), agentes causais do crestamento foliar bacteriano (CFB) e estria bacteriana da folha (EBF), respectivamente, são pragas ausentes no Brasil, transmitidas por sementes, com potencial de comprometer seriamente a produção brasileira de arroz. O intercâmbio comercial de sementes aponta o exame laboratorial como estratégia fundamental na exclusão de tais pragas. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e validar um método de detecção, dos patovares de *X. oryzae* (Xo) em sementes de arroz através de qPCR. A sonda XRS foi desenvolvida e, apesar de não distinguir os dois patovares, sua alta sensibilidade, 30 fg/ μ L de DNA, equivalendo a seis células bacterianas, evidenciou sua eficiência. O método sem isolamento em meio de cultura permitiu detectar até $4,2 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹. A análise de 468 amostras (162 nacionais e 306 importadas) de sementes de arroz de três safras não indicou a presença de Xo. A caracterização de 21 isolados de *Xanthomonas* sp., positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo, mostrou variabilidade entre os isolados e a distinção destes de Xo.

¹ Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (70p.) Janeiro, 2014.

DEVELOPMENT OF qPCR FOR DETECTION OF *Xanthomonas oryzae* IN RICE SEEDS¹

Author: Ismail Teodoro de Souza Júnior

Advisor: Valmir Duarte

ABSTRACT

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (Xoo) and *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc), the causal agents of bacterial leaf blight (BLB) and bacterial leaf streak (BLS), respectively, are pests absent in Brazil, transmitted by seeds, with potential to seriously compromised the Brazilian rice production. The commercial interchange of seeds indicates the laboratory analysis as a fundamental strategy in the exclusion of such pests. The objective of this research was to develop and validate a method for detection of pathovars of *X. oryzae* (Xo) in rice seeds by qPCR. The XRS probe was developed and, despite not distinguish the two pathovars of Xo, its high sensitivity, 30 fg/ μ L of DNA, equivalent to six bacterial cells, demonstrated its efficiency. The method without isolation in culture medium, allowed to detect up to $4,2 \times 10^2$ CFU.mL⁻¹. The analysis of 468 samples of rice seeds (162 national and 306 imported) in three crops, not indicated the presence of Xo. Characterization of 21 isolates of *Xanthomonas* sp. positive on ELISA (Agdia, BRA 85000) to Xoo, showed variability among isolates and distinction from Xo.

¹ Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (70p.) January, 2014.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Cultura do arroz.....	4
2.2 O gênero <i>Xanthomonas</i>	5
2.3 <i>Xanthomonas oryzae</i>	7
2.4 Distribuição e danos.....	8
2.5 Sintomatologia e disseminação.....	9
2.6 Manejo.....	12
2.7 Diversidade genética.....	13
2.8 Métodos de detecção de Xo.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Desenvolvimento de qPCR para detecção dos patovares de Xo.....	20
3.1.1 Estirpes bacterianas.....	20
3.1.2 Extração de DNA.....	22
3.1.3 Desenho da sonda TaqMan® para detecção de Xo.....	22
3.1.4 Padronização de qPCR por quantificação absoluta para detecção de Xo.....	23
3.1.5 Teste de especificidade.....	24
3.1.6 Detecção de Xo em sementes de arroz inoculadas.....	25
3.1.7 Preparação da amostra.....	26
3.2 Levantamento de Xoo e Xoc em sementes de arroz das safras 2009/2010/2011.....	26
3.2.1 PCR multiplex para Xoo e Xoc por isolamento de sementes.....	26
3.2.2 qPCR para Xo pelo método direto a partir de sementes de arroz.....	27
3.3 Caracterização de isolados bacterianos de sementes de arroz positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo).....	28
3.3.1 Isolados bacterianos.....	28
3.3.2 Produção do pigmento xantomonadina.....	29
3.3.3 PCR para <i>Xanthomonas</i>	30
3.3.4 Crescimento em meio Waquiimoto Modificado.....	30
3.3.5 Utilização de fontes de carbono.....	31

	Página	
3.3.6	Sensibilidade dos isolados a antibióticos.....	32
3.3.7	Reação de hipersensibilidade em plantas de tomate tabaco	32
3.3.8	Teste de patogenicidade em plantas de arroz.....	33
3.3.9	Detecção de <i>X. oryzae</i> por qPCR.....	34
3.3.10	Detecção de Xoo e Xoc por PCR multiplex	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1	Desenvolvimento de qPCR para detecção de Xo.....	35
4.2	Caracterização de isolados bacterianos de sementes de arroz positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo.....	41
4.2.1	Teste KOH e oxidase.....	41
4.2.2	Produção do pigmento xantomadina.....	42
4.2.3	PCR para <i>Xanthomonas</i>	43
4.2.4	Crescimento em meio Waquimoto Modificado.....	44
4.2.5	Utilização de fontes de carbono.....	45
4.2.6	Sensibilidade dos isolados a antibióticos.....	47
4.2.7	Reação de hipersensibilidade e patogenicidade	50
4.2.8	PCR multiplex e qPCR.....	50
5	CONCLUSÕES.....	54
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
7	APÊNDICE.....	66

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Estirpes bacterianas utilizadas no estudo como referência em qPCR. Porto Alegre, RS, 2014.....	21
2. Número de amostras de sementes de arroz nacionais e importadas. Porto Alegre, RS, 2014.....	28
3. Isolados bacterianos de sementes de arroz falso-positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) contra Xoo. Porto Alegre, RS, 2014.....	29
4. Oligonucleotídeos iniciadores da PCR multiplex para detecção de Xoo e Xoc. Porto Alegre, RS, 2014.....	34
5. Quantidade de DNA dos padrões de <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2014.....	38
6. Crescimento em meio seletivo Waquimoto modificado, presença de xantomadina e produtos da PCR e qPCR de isolados bacterianos positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo. Porto Alegre, RS, 2014.....	45
7. Sensibilidade de isolados bacterianos positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo a antibióticos. Porto Alegre, RS, 2014.....	47

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Especificidade da sonda XRS, com DNA de Xoo 620 (<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>), Xoo 644 (<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>), Xoc 005 (<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>), <i>Pectobacterium brasiliensis</i> , <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> . Porto Alegre, RS, 2014.....	36
2. Curva de calibração da concentração de DNA (ng/ μ L) de Xo em relação ao ciclo threshold. Porto Alegre, RS, 2014.....	37
3. Alinhamento de sequências do gene receptor de sideróforos da estirpe Xoc 005 com outras estirpes de Xoo e Xoc. Porto Alegre, RS, 2014.....	40
4. Curva típica (com picos em 440 nm e ombros em 420 e 460 nm) que representa a presença do pigmento xantomonadina em isolados bacterianos. Porto Alegre, RS, 2014.....	42
5. Perfil eletroforético da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores 16F27 e 16R1525 com tamanho de 1518 pb. (M) marcador, (C-) água, (C+) controle positivo com <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> , (Is 1-6) isolados positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo oriundos de sementes de arroz. Porto Alegre, RS, 2014.....	43
6. Dendograma de similaridade na utilização de fontes de carbono entre 18 isolados de <i>Xanthomonas</i> de sementes positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo. Porto Alegre, RS, 2014.....	49
7. Perfil eletroforético da PCR multiplex com oligonucleotídeos iniciadores Xoo80 (162 pb), Xo3756 (331 pb), Xoc 3866 (691) e Xoc 3864 (945 pb). (M) marcador, (1) água, (2) Xoo, (3) Xoc (4-8) Isolados de <i>Xanthomonas</i> sp. Porto Alegre, RS, 2014.....	51

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) está entre os cereais mais importantes em valor econômico e social, constituindo-se a base da alimentação de vários povos em todo mundo. Aproximadamente 90% do arroz produzido no mundo são cultivados na Ásia. O Brasil se destaca como o principal produtor fora do continente Asiático, responsável por 11.600 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2013).

Sementes podem abrigar e transportar um grande grupo de microrganismos patogênicos. Essas associações podem ocasionar grandes epidemias no campo de produção com até 100% de perdas (Goto *et al.*, 1988; Machado, 2000). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) são consideradas as bactérias mais importantes para a cultura do arroz pelos prejuízos que causam (Xie, 1998; Niño-Lio *et al.*, 2006). Xoo e Xoc são responsáveis por causar o crestamento foliar bacteriano (CFB) e a estria bacteriana da folha (EBF), respectivamente. No caso do Brasil, de acordo com a Instrução Normativa nº 41 de 01 de julho de 2008 (D.O.U., 2008), atualizada pela Instrução Normativa nº 59/2013 (D.O.U. 2013), as bactérias Xoo e Xoc são consideradas pragas quarentenárias ausentes no país. Neste contexto, essas bactérias, caso introduzidas no país, comprometeriam seriamente a produção nacional de arroz (Parizzi & Morandini, 2001).

A presença de Xoo e Xoc tem sido constatada em sementes, o que demonstra a importância da detecção destas, em programas de certificação e em medidas quarentenárias de controle fitossanitário (Sakthivel *et al.*, 2001). O órgão brasileiro de fiscalização fitossanitária já interceptou sementes de arroz importadas, oriundas do Uruguai, Estados Unidos e Índia, infectadas com Xoo (Moura *et al.*, 2000; Hahn, 2007). O risco da introdução da Xoo no Brasil já foi estabelecido em estudos de análise de risco de pragas, pois o patógeno tem elevado potencial de adaptação em zonas de clima temperado e tropical do país (Martins & Oliveira, 2007).

Com o aumento do intercâmbio comercial de sementes de arroz entre países, tornou-se necessária a implementação de medidas fitossanitárias que minimizem os riscos da entrada de pragas ausentes nos países importadores (Parizzi & Morandini, 2001). Em 2013, o Brasil importou 3.845.570 kg de sementes de arroz, 89,5% deste total foi oriundo da Argentina, seguido dos Estados Unidos e Uruguai (ALICEWEB, 2013).

As técnicas empregadas para a detecção de Xoo e Xoc são baseadas em ensaios biológicos, bioquímicos, sorológicos (ELISA) e moleculares, (Gossele *et al.*, 1985; Gnanamanickam *et al.*, 1999; Sakthivel *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2010). Com o advento das tecnologias moleculares mais modernas, as técnicas baseadas em PCR têm sido consideradas as mais promissoras para a detecção de patógenos (Ozakman & Schaad, 2003). Entre as técnicas moleculares, a PCR em tempo real (qPCR) é o método mais utilizado na detecção de fitopatógenos por permitir quantificar produtos de amplificação a cada ciclo da PCR (Schaad & Frederick, 2002; De Boer *et al.*, 2007).

A variabilidade intraespecífica e a proximidade genética entre os dois patovares resultam, com frequência, em problemas de identificação e diferenciação dos patovares de *X. oryzae* (Xo). Somado a isso, é comum observar reações cruzadas com outras espécies de *Xanthomonas*, tanto no uso de métodos sorológicos, quanto naqueles baseados na PCR, o que pode levar a resultados falso-positivos (Janse, 2005).

As limitações na sensibilidade e especificidade dos testes biológicos, sorológicos e moleculares disponíveis para a detecção de Xoo e Xoc, fundamentam a importância de uma proposta para o desenvolvimento de testes moleculares e posterior adoção de medidas de contingência a fim de proteger essa importante cadeia produtiva do agronegócio brasileiro. Além disso, justifica-se pelo interesse e a necessidade de implantação de métodos sensíveis e reproduzíveis, que possam ser adotados pelos laboratórios fitossanitários, com o objetivo de melhor atender a legislação fitossanitária em vigor e prevenir a entrada dessas pragas no Brasil.

Com isso, o presente trabalho teve como objetivo principal padronizar e validar um método para detecção molecular dos patovares de *X. oryzae* presentes em sementes de arroz. Os objetivos específicos: (i) Desenhar uma sonda para *X. oryzae* para detecção por qPCR (Sistema TaqMan[®]); (ii) Analisar amostras de sementes de arroz nacionais e importadas nas safras de 2009, 2010 e 2011; (iii) validar resultados positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) disponível para identificação de Xoo, oriundos de sementes de arroz, com métodos moleculares, biológicos e bioquímicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura de destaque mundial sendo cultivado em todos os continentes com exceção da Antártida, em regiões de monções, tropicais e subtropicais, posicionando-se entre os cultivos de maior importância, tanto sob o ponto de vista de consumo, quanto de geração de renda aos agricultores dedicados a essa atividade (AGRIANUAL, 2008).

O arroz é uma gramínea anual (Poaceae), classificada no grupo de plantas C-3, adaptada a ambientes aquáticos devido à presença de aerênquima no colmo e nas raízes das plantas, possibilitando a passagem de oxigênio do ar para a camada da rizosfera (SOSBAI, 2012). O ciclo de desenvolvimento da cultura pode ser dividido em três fases: a fase de plântula (semeadura até a emergência); a fase vegetativa (emergência até o aparecimento do colar da última folha no colmo principal) e a fase reprodutiva (diferenciação da panícula até a maturação fisiológica) (Counce *et al.*, 2000). A duração de cada fase depende, principalmente, da cultivar utilizada, época de semeadura, região de cultivo e das condições da fertilidade do solo. O ciclo de vida para a maioria das cultivares comerciais varia entre 100 e 140 dias (SOSBAI, 2012).

O arroz é o segundo cereal mais cultivado no mundo, e a área ocupada para o plantio é de aproximada de 158 milhões de ha, que representa uma

produção de 489 milhões de t (FAO, 2013). Em torno de 90% da produção de arroz é oriunda do continente Asiático. O Brasil é o maior produtor de arroz da América Latina e o nono mundial com uma produção anual entre 11 e 13 milhões de t, participando com cerca de 82% da produção do MERCOSUL (SOSBAI, 2010; FAO, 2013). Na safra 2012/2013 a América Latina produziu 24,5 milhões de t, enquanto que o Brasil foi responsável por uma produção de 11,6 milhões de t (FAO, 2013). No Brasil, a produção se concentra nos estados da região sul, principalmente no estado do Rio Grande do Sul, que é considerado o maior produtor, com uma área cultivada de aproximadamente um milhão de ha, representando 44,5% da área nacional, respondendo ainda por 67,0% da produção brasileira (CONAB, 2013).

Aproximadamente metade da população mundial, em torno de 2,4 bilhões de pessoas tem o arroz como alimento básico, sendo mais relevante em países em desenvolvimento e nos países asiáticos (EMBRAPA, 2008). Estima-se que o arroz represente 21% da energia e 14% da proteína consumida mundialmente (Kennedy & Burlingame, 2003).

2.2 O gênero *Xanthomonas*

De acordo com a classificação filogenética baseada nas comparações de sequências do rRNA 16S, o gênero *Xanthomonas* pertence ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Xanthomonadales e família Xanthomonadaceae e inclui diversas espécies fitopatogênicas, muitas das quais provocam importantes doenças em plantas cultivadas, bem como em plantas não cultivadas (Garrity & Holt, 2000; Garrity, 2007).

Xanthomonas atualmente compreende 27 espécies com nomenclatura validada, incluindo algumas subespécies e centenas de patovares (Parkinson *et al.*, 2007). Durante a década de 1990 o gênero passou por reclassificações, baseado principalmente no índice de hibridização DNA-DNA, onde novas espécies foram criadas, patovares elevados ao status de espécie e outras espécies substancialmente alteradas. Esta reclassificação do gênero foi necessária em virtude da grande diversidade genética encontrada com o desenvolvimento das análises moleculares, em oposição às características fenotípicas bastante homogêneas (Vauterin *et al.*, 1995; Vauterin *et al.*, 2000).

Mundialmente, as espécies deste gênero podem provocar doenças em pelo menos 124 espécies de plantas monocotiledôneas e 268 de dicotiledôneas (Chan & Goodwin, 1999). As espécies de *Xanthomonas* podem provocar uma variedade de sintomas incluindo necroses, cancrios, manchas, queimas, afetando folhas, caules e frutos. Apesar de, como gênero, a gama de hospedeiros ser vasta, individualmente cada espécie e seus patovares apresenta um leque de hospedeiros bastante restrito, marcado pela especificidade dos locais de entrada na planta e pelos tecidos infectados. Assim, estes agentes fitopatogênicos podem penetrar na planta através dos estômatos, colonizando os espaços intercelulares do mesófilo ou ainda através de hidatódios ou ferimentos, colonizando a planta através do seu sistema vascular (Leyns *et al.*, 1984).

A maioria dos membros do gênero *Xanthomonas* produz um pigmento amarelo ligado à membrana, denominado xantomonadina (Starr, 1977). Embora seja uma característica importante para identificação do gênero, algumas linhagens podem não apresentar a pigmentação (Garrity *et al.*, 2005).

2.3 *Xanthomonas oryzae*

Xanthomonas oryzae (Xo) é Gram-negativa apresentando células em forma de bastonetes, com dimensões que variam entre 0,7 µm e 2 µm de comprimento e entre 0,4 µm e 0,7 µm de largura, sendo móveis devido à presença de um único flagelo polar. Forma colônias amarelas, devido à produção de carotenóides fotoprotetores chamados xantomonadinas, e altamente mucoides, devido à produção do exopolissacarídeo (EPS) xantana. O EPS é importante na formação do exsudato bacteriano nas folhas infectadas, e também é essencial à sobrevivência das células bacterianas, oferecendo proteção contra radiação UV, congelamento, dessecação (Ou, 1972; Swings *et al.*, 1990; Meyer & Bogdanove, 2009).

Os patovares de Xo são estreitamente relacionados geneticamente, tendo apresentado mais de 90% de similaridade em testes de hibridização de DNA (Swings *et al.*, 1990; Rademaker *et al.*, 2000).

Xanthomonas oryzae é catalase-positiva, incapaz de reduzir nitrato e um produtor fraco de ácidos a partir de carboidratos (Bradbury, 1986). Os patovares *oryzae* e *oryzicola* podem ser diferenciados através de testes laboratoriais pela (a) produção de acetoina (Xoo-, Xoc+), (b) utilização de L-alanina como única fonte de carbono (Xoo-, Xoc+), (c) peptonização forte de leite de Litmus (Xoo-, Xoc+), (d) fenilalanina deaminase (Xoo-, Xoc+), (e) resistência a 0,001% Cu (NO₃)₂ (Xoo+, Xoc-) e (f) hidrólise de gelatina (Xoo-, Xoc+) (Gossele *et al.*, 1985; Webster & Gunnel, 1992; Vera Cruz *et al.*, 2012).

2.4 Distribuição e danos

O crestamento bacteriano foliar (CBF) do arroz e a estria bacteriana da folha (EBF) do arroz são causados pelas bactérias *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Fang *et al.*) Swings *et al.*, respectivamente, são doenças endêmicas na maioria dos países da Ásia e parte da África Ocidental.

Xoo foi detectada pela primeira vez no Japão, em 1884, em plantas de arroz com sintomas de crestamento (Goto, 1992). O CBF ocorre em regiões de climas tropicais e temperados da Ásia, além disso, já foram relatadas ocorrências na Austrália, Estados Unidos, América Central, Venezuela, Equador e Bolívia (Mew *et al.*, 1993; Delgado, 2002; OEPP/EPPO, 2007). A EBF é mais restrita a regiões tropicais e subtropicais da Ásia, incluindo o sul da China, Tailândia, Malásia, Índia, Vietnã, Filipinas e Indonésia, além de afetar regiões de cultivo de arroz no norte da Austrália e em partes do Oeste da África e Brasil (Singh *et al.*, 1980; Ou, 1985; Sigee, 1993; OEPP/EPPO, 2007; Shafer *et al.*, 2009).

O CFB é um das mais graves doenças do arroz, causando perdas que variam de 20 a 30% da produção, podendo chegar a 50% quando as condições são favoráveis à doença (Reddy *et al.*, 1979; Ou, 1985). Em regiões tropicais o CFB é mais destrutivo, sendo que foram relatadas nas Filipinas, Indonésia e Índia, perdas de 60-75% da lavoura, devido à síndrome kresek do CFB, a qual afeta mudas recém-transplantadas (Reddy *et al.*, 1979; Ou, 1985). Além da redução na produtividade, o CFB também pode afetar a qualidade dos grãos, por interferir na maturação (Ou, 1985; Goto, 1992).

As perdas de rendimento devido a EBF costumam variar de 1,5 a 20% dependendo da cultivar de arroz e das condições climáticas. Sob condições favoráveis para a disseminação, esta doença pode afetar áreas inteiras e causar danos comparáveis com o CFB, com reduções de até 32% da produção de grãos (Ou, 1985; IRRI, 2009). Apesar de ser considerada menos importante economicamente que CBF, esta doença atingiu proporções epidêmicas em partes da China, tornando-se uma das quatro principais doenças do arroz (Xie & Mew, 1998).

Além de causar doenças em arroz os dois patovares possuem outros hospedeiros, que podem servir de fonte de inóculo para as doenças. Alguns dos hospedeiros alternativos de Xoo são espécies de Poaceae, *Cenchrus ciliaris*, *Cynodon dactylon*, *Cyperaceae* spp., *Cyperus difformis*, *C. rotundus*, *Echinochloa crus-galli*, *Leersia hexandra*, *L. oryzoides*, *Oryza* spp., *Panicum maximum*, *Paspalum scrobiculatum*, *Urochloa mutica*, *Zizania aquatica* *Z. palustris* e *Zoysia japonica* (CABI, 2007). Para Xoc, são: *Oryza* spp., *Leersia* spp., *Leptochloa filiformis*, *Paspalum orbiculare*, *Zizania aquatica*, *Z. palustris* e *Zoysia japonica* (OEPP/EPPO, 2007).

2.5 Sintomatologia e disseminação

Os sintomas de CFB e EBF são facilmente diferenciados nos estágios iniciais da doença e refletem os diferentes modos de infecção de cada patógeno. Os sintomas de CFB geralmente tornam-se evidentes na fase de perfilhamento com as folhas apresentando pequenas manchas encharcadas nas pontas e nas margens das folhas. As manchas se expandem ao longo das nervuras, tornam-se cloróticas e necróticas, formando lesões com coloração

em tons de cinza a branco opaco (Gnanamanickam *et al.*, 1999; Akhtar *et al.*, 2008).

Diferentemente de CBF, os sintomas de EBF iniciam como pequenas lesões encharcadas em qualquer lugar da folha entre as nervuras. As nervuras atuam como barreiras das áreas infectadas, as lesões se expandem longitudinalmente, resultando no sintoma de estrias tipicamente translúcidas e amarelas ao qual é denominada a doença. Com o progresso da doença as folhas infectadas adquirem coloração branca acinzentada. Dependendo das condições de crescimento, do grau de resistência das cultivares e com o progresso das doenças a distinção entre os sintomas de CBF e EBF se tornam menos nítidas (Xie & Mew, 1998; Niño-Liu *et al.*, 2006). Além disso, a campo as duas doenças podem ocorrer simultaneamente, e as folhas podem exibir sintomas de ambas as doenças (Goto, 1992; Mew *et al.*, 1993).

Além do CFB, o patovar *oryzae* pode causar uma síndrome em mudas de arroz que são transplantadas a partir de viveiros para o campo, esta síndrome é denominada Kresek, e é beneficiada pela prática comum de cortar as pontas das folhas antes do transplântio, esses cortes servem como aberturas para infecção, e em 2-3 semanas após o transplântio, a maioria das plantas morre e as que sobrevivem apresentam crescimento atrofiado e a planta inteira apresenta coloração amarelada (Goto, 1992; Nyvall, 1999).

Xoo penetra na folha de arroz através dos hidatódios nas margens das folhas, a bactéria multiplica-se nos espaços intercelulares da epiderme, e colonizam o xilema, além disso, podem ter acesso ao xilema pelas aberturas na base da bainha da folha e também pelos ferimentos (Ou, 1985; Gnanamanickam *et al.*, 1999; Akhtar *et al.*, 2008). Com a colonização dos

vasos do xilema, as células bacterianas podem extravasar para fora dos hidatódios formando fios de exsudatos, sendo este um sinal característico da doença, além de uma fonte de inóculo secundário (Mew *et al.*, 1993).

EBF, ao contrário de CBF, não é uma doença sistêmica, a bactéria penetra na folha do arroz, principalmente através dos estômatos e também por ferimentos, multiplica-se na cavidade subestomática e em seguida coloniza os espaços intercelulares do parênquima (Ou, 1985). Em condições de alta umidade, Xoc também pode extravasar exsudato amarelo, no entanto, esses são vistos na superfície da folha (Mew *et al.*, 1993).

Surtos de ambos, CBF e EBF, são mais prováveis de ocorrer durante a estação de monções dos continentes Asiático e Índico, a partir de junho a setembro, do que em outras épocas do ano (Mew *et al.*, 1993). Epidemias graves ocorrem frequentemente após tufões, ventos fortes, chuvas e granizo, os quais provocam ferimentos nas plantas facilitando a dispersão das bactérias. As bactérias também podem ser disseminadas pela água de irrigação, bem como por seres humanos, inseto e aves (Ou, 1985; Nyvall, 1999).

Nas regiões temperadas, Xoo pode sobreviver no solo durante 1-3 meses, dependendo da umidade e acidez do solo. Nas regiões tropicais onde ocorre, a temperatura, umidade, abundância de plantas hospedeiras e os restos culturais permitem que Xoc e Xoo persistam no campo ao longo do ano (Ou, 1985). A principal forma de disseminação destas bactérias, a longas distâncias se dá pelas sementes contaminadas (Kauffman & Reddy, 1975; Sakthivel *et al.*, 2001). Ambos patovares podem ser isolados a partir de

sementes de plantas infectadas e a transmissão pelas sementes tem sido demonstrada (Mew *et al.*, 1993; Xie & Mew, 1998; Sakthivel *et al.*, 2001).

2.6 Manejo

As medidas de manejo para CBF e EBF incluem práticas culturais, químicas, controle biológico, previsão de epidemias e, a mais importante o uso de cultivares com resistência genética. Poucos estudos têm sido realizados sobre métodos de controle para EBF, embora muitas das mesmas medidas utilizadas para o controle de CBF podem ser eficazes contra EBF (Niño-Liu *et al.*, 2006).

Dentre as práticas culturais utilizadas para o manejo de CBF e EBF estão a remoção de plantas doentes e plantas hospedeiras, retirada dos restos culturais antes do plantio, a fertilização evitando o excesso de nitrogênio, uma vez que estimula o rápido crescimento vegetativo das plantas, favorecendo o desenvolvimento da doença e do uso adequado do espaçamento entre plantas (Mizukami & Wakimoto, 1969; Goto, 1992).

O controle químico de CBF iniciou-se com a aplicação da calda bordalesa e também com derivados de estreptomicina e compostos de mercúrio, no entanto, estes danificaram os grãos de arroz (Mizukami & Wakimoto, 1969). Diferentes tipos de agroquímicos foram desenvolvidos para o controle de CBF, no entanto a maioria não apresentou resultados confiáveis, devido principalmente à variabilidade na sensibilidade da população do patógeno aos produtos (Mizukami & Wakimoto, 1969; Gnanamanickam *et al.*, 1999). A desinfestação de sementes de arroz com soluções de antibióticos ou com água quente a 52 °C por 30 min é praticado em alguns países (Mizukami

& Wakimoto 1969; Goto, 1992). O controle químico é impraticável e nenhum bactericida eficiente está disponível comercialmente para o controle da doença (Ou, 1973; Lee *et al.*, 2003).

O desenvolvimento e o uso de cultivares resistentes com genes de resistência têm sido a abordagem mais eficaz para o manejo das doenças causadas pelos patovares de *Xo*. A maioria dos estudos sobre mecanismos de resistência de arroz aos patovares de *Xo* tem sido desenvolvida para o crescimento bacteriano do arroz pouco tem se elucidado em relação aos mecanismos de patogênese e da resistência da doença da estria bacteriana (Niño-Liu *et al.*, 2006).

Até o momento mais de 30 genes de resistência foram identificados para o controle de CBF (White & Yang, 2009). Esses genes foram identificados principalmente a partir de *O. sativa*, de algumas das variedades *indica* e *japonica*, de espécies selvagens relacionadas, incluindo *O. longistaminata*, *O. rufipogon*, *O. minuta* e *O. officinalis* (Brar & Khush, 1997; Lee *et al.*, 2003). Vários desses genes foram incorporados em cultivares de arroz em vários países na Ásia (Leung *et al.*, 2004; Collard *et al.*, 2008; Sundaram *et al.*, 2008).

2.7 Diversidade genética

Xoo é caracterizada por um elevado grau de especificidade raça-cultivar. Existem mais 30 raças relatadas de *Xoo* em vários países (Noda *et al.*, 1996; Adhikari *et al.*, 1999). Um conjunto de raças identificadas nas Filipinas usando cinco cultivares de arroz tem sido amplamente utilizado para identificação e classificação de resistência ao CBF em outras cultivares (Ogawa *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2003).

A variabilidade intraespecífica dessas bactérias tem sido analisada utilizando diferentes classes de marcadores moleculares, tais como isoenzimas, RFLP, rep e Box-PCR, AFLP e RAPD que revelaram alta variabilidade nas populações de Xoo da Ásia, Austrália, sudoeste da África e Estados Unidos (Jones *et al.*, 1989; Nelson *et al.*, 1994; Ryba-White *et al.*, 1995; Adhikari *et al.*, 1999; Lore *et al.*, 2011).

Com base na análise de RFLP e patótipo, 308 isolados de Xoo, de diferentes regiões da Ásia, demonstraram ter um alto grau de diversidade genética entre os isolados (Adhikari *et al.*, 1995). Na Índia, 18 isolados foram analisados por RAPD sendo estes agrupados em cinco grupos (Gupta *et al.*, 2001). No Norte do Vietnã foram observadas seis raças de um total de 41 isolados de Xoo testados com diferentes cultivares de arroz (Dinh *et al.*, 2008). A caracterização genética de estirpes Xoo africanas mostrou que elas formam um grupo separado de Xoo oriundas da Ásia e estão mais relacionadas com estirpes de Xoc (Gonzalez *et al.*, 2007). A caracterização de isolados dos EUA os colocou em um grupo a parte de Xoo e Xoc oriundos da África e Ásia (Triplett *et al.*, 2011).

Nas Filipinas análises de RFLP de 123 estirpes de Xoc de diferentes locais mostraram uma diversidade semelhante à de Xoo (Raymundo *et al.*, 1999). Outros 67 isolados de Xoc oriundos da região de Burkina Faso e Mali na África foram caracterizados com “Multi Locus Sequence Analysis” (MLSA) usando seis genes *housekeeping* e RFLP e indicou a formação de diferentes grupos de Xoc (Wonni *et al.*, 2013).

O alinhamento dos genomas de diferentes estirpes de Xoo revelou um grande número de inversões, translocações, inserções e deleções. Essa

diversidade entre o genoma de Xoo é impulsionado pelo grande número de elementos de sequência de inserção (IS), que representam até 10% do genoma Xoo (Salzberg *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2011).

Outra característica marcante do genoma de Xoo é a abundância de efetores do tipo transcricionais ativadores (TAL). Estes são proteínas bacterianas que são injetadas nas células hospedeiras por meio de um sistema de secreção de tipo III. A região central da proteína TAL consiste em até 25 repetições de 34 aminoácidos. Uma vez na célula da planta, os efetores TAL entram no núcleo, se ligam a sequências complementares do DNA e ativam genes no hospedeiro que facilitam a colonização e infecção bacteriana (Bogdanove *et al.*, 2010). Estudos genéticos têm sugerido que a atividade de elementos IS e da recombinação entre os genes de efetores TAL contribuíram para a estrutura diversificada dentro Xoo (Ochiai *et al.*, 2005). A estirpe de Xoo PXO99A possui 19 genes TAL em seu genoma (Salzberg *et al.*, 2008), alguns dos quais são fatores de virulência críticos para CBF (Bai *et al.*, 2000; White & Yang, 2009). O número de efetores TAL em um grupo de estirpes de Xoo africanas é reduzido em comparação com os isolados asiáticos. As estirpes de Xoo africanas possuem apenas oito genes TAL em seus genomas (Gonzalez *et al.*, 2007). Esse número também é reduzido em isolados de Xo dos EUA (Triplett *et al.*, 2011).

2.8 Métodos de Detecção de Xo

A utilização de métodos rápidos, específicos e sensíveis que possam detectar o patógeno em baixos níveis a partir do material vegetal é um passo essencial para contenção ou eliminação de patógenos. No entanto,

ferramentas de diagnóstico robustas e de baixo custo não estão disponíveis para identificação e classificação de muitos fitopatógenos. As técnicas empregadas para a detecção de Xoo e Xoc são baseadas em ensaios biológicos, bioquímicos, sorológicos (ELISA) e moleculares (Gossele *et al.*, 1985; Gnanamanickam *et al.*, 1999; Sakthivel *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2010; Vera Cruz *et al.*, 2012).

A partir dos anos 90, novas abordagens no diagnóstico de doenças bacterianas tornaram-se possíveis. A PCR surge como uma alternativa para a detecção de bactérias fitopatogênicas devido à sua alta sensibilidade e especificidade (Seal *et al.*, 1993; Pastrik & Maiss, 2000, Sakthivel *et al.*, 2001). Os oligonucleotídeos iniciadores e a Taq polimerase podem ser sensíveis a inibidores presentes nas amostras vegetais. Alguns compostos químicos utilizados na extração de DNA, também podem interferir na amplificação do DNA-alvo e limitam o uso da PCR para a detecção direta das bactérias a partir de amostras naturais (Pastrik & Maiss, 2000; Alvarez, 2004; Zhao *et al.*, 2007). Vários compostos de materiais vegetais podem inibir a PCR, e isso pode levar a resultados falso-negativos. Os inibidores da PCR a partir de plantas incluem polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e outros metabólitos secundários de plantas (Rossen *et al.*, 1992; Tenggel *et al.*, 2001; Holden *et al.*, 2003). Com isso, novos protocolos, utilizando diferentes aditivos, foram incluídos na PCR, tais como, a albumina de soro bovino (BSA), dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, detergentes não iônicos, formamida e polivinilpirrolidona (PVP) (Picard *et al.*, 1992; Kreader, 1996; Roux, 1995). A detecção direta de Xoo, Xoc e *Acidovorax*, a partir de sementes de arroz por PCR, foi possível

utilizando um protocolo com adição de PVP e sulfito de sódio (Vera Cruz *et al.*, 2012).

Para detecção dos patovares de *Xo* pela PCR, têm sido utilizados oligonucleotídeos iniciadores baseados na região 16S-23S rDNA, elementos de sequências de inserção (IS), gene da proteína da membrana de fusão, gene receptor de sideróforos, genes da família *hrpF*, proteínas hipotéticas, lipossacarídeos (LPS), e glicosiltransferase (Adachi & Oku, 2000; Sakthivel *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2007; Kang, 2008; Lang *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2011).

Dentre as variantes da PCR se destaca a PCR em tempo real que tem como principal particularidade a estimativa em tempo real da amplificação (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa ou PCR em tempo real quantitativa ou simplesmente qPCR, foi descrita pela primeira vez em 1993, por Higuchi e seus colaboradores. Uma câmera de vídeo foi acoplada a um sistema de PCR, de modo a monitorar a PCR durante todos os ciclos. Este mecanismo permitiu detectar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizadas (Higuchi *et al.*, 1993).

A qPCR apresenta diversas vantagens sobre a PCR, tais como a ausência da eletroforese em gel de agarose para detectar o produto da reação, uma vez que a leitura e a mensuração do acúmulo de produtos são obtidas a cada ciclo, usando um dos dois sistemas: uma molécula química intercalante de DNA de fita dupla (SYBR Green) ou um sistema que utilize sonda de oligonucleotídeos marcada com fluoróforos nas extremidades 3' e 5' (sistema TaqMan®, sondas FRET®, Molecular Beacons® e oligonucleotídeos

Scorpions®) (Schaad & Frederick, 2002). Com isso pode-se quantificar o número de células de um patógeno que estejam presentes em amostras (Schaad *et al.*, 1999; Weller *et al.*, 2000; Carvalho, 2009).

Sistemas que utilizam oligonucleotídeos marcados com fluoróforos ou sondas também marcadas com fluoróforos nas extremidades 5' e 3' são mais específicos do que o sistema utilizando o intercalante de DNA de fita dupla, visto que estes somente hibridizam-se com regiões específicas do DNA, gerando a fluorescência somente quando essas sondas são degradadas (Schaad & Frederick, 2002; De Boer *et al.*, 2007).

O sistema utilizando sondas de hidrólise Taqman® requer dois oligonucleotídeos iniciadores específicos que amplificam um fragmento de DNA de 50- 300 pb, e uma sonda marcada com fluoróforos homóloga a uma região específica do produto de amplificação. A sonda apresenta a extremidade 5' marcada com um fluoróforo repórter e a extremidade 3' com uma molécula denominada "quencher" (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Quando o fluoróforo repórter se encontra próximo do "quencher", nenhum sinal de fluorescência dissipa da molécula repórter. Isso ocorre quando a sonda está livre na mistura da reação, ou recém-hibridizada a sequência do DNA-alvo. Na fase de hibridização da PCR, a sonda irá ligar-se a sequência complementar e posteriormente, durante a amplificação, a atividade exonucleotídica 5' da Taq polimerase degrada a sonda, separando os fluoróforos, resultando na leitura do sinal de fluorescência do fluoróforo repórter. Ciclos repetidos da PCR resultam em amplificação exponencial do produto amplificado e o acúmulo de sondas degradadas, aumenta a intensidade da fluorescência até um ponto onde pode ser detectada,

ultrapassando o limiar Ct (cycle threshold) (Schaad & Frederick, 2002; De Boer *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

A medição da fluorescência a cada ciclo mostra-se como uma forma para analisar a cinética da reação, eficiência e quantificar o acúmulo de produtos (Applied Biosystems, 2008). A eficiência (E) da amplificação é fundamental para o sucesso da técnica. Esta deve variar idealmente entre os 90 e 100% ($-3,6 > \text{declive} > -3,1$), podendo ser determinada através de métodos diversos. O mais simples baseia-se na equação: $E = 10^{(-1/\text{declive})} - 1$.

A mensuração da fluorescência a cada ciclo elimina a necessidade de processamento após a PCR para revelar a presença do produto desejado, onde as leituras de fluorescência podem ser usadas simplesmente para determinar a presença ou ausência do DNA amplificado, corroborando com a presença ou ausência da bactéria-alvo nas amostras (De Boer *et al.*, 2007). O número de ciclos requerido para atingir um limiar pré-determinado (Ct) é correlacionado com a concentração de DNA originalmente presente na amostra (Applied Biosystems, 2008). As vantagens desse método em geral são: possibilidade de detecção quantitativa dos patógenos, potencial para o uso em um número elevado de amostras e a ausência da necessidade de análise pós-PCR, além da rapidez na obtenção dos dados (≤ 1 a 2 h) (Schaad & Frederick, 2002; De Boer *et al.*, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Bacteriologia Vegetal e Fitopatologia Molecular do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, e no Laboratório de Fitopatologia no John Innes Centre (JIC), Norwich, Reino Unido.

3.1 Desenvolvimento de qPCR para detecção de Xo

3.1.1 Estirpes bacterianas

As estirpes bacterianas utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 1. Para as estirpes de Xoo e Xoc foi utilizado apenas o DNA genômico, exceto para as estirpes das Filipinas que também foram crescidas e analisadas no Reino Unido. Estas foram cultivadas rotineiramente em meio CPG (casamino ácido, peptona, glicose e ágar) e ágar nutritivo (NA: peptona, extrato de carne, extrato de levedura, cloreto de sódio e ágar) (Schaad *et al.*, 2001). Para a reativação de linhagens preservadas por liofilização, as ampolas, contendo as culturas bacterianas liofilizadas, foram desinfestadas externamente com álcool a 70 %. Em seguida, foram hidratadas com 200 µL de água destilada esterilizada. Após incubação por 30 min, 10 µL da suspensão da ampola. foram diluídos em 1,5 mL de água

destilada esterilizada. Em seguida as estirpes bacterianas foram cultivadas sob agitação (150 rpm) em caldo LB (Luria-Bertani: triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio) a 28 °C por 24-48 h. Cada cultura bacteriana foi conservada em glicerol 40% em ampolas de criopreservação identificadas, e depositadas em freezer a -20 °C.

TABELA 1. Estirpes bacterianas utilizadas no estudo como referência em qPCR. Porto Alegre, RS, 2014.

Isolados¹	Parte, Hospedeiro	Origem
Xoc 001	Folha, arroz	Índia
Xoc 002	Folha, arroz	Índia
Xoc 003	Folha, arroz	Índia
Xoc 004	Folha, arroz	Índia
Xoc 005	Folha, arroz	Índia
Xoo 092	Folha, arroz	Índia
Xoo 639	Folha, arroz	Índia
Xoo 635	Folha, arroz	Índia
Xoo 192	Folha, arroz	Índia
Xoo 089	Folha, arroz	Índia
Xoo 620	Folha, arroz	Índia
Xoo 644	Folha, arroz	Índia
Xoo 071*	Folha, arroz	Filipinas
Xoc 246*	Folha, arroz	Filipinas
Xoc 279*	Folha, arroz	Filipinas
Xoc 256*	Folha, arroz	Filipinas
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	Folha, laranja	Brasil
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Folha, couve	Brasil
<i>Xanthomonas</i> sp.	Semente, arroz	Brasil
<i>Xanthomonas</i> sp. 3021	Semente, arroz	Argentina
<i>Xanthomonas</i> sp. 3017	Sementes, arroz	Argentina
<i>Pectobacterium brasiliensis</i>	Tubérculo, batata	Brasil
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Tubérculo, batata	Brasil

Xoc (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*), Xoo (*X. oryzae* pv. *oryzae*). ¹DNA genômico. * Isolados crescidos e testados no Reino Unido.

3.1.2 Extração de DNA

O DNA dos isolados selecionados foi extraído pelo método de lise alcalina. Células bacterianas presentes em 1,0 mL de cultura foram precipitadas por centrifugação (12.000 X g por 2 min) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as células foram suspensas em 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e lisadas pela adição do tampão de lise (0,2 N NaOH, 1% SDS). Em seguida o lisado de células foi submetido à neutralização e precipitação com 300 µL de acetato de amônio 7,5 M, seguido de centrifugação por 5 min a 12000 X g. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo. Logo, o DNA foi precipitado com etanol 95% por centrifugação por 15 min a 12000 X g. A etapa de lavagem do DNA para eliminar os sais foi realizada com etanol 70%, através de centrifugação por 5 min. O DNA das estirpes foi solubilizado em 50 µL de água milli-Q (De Boer & Ward, 1995). O DNA extraído de cada estirpe bacteriana foi quantificado por leitura em espectrofotômetro. Posteriormente, todos os DNAs foram diluídos em concentrações conhecidas para serem utilizados na PCR.

3.1.3 Desenho da sonda TaqMan[®] para detecção de Xo

Um oligonucleotídeo iniciador foi desenhado e este conjugado com fluoróforo para reconhecer a sequência conservada do gene receptor de sideróforos. A sonda do tipo TaqMan[®], foi desenhada para hibridizar com a sequência alvo, entre os dois oligonucleotídeos PF e PR que possui um produto de amplificação com 152 bp (Zhao *et al.*, 2007). A sonda foi desenhada baseada na sequência do genoma de estirpe de Xo oriunda da

China. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram PF: 5'-GAATATCAGCATCGGCAACAG-3' e PR: 5'-TACCGGAGCTGCGCGTT-3' (Zhao *et al.*, 2007) e a sonda XRS: VIC-5'-CATCGCCTGCTTGGCTACCAGC-3'-QUENCHER.

3.1.4 Padronização de qPCR por quantificação absoluta para detecção de Xo

A padronização de PCR pelo método de quantificação absoluta com a sonda de hidrólise (TaqMan®) XRS para detecção dos patovares de Xo utilizou padrões diluídos para a construção da curva de calibração.

As análises por qPCR pelo método de quantificação absoluta, geraram curvas de calibração para a espécie bacteriana, relacionando o valor do Ct com as concentrações dos padrões. A concentração do DNA foi mensurada e convertida ao número de células presentes na amostra usando o peso molecular do DNA de Xoc. Os dados de qPCR foram analisados pelo software do aparelho 7300 Real Time PCR System versão 2.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

As reações foram realizadas em um volume final de 12 μL contendo 6,0 μL de Platinum qPCR Master Mix, 0,4 μM dos oligonucleotídeos PF e PR, 0,6 μM da sonda XRS, 0,24 μl de fluoróforo de referência passiva (ROX) e 1 μl de DNA genômico ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) de Xoc e Xoo em concentrações padrões. Água milli-q estéril foi adicionada para um volume total de 12 μL . As reações foram conduzidas a 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 15 s, e 60 °C durante 1 min.

A validação da técnica da qPCR para detecção de Xo foi realizada com a avaliação de alguns parâmetros, tais como especificidade, precisão, sensibilidade, eficiência da amplificação, coeficiente de correlação (r^2) da curva-padrão (valores de CT x logaritmo das concentrações de DNA de cada diluição).

A eficiência para cada reação foi calculada a partir dos dados da curva de calibração. A eficiência de reação foi calculada baseando-se na inclinação da curva de calibração com a seguinte fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Para determinar o limiar de detecção, diluições em série do DNA genômico de Xoc foram realizadas partindo da concentração inicial de $300 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. A precisão dos dados de qPCR da curva padrão foi avaliada a partir do desvio padrão entre as três replicatas.

3.1.5 Teste de especificidade

Para o teste da especificidade da sonda XRS foram utilizadas as estirpes de Xoo, Xoc, *X. axonopodis* pv. *citri*, *X. campestris* pv. *campestris* e outras *Xanthomonas* isoladas de sementes de arroz, além de *Pectobacterium brasiliensis* e *Ralstonia solanacearum* (Tabela 1). As reações ocorreram nas mesmas condições anteriores, variando apenas a temperatura de anelamento entre 60 e 72 °C.

O DNA da estirpe Xoc 005 foi submetido à PCR e sequenciamento do fragmento correspondente ao gene receptor de sideróforos, onde foram utilizados os oligonucleotídeos PF e PR (Zhao *et al.*, 2007).

3.1.6 Detecção de Xo em sementes de arroz artificialmente inoculadas

Para validação da sonda, uma amostra de arroz artificialmente inoculada com Xoo foi utilizada. Primeiramente as sementes foram imersas em álcool etílico 70%, sendo usado a razão de 1 g de semente para 5 mL de álcool, com agitação por 4 h em temperatura ambiente. Em seguida as sementes foram lavadas quatro vezes com água destilada esterilizada usando a mesma proporção (1 g: 5 mL). As sementes foram secadas em fluxo laminar por 6 h. Para verificar a eficiência da esterilização das sementes, 15 mL de tampão fosfato-salino (PBS) foram adicionados a 5 g de sementes, estas foram levadas ao agitador por 5 min e então 1 mL da suspensão foi transferido para a superfície de meio de cultura em placas de Petri.

A concentração de células bacterianas de Xoo71 foi ajustada para $A_{600}=0,1$ correspondendo a uma concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹ e em seguida foram realizadas diluições sucessivas. Cada uma das diluições foi plaqueada para quantificação do número de células bacterianas.

As sementes previamente desinfestadas, foram imersas no inóculo por duas horas a temperatura ambiente com agitação (150 x g). Subsequentemente foram levadas para geladeira a 4°C durante a noite para as bactérias aderirem às sementes. As sementes foram secas em fluxo laminar por 6 h e em seguida estocadas a 4 °C até a sua utilização (Vera Cruz *et al.*, 2012).

3.1.7 Preparação da amostra

Para a detecção direta, 5 g de cada amostra de sementes de arroz artificialmente inoculada foram pesados e transferidas para um tubo de 50 mL contendo 15 mL de PBS e 0,01% de Tween 20%. Após, a amostra foi levada ao sonicador por 5 min. Posteriormente, para o enriquecimento (Bio-PCR), foi coletada uma alíquota de 200 µl do extrato e transferida para um microtubo contendo 1,8 mL de caldo nutriente. Posteriormente foram adicionados 300 mg de PVP e 150 mg de sulfito de sódio (Na_2SO_3), então a amostra foi levada novamente ao sonicador por 5 min. Em seguida foi filtrada, utilizando papel filtro para remover resíduos e o PVP. Em um microtubo, foram coletados 2 mL e então centrifugado durante 10 min a 13.000 x g, em seguida o sobrenadante foi descartado e o pelete ressuspenso em 200 µL de tampão TE 1X e armazenado a -20 C até sua utilização (Vera Cruz *et al.*, 2012). Para qPCR foram utilizadas as mesmas condições do item 3.1.4, com 3 µL da suspensão da amostra diretamente na reação.

3.2 Levantamento da ocorrência de Xo em sementes de arroz das safras 2009/2010/2011

3.2.1 PCR multiplex para Xoo e Xoc por isolamento de sementes

Primeiramente foi realizado um levantamento com um total de 153 isolados de *Xanthomonas* sp., provenientes do isolamento de 148 amostras de sementes de arroz da safra 2009 (Schimtz *et al.*, 2010). Os 153 isolados foram submetidos a ampliações por PCR multiplex com os oligonucleotídeos iniciadores específicos para os patovares de Xo (Lang *et*

al., 2010), Xo3756F-CATCGTTAGGACTGCCAGAAG, Xo3756R-GTGAGAACCACCGCCATCT, Xoo80F-GCCGCTAGGAATGAGCAAT, Xoo80R-GCGTCCTCGTCTAAGCGATA, Xoc3866F-ATCTCCCAGCATGTTGATCG, Xoc3866R-GCGTTCAATCTCCTCCATGT, Xoc3864F-GCGTTCAATCTCCTCCATGT, Xoc3864R-GGGATGGATGAATACGGATG.

O volume da reação final foi de 25 µL, sendo 0,5 µL de dNTPs a 10 µM, 2,5 µl de tampão 10X (20 mM Tris-Cl pH 8,4; 50 mM KCl sem MgCl₂), 2,0 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,06 U de Taq polimerasee 0,5 µl de cada oligonucleotídeo (10 mM) e 100 ng de DNA genômico. A PCR multiplex foi realizada em termociclador PTC-100 nas seguintes condições: uma desnaturação inicial de 94 °C por 3 min, seguido por 31 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s e 68 °C por 2 min, e uma extensão final a 68 °C por 10 min. Alíquotas de 5 µL do produto da amplificação foram analisados por separação em gel de agarose a 2% (p/v) em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) corado com brometo de etídeo a 60 V.min⁻¹. Os produtos de amplificação no gel foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados (Lang *et al.*, 2010).

3.2.2 qPCR para Xo pelo método direto a partir de sementes de arroz

Neste experimento foram analisadas 468 amostras de sementes de arroz das safras 2009, 2010 e 2011 provenientes do Brasil, Uruguai, Argentina e Estados Unidos (Tabela 2), para verificar a presença dos patovares de Xo. As amostras foram preparadas de acordo com o item 3.1.7 e submetidas a qPCR com a sonda XRS desenvolvida. As condições das

reações ocorreram como no item 3.1.4 sendo utilizado 3 µL de cada amostra processada, diretamente na qPCR.

TABELA 2. Número de amostras de sementes de arroz nacionais e importadas. Porto Alegre, RS, 2014.

Origem	Safr		
	2009	2010	2011
Rio Grande do Sul ¹	37	37	61
Santa Catarina	11	0	0
Goiás	1	0	0
Roraima	1	0	0
NI ²	14	0	0
Outros países			
Argentina	135	76	8
Uruguai	35	40	11
Estados Unidos	1	0	0
	235	153	80
Total		468	

¹ (Alegrete, Cachoeirinha, Camaquã, Capão do Leão, Eldorado do Sul, Faxinal do Soturno, Maçambará, Mostardas, Pelotas, Rio Grande, Santa Maria, Sto. Antônio da Patrulha, São Borja, São Sepé, São Vicente do Sul, Uruguiana, Viamão). ² Não identificado.

3.3 Caracterização de isolados bacterianos obtidos de sementes de arroz positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo

3.3.1 Isolados bacterianos

Neste estudo foram utilizados isolados bacterianos amarelos com resultado positivo para Xoo no ELISA (Agdia, BRA 85000), em teste realizado pelo Laboratório Agrônômica. Estes foram obtidos de sementes de arroz oriundas da Argentina e Uruguai (Tabela 3). Os isolados conservados em microtubos a -20 °C foram crescidos em placas contendo o meio de cultura nutriente ágar (NA), as quais foram incubadas a 28 °C por 48 h. Os isolados foram então submetidos a testes de bioquímicos, moleculares e biológicos.

TABELA 3. Isolados bacterianos de sementes de arroz positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo. Porto Alegre, RS, 2014.

	Isolado	Cultivar	Origem
1	EL5001	Desconhecida	Uruguai
2	EL5005	Desconhecida	Uruguai
3	EL5007	Desconhecida	Uruguai
4	EL5008	Desconhecida	Uruguai
5	EL5009	Desconhecida	Uruguai
6	EL5010	Desconhecida	Uruguai
7	EL5013	Desconhecida	Uruguai
8	EL5016	Desconhecida	Uruguai
9	EL5019	Desconhecida	Uruguai
10	EL6001	Sator	Argentina
11	EL6005	Sator	Argentina
12	EL6007	Sator	Argentina
13	EL6008	Sator	Argentina
14	ET3005	Tiba	Argentina
15	ET3009	Tiba	Argentina
16	ET3017	Tiba	Argentina
17	ET4011	Avaxi	Argentina
18	ET4012	Avaxi	Argentina
19	ET4013	Avaxi	Argentina
20	ET3021	Tiba	Argentina
21	13I10L01	Desconhecida	Argentina

3.3.2 Produção do pigmento xantomonadina

Os isolados Gram-negativos no teste KOH 3%, foram submetidos à identificação preliminar para o gênero *Xanthomonas*, seguindo o protocolo para o teste de extração do pigmento xantomonadina. Culturas bacterianas crescidas em meio NA por 24-48 h foram transferidas para tubos com 3 mL de metanol e foram mantidos em banho Maria até a fervura para extração do pigmento. Após, os tubos com as suspensões bacterianas foram deixados em repouso por 5 min, para a decantação. Em seguida, pipetou-se o sobrenadante amarelo transparente para cubetas e levou-se ao espectrofotômetro eletrônico onde foi realizada a leitura das curvas de absorvância para verificação do espectro de comprimento de onda entre 400

e 500 nm, correspondente ao gênero *Xanthomonas* (Romeiro, 1995; Schaad *et al.*, 2001).

3.3.3 PCR para *Xanthomonas*

O DNA dos 21 isolados bacterianos, com curva típica para o pigmento xantomonadina, foi submetido a ampliações por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores 16F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 16R1525 (5' TTCTGCAGTCTAGAAGGAGGTGWTCCAGCC-3') específicos para parte da região do rDNA 16S de *Xanthomonas* spp. (Hauben *et al.*, 1997).

A reação final continha 20 µL sendo, 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (5 µM), 0,8 µL de dNTPs (5 mM), 2µL de tampão 10X (20 mM Tris-Cl pH 8,4; 50 mM KCl sem MgCl₂), 0,6 µL de de MgCl₂ (50 mM), 0,1 µL de Taq polimerase (0,5 U) e 100 ng de DNA genômico. As amostras foram processadas através de uma desnaturação inicial por 3 min a 94 °C, seguida de 25 ciclos de amplificação de 94 °C 1 min, 55 °C por 2 min e 72 °C por 2 min, e uma extensão final a 72 °C por 2 min. Alíquotas de 5 µL do produto da amplificação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) corado com brometo de etídeo a 60 V.min⁻¹. Os produtos de amplificação no gel foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados (Hauben *et al.*, 1997).

3.3.4 Crescimento em meio Waquimoto Modificado

Os isolados bacterianos foram submetidos ao crescimento no meio semi-seletivo Waquimoto modificado (Sacarose, 20 g; peptona, 5 g;

Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0,5 g; Na₂HPO₄, 0,82 g; FeSO₄, 0,05 g; ágar, 17 g), as culturas bacterianas foram repicadas por esgotamento e observado, após 48 h, a presença do crescimento das colônias. O meio Waquimoto modificado foi desenvolvido para o isolamento de colônias de Xo (Mew & Mistra, 1994; Vera Cruz *et al.*, 2012).

3.3.5 Utilização de fontes de carbono

Para verificação do uso de diferentes fontes de carbono foi conduzido um experimento em microplacas utilizando o sistema BIOLOG (GN Microplate, Biolog Inc., Hayward, CA) o qual contém 95 fontes. Para isso, foram testados 18 isolados bacterianos, que primeiramente foram cultivados em meio BUGM (Biolog Universal Growth Medium) e incubados por 24 h a 28 °C. Após, colônias bacterianas foram transferidas, com auxílio de um cotonete esterilizado, para solução salina esterilizada e ajustadas para igualar ao padrão de turbidez do sistema GN Biolog. Alíquotas de 150 µL das suspensões de células bacterianas foram dispostas em cada poço das microplacas. A visualização da troca de cor, transparente para roxa, foi feita após 24 h a 28 °C. O perfil de utilização das fontes de carbono de cada isolado foi inserido na base de dados do Sistema Biolog e também foi comparado a fontes utilizadas por estirpes de Xo (Vauterin *et al.*, 1995). Os dados foram analisados pelo programa NTSYS-pc versão 2.0 (Rohlf, 1998). Uma matriz binária foi construída a partir dos dados obtidos com o uso das diferentes fontes de carbono. Valores de um e zero foram atribuídos para indicar a utilização ou não de determinada fonte de carbono, respectivamente. A matriz de similaridade foi construída utilizando o

coeficiente de Dice e os agrupamentos feitos de acordo com o método UPGMA (Unweight Group Method with Arithmetic Average).

3.3.6 Sensibilidade dos isolados a antibióticos

No teste de sensibilidade por difusão com disco, uma alíquota de 100 µL da suspensão de células bacterianas de cada um 21 isolados de *Xanthomonas* sp. em estudo foi espalhada sobre a superfície do meio de cultura Mueller Hinton (estrato de carne, 2 g; caseína hidrolisada, 17,5 g; amido, 1,5 g; ágar, 17 g), em placas de Petri. Em seguida, quatro discos de papel (Laborclin), impregnados com antibiótico, foram colocados, assepticamente, sobre o meio. O ensaio foi realizado utilizando-se 11 antibióticos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$): clindamicina (2), cloranfenicol (30), eritromicina (15), estreptomicina (10), norfloxacin (10), novobiocina (5), oxacilina (1), rifampicina (5), sulfonamida (300), tetraciclina (30) e vancomicina (30). A sensibilidade do isolado bacteriano ao antibiótico teste foi avaliada após 24 horas de incubação à 28 C°, determinando-se o diâmetro do halo de inibição. Foi considerado sensível ao antibiótico o isolado que apresentou a formação de um halo de inibição maior que 8 mm (Wilson & Power, 1989). Quatro repetições por tratamento foram utilizadas.

3.3.7 Reação de hipersensibilidade em tabaco e tomateiro

Os isolados bacterianos de *Xanthomonas* sp. foram inoculados em folhas de tomate (*Solanum lycopersicum*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*). Inicialmente foram preparadas suspensões de células bacterianas ($\pm 10^9$ UFC.mL⁻¹) a partir de colônia em desenvolvimento ativo (fase log), com até

48 h de desenvolvimento. A suspensão de células bacterianas foi infiltrada no mesófilo com uma seringa hipodérmica com agulha, até aparecer 1-2 cm de área infiltrada, e a presença de colapso e morte do tecido verificada após 24 h (Romeiro, 1995; Sigee, 1993). O experimento foi realizado utilizando três repetições.

3.3.8 Teste de patogenicidade em plantas de arroz

Suspensões de células dos 21 isolados de *Xanthomonas* sp. foram inoculadas em plantas de arroz da cultivar IRGA 410 com 6-8 semanas de idade. Os isolados foram incubados em meio NA a 28 °C por 48 h e as concentrações das suspensões de células bacterianas foram padronizadas através de leitura da absorbância em espectrofotômetro para a obtenção de aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹.

As plantas foram inoculadas através do corte das folhas com tesoura previamente imersa em suspensão bacteriana (Akhtar, *et al.*, 2008) e com pequenas picadas de agulhas com crescimento bacteriano (Xie & Mew, 1998). A testemunha constou de plantas inoculadas com água destilada esterilizada. Controles positivos não foram utilizados devido ao impedimento legal por serem pragas quarentenárias. Como controle negativos foram utilizados *X. campestris* pv. *campestris* e *Ralstonia solanacearum*. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida com saco plástico transparente por 48 h. A verificação da presença de sintomas foi feita 14 dias após a inoculação. O experimento foi realizado utilizando três repetições.

3.3.9 Detecção de Xo por qPCR

Após a extração por lise alcalina (De Boer & Ward, 1995), o DNA dos 21 isolados bacterianos, colônias amarelas, positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) foram submetidos a qPCR utilizando os oligonucleotídeos PF: 5'-GAATATCAGCATCGGCAACAG-3' e PR: 5'-TACCGGAGCTGCGCGTT-3' (Zhao *et al.*, 2007) e a sonda de hidrólise XRS –VIC5'-CATCGCCTGCTTGGCTACCAGC-3'-MGB para a detecção de Xo. As condições foram as mesmas do item 3.1.4. O DNA genômico de Xoo e Xoc foi utilizado como controles positivos.

3.3.10 Detecção de Xoo e Xoc por PCR multiplex

O DNA dos 21 isolados de *Xanthomonas* sp. foi submetido à ampliações por PCR multiplex com oligonucleotídeos iniciadores para Xoo e Xoc (Tabela 4), conforme Lang *et al.* (2010).

TABELA 4. Oligonucleotídeos iniciadores da PCR multiplex específicos para Xoo e Xoc. Porto Alegre, RS, 2014.

	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequências (5'- 3')	Produto (pb)
Xo	Xo3756F	CATCGTTAGGACTGCCAGAAG	331
	Xo3756R	GTGAGAACCACCGCCATCT	
Xoo	Xoo80F	GCCGCTAGGAATGAGCAAT	162
	Xoo80R	GCGTCCTCGTCTAAGCGATA	
Xoc	Xoc3866F	ATCTCCCAGCATGTTGATCG	691
	Xoc3866R	GCGTTCAATCTCCTCCATGT	
	Xoc3864F	GTGCGTGAAAATGTCGGTTA	945
	Xoc3864R	GGGATGGATGAATACGGATG	

Xo: *Xanthomonas oryzae*; Xoo: *X. oryzae* pv. *oryzae*; Xoc: *X. oryzae* pv. *oryzicola*

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento de qPCR para detecção de Xo

A análise em gel de agarose dos produtos da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores PF e PR indicou a presença de um único produto de amplificação (152 pb), presente apenas nas estirpes bacterianas de *Xanthomonas* analisadas, confirmando que os oligos propostos por Zhao *et al.* (2007) são específicos para *Xanthomonas* spp.

O sinal de fluorescência com a sonda XRS ocorreu apenas com o DNA das estirpes de Xoo e Xoc. Apesar da sonda XRS ter sido desenhada baseada na sequência gênica de Xoc, com apenas um nucleotídeo diferente, esta não foi capaz de diferenciar os dois patovares, mesmo quando testados em diferentes temperaturas de anelamento (60-72 °C). Estes resultados sugerem que a sonda XRS tem especificidade apenas em nível de espécie, sendo capaz discriminar Xo das outras espécies de xantomonas saprofitas associadas a sementes de arroz e de outras espécies de bactérias (Figura 1).

Na análise da qPCR foi observado que a eficiência de amplificação da reação com a sonda XRS, obtida a partir da curva de calibração com os padrões de DNA, foi de 93% e com valor da pendente de -3,498 (Figura 3), o que indica que a cada ciclo o produto de amplificação vem sendo duplicado. Estes valores encontram-se dentro do intervalo aceitável de -3,1 a -3,6, com

eficiência de 90-110%, que é considerado um limite tolerável para a eficiência de amplificação de oligonucleotídeos iniciadores (Raymaekers *et al.*, 2009).

A eficiência calculada pelo método da curva-padrão assume que eficiências de amplificação entre os padrões de quantificação e amostras desconhecidas testadas sejam as mesmas, ou seja, os oligonucleotídeos amplificam o fragmento esperado de DNA com a mesma eficiência para as diluições de DNA conhecidas e amostras com concentrações variáveis. Essa eficiência de amplificação mostra o quão sensível serão os oligonucleotídeos para detectar a sequência-alvo na PCR (Applied Biosystems, 2008).

O coeficiente de correlação (r^2) da curva-padrão foi de 0,997, indicando relação linear entre o valor de C_T e a quantidade de DNA dos padrões que variaram de 300 a 0,003 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. O coeficiente de correlação (r^2) $>0,99$ indica o

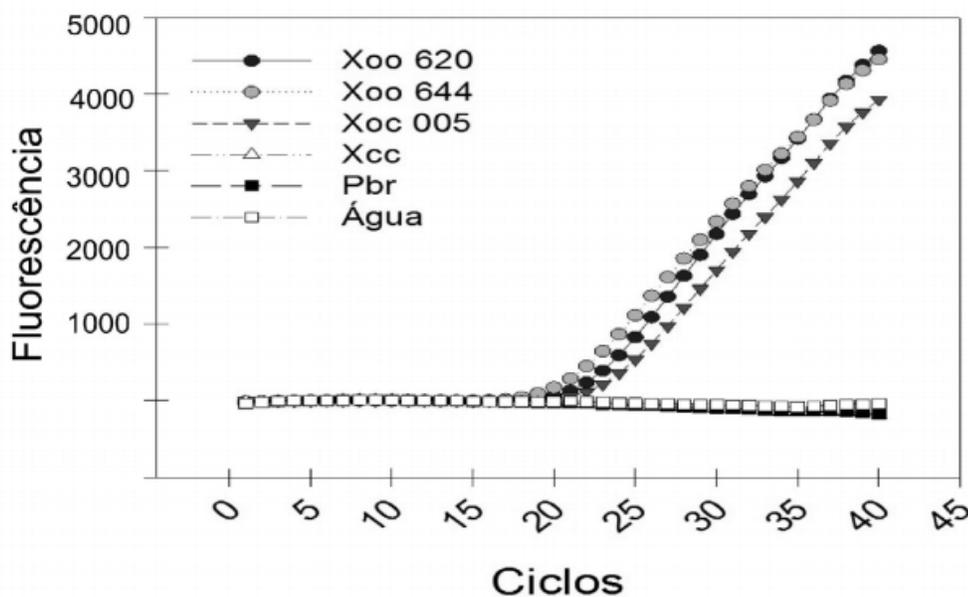


FIGURA 1. Especificidade da sonda XRS, com DNA de Xoo 620 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*), Xoo 644 (*X. oryzae* pv. *oryzae*), Xoc 005 (*X. oryzae* pv. *oryzicola*), *Pectobacterium brasiliensis*, *X. campestris* pv. *campestris*. Porto Alegre, RS, 2014.

nível de confiabilidade para a correlação dos valores de Ct e da concentração de DNA (Applied Biosystems, 2008) (Figura 2).

A quantidade de DNA presente nos padrões corresponde ao número de células bacterianas, baseando-se no tamanho do genoma de *Xo*. O limite de detecção com a sonda XRS foi de 30 fg/ μ L de DNA, correspondendo a seis células, em um Ct médio de 35,93; não houve amplificação abaixo desse limite. A precisão dos dados de qPCR entre as três replicatas, variando de 0,11 a 0,30, onde maiores desvios foram verificados em amostras com menor número de células bacterianas, quase no limite de detecção (Tabela 5).

O alinhamento da sequência de parte do gene receptor de sideróforo da estirpe de *Xoc0005* com as de outras estirpes de *Xoo* do Genbank não indicou a mutação no nucleotídeo 94, presente apenas na posição 69 (Figura 4). Quando se verifica o alinhamento da sequência deste gene da estirpe *Xoc005* com as de outras estirpes de *Xoo*, verifica-se também mutação na posição 100 (Figura 3).

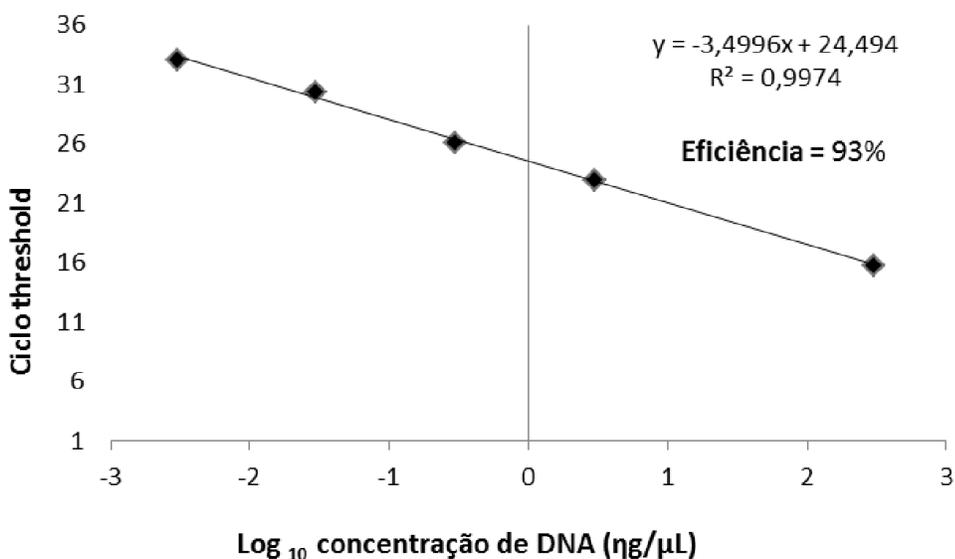


FIGURA 2. Curva de calibração da concentração de DNA ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) de *Xathomonas oryzae* pv. *oryzicola* em relação ao ciclo threshold (Ct). Porto Alegre, RS, 2014.

O alinhamento da sequência de parte do gene receptor de sideróforo da estirpe de Xoc0005 com as de outras estirpes de Xoo do Genbank indicou a mutação no nucleotídeo 94, presente apenas na posição 69 (Figura 4). Quando se verifica o alinhamento da sequência deste gene da estirpe Xoc0005 com as de outras estirpes de Xoo, verifica-se também mutação na posição 100 (Figura 3).

Esses resultados estão de acordo com estudos que têm demonstrado uma variabilidade genética entre as populações de Xoo e Xoc de diferentes países (Niño-Liu *et al.*, 2006). A variabilidade intraespecífica e a proximidade genética entre os dois patovares resultam, com frequência, em problemas de identificação e diferenciação dos patovares de Xo. A variabilidade intraespecífica dessas bactérias tem sido analisada utilizando diferentes classes de marcadores moleculares, tais como RFLP, rep-PCR, FAFLP, PCR, RAPD e microarranjos (George *et al.*, 1997; Adhikari *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2006; Lan Fang *et al.*, 2009; Xin Jian *et al.*, 2009).

TABELA 5. Quantidade de DNA dos padrões de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* empregados na curva de calibração e número de células detectadas em qPCR. Porto Alegre, RS, 2014.

Concentração de DNA (ng.µL⁻¹)	C_T médio	C_T Desvio padrão	Número de células
300	15,76	0,19	57142857
3	22,93	0,11	571429
0,3	26,06	0,22	57143
0,03	30,36	0,21	5714
0,003	33,02	0,22	571
0,0003	34,08	0,27	57
0,00003	35,93	0,30	6

A distinção entre os dois patovares é extremamente importante para evitar reações cruzadas. No entanto, no caso do Brasil e em países onde essas bactérias são quarentenárias, a detecção da espécie *Xo*, sem a discriminação dos patovares, é aceitável, visto que os dois patovares são considerados pragas quarentenárias ausentes no país. Vários ensaios já foram realizados para a detecção e identificação de fitopatógenos intimamente relacionados filogeneticamente utilizando sondas de hidrólise para diferenciá-los em nível de espécie (Bach *et al.*, 2003, Zijlstra & Van Hoof, 2006; Cullen *et al.*, 2007; Arzanlou *et al.*, 2007). No entanto, até o momento, não foi possível separar os patovares de *Xo* com a técnica de qPCR por sonda de hidrólise. No presente trabalho e no realizado por Cho *et al.* (2011), isolados de *Xoo* e *Xoc* testados com a sonda desenvolvida por Zhao *et al.* (2007) não foram discriminados.

Para a amostra de sementes de arroz inoculada com *Xoo* foi observado que utilizando a extração direta das sementes com a técnica da qPCR com a sonda XRS desenvolvida, a sensibilidade foi de 4×10^2 UFC.mL⁻¹. Esse valor foi bem inferior ao encontrado por Zhao *et al.* (2007), o qual com uma sonda de hidrólise para detecção de *Xoo*, usando a suspensão direta de sementes, encontraram um limite de detecção de $1,9 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹. Isso mostra que o método de qPCR aliado ao método de processamento das amostras de sementes proposto por Vera Cruz e colaboradores (2012) foi eficiente na detecção de *Xo* em sementes de arroz, podendo ser recomendado para as análises de rotina de laboratórios de diagnóstico fitossanitário.

***Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A, genoma completo**

```

Xoc0005 1 GAATATCAGCATCGGCAACAGCGCTCGGTGCCGGGCTATCAACTGCTGGGTGGCACGCAG 60
          |||
          GAATATCAGCATCGGCAACAGCGCTCGGTGCCGGGCTATCAACTGCTGGGTGGCACGCAG
Xoc0005 61 GTGCCGCGCGATATCGATGTGCATCGCCTGCTCGGCTACCAGCCGTGGGCACGTCCGGT 119
          |||
          GTGCCGCGCGATATCGATGTGCATCGCCTGCTCGGCTACCAGCCGTGGGCACGTCCGGT

```

***Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331, genoma completo**

```

Xoc005 1 GAATATCAGCATCGGCAACAGCGCTCGGTGCCGGGCTATCAACTGCTGGGTGGCACGCAG 60
          |||
          GAATATCAGCATCGGCAACAGCGCTCGGTGCCGGGCTATCAACTGCTGGGTGGCACGCAG
Xoc005 61 GTGCCGCGCGATATCGATGTGCATCGCCTGCTCGGCTACCAGCCGTGGGCACGTCCGGT 119
          |||
          GTGCCGCGCGATATCGATGTGCATCGCCTGCTCGGCTACCAGCCGTGGGCACGTCCGGT

```

***Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, gene receptor de sideróforos**

```

Xoc0005 1 GAATATCAGCATCGGCAACAGCGCTCGGTGCCGGGCTATCAACTGCTGGGTGGCACGCAG 60
          |||
          GAATATCAGCATCGGCAACAGCGCTCGGTGCCGGGCTATCAACTGCTGGGTGGCACGCAG
Xoc0005 61 GTGCCGCGCGATATCGATGTGCATCGCCTGCTCGGCTACCAGCCGTGGGCACGTCCGGT 119
          |||
          GTGCCGCGCGATATCGATGTGCATCGCCTGCTCGGCTACCAGCCGTGGGCACGTCCGGT

```

***Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* BLS256, genoma completo**

```

Xoc0005 1 GAATATCAGCATCGGCAACAGCGCTCGGTGCCGGGCTATCAACTGCTGGGTGGCACGCAG 60
          |||
          GAATATCAGCATCGTCAACAGCGCTCGGTGCCGGGCTATCAACTGCTGGGTGGCACGCAG
Xoc0005 61 GTGCCGCGCGATATCGATGTGCATCGCCTGCTCGGCTACCAGCCGTGGGCACGTCCGGT 119
          |||
          GTGCCGCGCGATATCGATGTGCATCGCCTGCTCGGCTACCAGCCGTGGGCACGTCCGGT

```

FIGURA 3. Alinhamento de sequências do gene receptor de sideróforos da estirpe *X. oryzae* pv. *oryzicola* (0005) com outras estirpes de *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. o. pv. oryzicola*. Porto Alegre, RS, 2014.

O teste de 162 amostras de sementes nacionais e 306 importadas das safras 2009, 2010 e 2011, com qPCR, não indicou a presença dos dois patovares. Também a análise de 153 isolados do gênero *Xanthomonas* oriundos de 148 amostras da safra 2009 utilizando a PCR multiplex não indicou amplificação do DNA de nenhum dos isolados. O levantamento realizado neste trabalho não indicou a presença de Xoo e Xoc, sugerindo que os patógenos

não estão presentes nas lavouras analisadas. Contudo futuras pesquisas, incluindo um número maior de amostras de sementes de arroz da região de fronteira, devem ser realizadas a fim de certificar que Xoo e Xoc mantém o status de praga quarentenária ausente no Brasil.

A qPCR desenvolvida mostrou eficiência em detectar Xo e distingui-la de outros isolados de *Xanthomonas* sp. associados a sementes, sendo isso de grande importância em programas de certificação e de quarentena, principalmente devido a populações latentes poderem levar a sérias epidemias em condições favoráveis e também para evitar a possibilidade de reações cruzadas. Embora a sonda XRS possibilite a detecção dos patovares de Xo sem distingui-los, esta poderá ser usada em estudos epidemiológicos, em certificação de sementes e inspeção quarentenária, com os objetivos de melhor atender à legislação fitossanitária em vigor, pois ambas são quarentenárias para o Brasil. Além disso, este método mostra-se viável tanto economicamente quanto pelo tempo, favorecendo o rápido monitoramento de Xoo e Xoc nas sementes de lotes comerciais em laboratórios de diagnóstico fitossanitário.

4.2 Caracterização de isolados bacterianos obtidos de sementes de arroz positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo

4.2.1 Teste de KOH 3%

Os 21 isolados positivos no ELISA utilizando o antissoro para Xoo apresentaram no teste de KOH 3% formação de fio viscoso pendente, sendo assim considerados Gram-negativos, além disso, também mostraram-se negativos no teste de oxidase.

4.2.2. Produção do pigmento xantomonadina

Em relação à produção do pigmento xantomonadina característico para o gênero *Xanthomonas*, todos os 21 isolados apresentaram curva típica com três picos de absorvância (420, 440, 460 nm) (Figura 4). O teste para identificação do pigmento xantomonadina é essencial para o início da caracterização de isolados do gênero *Xanthomonas* (Halfeld-Vieira *et al.*, 2001; El Tassa & Duarte, 2002), uma vez que dentre as bactérias fitopatogênicas apenas as desse gênero são capazes de produzir esse pigmento (Garrity *et al.*, 2004). Embora este teste seja confiável, de fácil execução e de baixo custo, algumas linhagens podem não apresentar a pigmentação (Garrity, 2005).

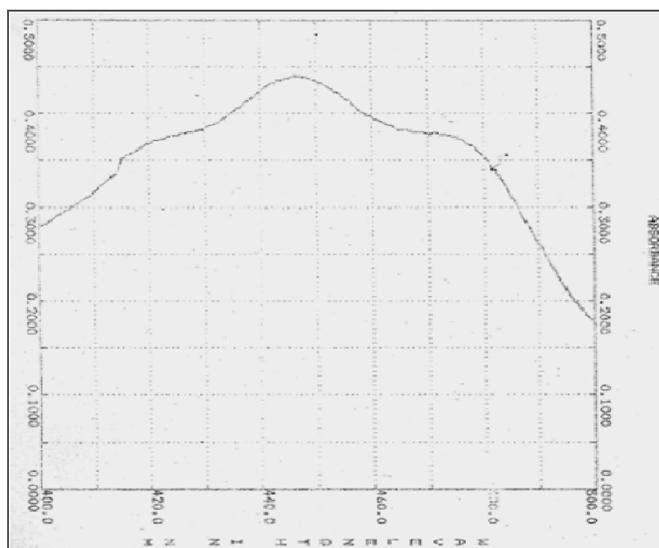


FIGURA 4. Curva típica com picos em 420, 440 e 460 nm, que representa a presença do pigmento xantomonadina em isolados bacterianos. Porto Alegre, RS, 2014.

4.2.3 PCR para *Xanthomonas*

Para confirmação da identidade dos isolados de *Xanthomonas* sp. foi realizada a PCR com oligonucleotídeos iniciadores universais baseados na região rDNA 16S, com todos os isolados que apresentaram resultado positivo para o teste de xantomadina. Observou-se que 18 isolados tiveram amplificação do seu DNA, apresentando um produto de tamanho de 1518 pb, similar ao isolado de *X. axonopodis* pv. *citri* utilizado como controle positivo (Fig 5). Apenas os isolados EL5009, EL6008 e ET3017 não apresentaram amplificação do fragmento esperado. Deste modo, os 21 isolados foram confirmados como pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, baseados na produção de xantomadina e amplificação da região rDNA 16S.

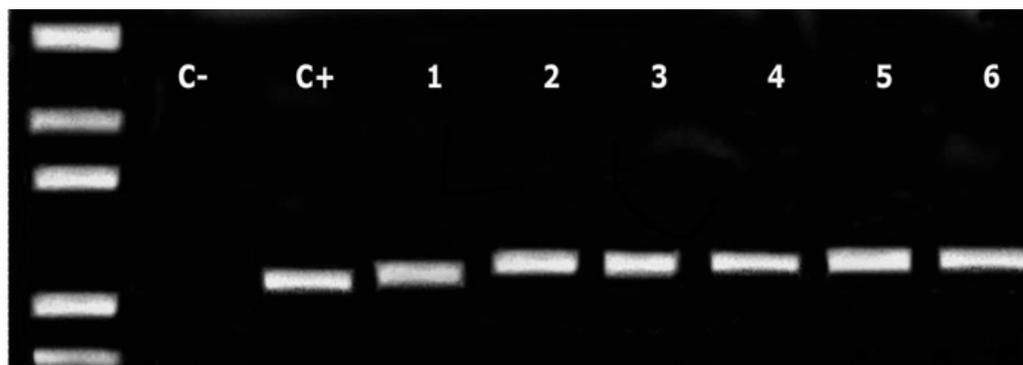


FIGURA 5. Perfil eletroforético da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores 16F27 e 16R1525 com tamanho de 1518 pb. (M) marcador, (C-) água, (C+) controle positivo com *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, (1-6) isolados positivos no ELISA para Xoo oriundos de sementes de arroz. Porto Alegre, RS, 2014.

4.2.4 Crescimento em meio Waquimoto Modificado

Os isolados ET3005 e 13I10L01 não foram capazes de se desenvolver no meio Waquimoto modificado, os demais isolados cresceram normalmente num período de até 48 h. Apesar deste meio ser desenvolvido para o isolamento de Xo, ele não inibe o crescimento de outras *Xanthomonas*, sendo assim este método deve ser somente utilizado para rastrear e não como um método definitivo na detecção dos patovares de Xo, pois pode permitir a obtenção de resultados falso-positivos. Meios semi-seletivos constituem uma ferramenta importante para a detecção de um determinado patógeno, uma vez que favorecem o crescimento do patógeno-alvo e a inibição do crescimento dos contaminantes (McGuire *et al.*, 1986). Sabe-se que ambas as bactérias Xoo e Xoc crescem lentamente sobre os meios de isolamento e que bactérias relacionadas à bactéria-alvo com o crescimento rápido, podem impedir o desenvolvimento das espécies de interesse, mascarando os resultados (Lee *et al.*, 2009). Muitas vezes, os contaminantes são de cor amarela, como *Pantoea agglomerans* e *Xanthomonas* saprófitas, dificultando as observações das colônias dos organismos-alvo e, além disso, são visualmente indistinguíveis em forma, crescimento, e cor das colônias de ambos os patovares de Xo (OEPP/EPPO, 2007; Di *et al.*, 1991). Por outro lado, bactérias do gênero *Xanthomonas* são umas das mais relatadas como contaminantes de cultivos *in vitro* (Duhem *et al.*, 1988; Reed *et al.*, 1998; Tanprasert & Reed, 1998).

TABELA 6. Crescimento em meio seletivo Waquimoto modificado, produção de xantomonadina e produtos da PCR e qPCR de isolados bacterianos positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para *Xoo*. Porto Alegre, RS, 2014.

Isolado	Waquimoto	Xant ¹	PCR-Xant ²	PCR-Multiplex ³	qPCR ⁴
1 EL5001	+	+	+	-	-
2 EL5005	+	+	+	-	-
3 EL5007	+	+	+	-	-
4 EL5008	+	+	+	-	-
5 EL5009	+	+	-	-	-
6 EL5010	+	+	+	-	-
7 EL5013	+	+	+	-	-
8 EL5016	+	+	+	-	-
9 EL5019	+	+	+	-	-
10 EL6001	+	+	+	-	-
11 EL6005	+	+	+	-	-
12 EL6007	+	+	+	-	-
13 EL6008	+	+	-	-	-
14 ET3005	-	+	+	-	-
15 ET3009	+	+	+	-	-
16 ET3017	+	+	-	-	-
17 ET4011	+	+	+	-	-
18 ET4012	+	+	+	-	-
19 ET4013	+	+	+	-	-
20 ET3021	+	+	+	-	-
21 13I10L01	-	+	+	-	-

¹ Produção do pigmento xantomonadina. ² Oligonucleotídeos iniciadores universais para espécies de *Xanthomonas*. ³ Multiplex com oligonucleotídeos específicos para os patovares de *X. oryzae*. ⁴ qPCR para *Xo* com a sonda de hidrólise XRS.

4.2.5 Sensibilidade dos isolados a antibióticos

Dentre os antibióticos analisados, alguns apresentaram maior eficiência na inibição, proporcionando halos de inibição superiores a 8 mm para a maioria dos isolados. Os antibióticos rifampicina, tetraciclina e vancomicina inibiram crescimento de 95% dos isolados, enquanto cloranfenicol e novobiocina inibiram. Dentre os demais antibióticos, apenas oxalicina não foi capaz de inibir o crescimento de nenhum dos isolados (Tabela 7). A variabilidade da sensibilidade aos antibióticos pode ser observada, sendo que o isolado EL5008 foi sensível a apenas três dos 11 antibióticos testados, no entanto o isolado

ET3005 apresentou sensibilidade a 10 antibióticos, sendo resistente apenas contra oxalicina, isso mostra a existência de uma grande variabilidade dentro da população de xantomonas saprófitas, para esta característica.

Resultados semelhantes foram encontrados por Pereira *et al.* (2003), onde observaram que espécies do gênero *Xanthomonas* também tiveram o antibiótico cloranfenicol e tetraciclina como os mais efetivos no controle do crescimento bacteriano mesmo em baixas concentrações. Isolados de *Xanthomonas* sp. associados a sementes de arroz do Brasil, Uruguai e Argentina demonstraram uma grande variabilidade na sensibilidade a antibióticos, no entanto a maioria dos isolados foi sensível aos antibióticos cloranfenicol, norfloxacin e tetraciclina (Schimtz, 2011). Adicionalmente, o crescimento de Xo foi inibido em meios de cultura suplementados com os antibióticos tetraciclina e oxiaciclina na concentração de 0,001% e com cloranfenicol a 0,005% (Swings *et al.*, 1990). Por outro lado, de acordo com Khan *et al.* (2012), o antibiótico cloranfenicol ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) não inibiu o crescimento de isolados Xoo oriundos do Paquistão.

Sendo assim, os antibióticos com maior espectro de ação contra os isolados falso-positivos, são candidatos a suplementarem meios de cultura seletivos para o isolamento dos patovares de Xo. No entanto, há a necessidade de se obter um antibiograma com diferentes estirpes de Xo, para saber se tais antibióticos podem ser utilizados para evitar a contaminação do meio de cultura pela maioria das xantomonas saprófitas sem afetar o isolamento de Xoo e Xoc.

TABELA 7. Sensibilidade de isolados bacterianos positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo a antibióticos, avaliados pelo método da difusão em meio Muller Hinton. Porto Alegre, RS, 2014

Isolados	¹ Antibiótico (Concentração µg.mL ⁻¹)										
	ClI 2	Clo 30	Eri 15	Est 10	Nor 10	Nov 5	Oxa 1	Rif 5	Sul 300	Tet 30	Van 30
EL 5001	R ²	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S
EL 5005	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
EL 5007	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
EL 5008	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R
EL 5009	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
EL 5010	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
EL 5013	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
EL 5016	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
EL 5019	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S
EL 6001	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
EL 6005	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
EL 6007	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
EL 6008	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
ET 3005	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
ET 3009	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
ET 3017	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
ET 4011	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S
ET 4012	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S
ET 4013	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
ET 3021	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
13I10L01	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S

¹CL12- clindamicina, OXA1- oxacilina, RIF5- rifampicina, ERI15- eritromicina, CLO30- cloranfenicol, SUL300- sulfonamida, TET30- tetraciclina, NOV5- novobiocina, NOR10- norfloxacina, VAN30- vancomicina, EST10- estreptomicina. ²R: resistente (halo < 8,0 mm); S: sensível (halo > 8,0 mm).

4.2.6 Utilização das fontes de carbono

Dentre as 95 fontes de carbono que fazem parte do sistema BIOLOG, 12 delas (sacarose, dextrina, manose, maltose, α D-glicose, celobiose, tween 40 e tween 80, D-galactose, α D-lactose, lactulose, D-melibiose) destacaram-se por serem metabolizadas por mais de 90% dos isolados positivos no ELISA, por outro lado, outras 17 fontes (glicogênio, N-acetil-D-galactosamina, adonitol, meso-eritritol, xilitol, ácido p-hidroxifenilacético, ácido itacônico, ácido malônico, ácido sebácico, L-fenilalanina, ácido L-piroglutâmico, D-serina, L-treonina, DL-

carnitina, feniletilamina, putrescina, 2,3-butanodiol) não foram metabolizadas por nenhum dos isolados. Os perfis metabólicos dos isolados, encontrados na base de dados do sistema Biolog não permitiram correspondência na identificação dos isolados. Verniere *et al.* (1993) utilizando o sistema Biolog, identificou corretamente em nível de espécie apenas 6,8% de 148 cepas fitopatogênicas de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* originárias de 24 países. Esse fato se deve em muitos casos, ao número reduzido de bactérias fitopatogênicas registradas nos bancos de dados do sistema Biolog.

O uso de fontes de carbono permitiu observar uma ampla variabilidade nos perfis metabólicos dos isolados de *Xanthomonas* sp. positivos no ELISA. No dendograma construído baseado no perfil metabólico dos isolados, observou-se a formação de três grupos distintos com uma similaridade acima de 70% (Figura 6). No entanto, não foi identificada correspondência dos perfis metabólicos dos isolados de acordo com a região de origem e cultivares.

Comparando-se as médias para o uso das fontes de carbono entre os 18 isolados de *Xanthomonas* sp positivos no ELISA para Xo testados com isolados dos patovares de Xo (Vauterin *et al.*, 1995), observa-se que não ocorreu correspondência para a maioria das fontes de carbono (Apêndice 1). Apenas dextrina e maltose tiveram correspondência na utilização entre os isolados falso-positivos com os patovares de Xo. No entanto quando se compara as fontes de carbono que foram incapazes de ser utilizadas pelos isolados de *Xanthomonas* sp., observa-se que 16 das 17 fontes também não foram utilizadas pelos patovares de Xo. Na descrição de estirpes de Xo por Vauterin *et al.* (1995), D-glicose e D-melibiose não foram usados por nenhuma

das estirpes, no entanto, 90% dos isolados falso-positivos foram capazes de utilizá-las.

Dentre os isolados, oito deles foram capazes de utilizar a asparagina como fonte de carbono. Há relatos de isolados de *Xanthomonas* que são capazes de utilizar a asparagina (Vauterin *et al.*, 1995; Trébaol *et al.*, 2000; Nowbuth *et al.*, 2005; Shenge *et al.*, 2005), o que pode explicar a capacidade dos isolados EL5019, EL5013, EL5005, EL6005, EL6008, ET3017, ET3021 e 13110101 em utilizá-la como única fonte de carbono.

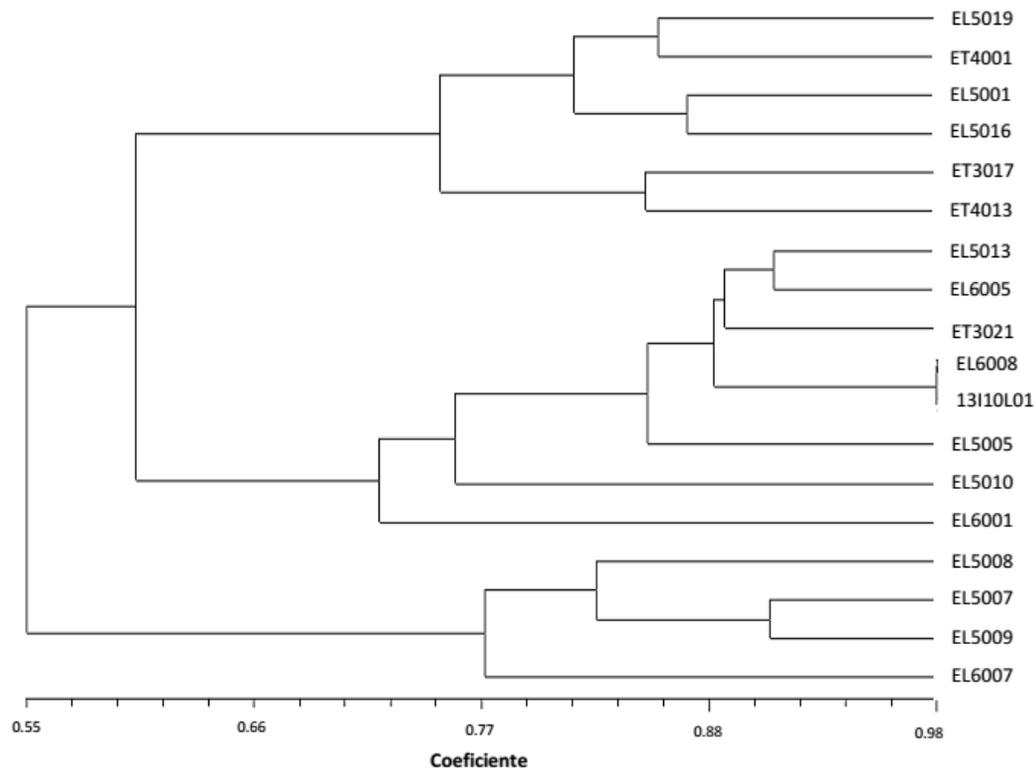


FIGURA 6. Dendrograma de similaridade na utilização de fontes de carbono entre 18 isolados de *Xanthomonas* sp. de sementes positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo. Porto Alegre, RS, 2014.

4.2.7 Reação de hipersensibilidade e patogenicidade

Nos resultados dos testes de RH tanto para plantas de tabaco quanto de tomateiro não foi observada nenhuma reação de hipersensibilidade incitada pelos 21 isolados positivos no ELISA. Muitos dos isolados de *Xanthomonas* spp. não induzem RH em plantas de tabaco mesmo em condições normais de inoculação e incubação (Lelliott & Stead 1987). No entanto, Shivalingaiah *et al.* (2012) observaram o aparecimento de necrose nas folhas de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. *xanthi*) 24 h após estas serem infiltradas com uma suspensão de células de Xoo. Em outro trabalho, Jabeen *et al.* (2012), testando 123 isolados de Xoo, observaram que 105 destes incitaram RH em plantas de tabaco (*Nicotiana rustica*). Adicionalmente, plantas de arroz cultivar IRGA 410, inoculadas com os 21 isolados de *Xanthomonas* sp., não demonstraram qualquer sintoma após duas semanas.

4.2.8 PCR multiplex e qPCR

Os 21 isolados positivos no ELISA (Agdia, BRA 8500) para Xoo não apresentaram curva de amplificação na qPCR com a sonda XRS específica para a espécie, apenas o DNA dos isolados de Xoo e Xoc utilizados como controle foram amplificados. Na PCR multiplex, realizada com oligonucleotídeos específicos para a detecção dos dois patovares de Xo, não houve amplificação dos fragmentos esperados por nenhum dos 21 isolados (Figura 7). Esses mesmos oligonucleotídeos iniciadores mostraram especificidade por amplificar os fragmentos de 164 isolados de Xoo e 89 de Xoc de diferentes regiões (Lang *et al.*, 2010). Os resultados obtidos neste

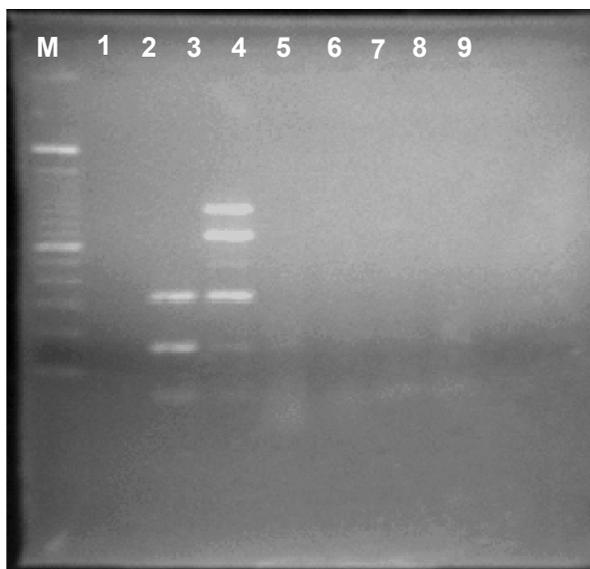


FIGURA 7. Perfil eletroforético do produto da PCR multiplex com oligonucleotídeos iniciadores Xoo80 (162 pb), Xo3756 (331 pb), Xoc 3866 (691) e Xoc 3864 (945 pb). (M) marcador, (1) água, (2) Xoo, (3) Xoc (4-9) *Xanthomonas* sp. Porto Alegre, RS, 2014.

estudo, assemelham-se aos encontrados por Lang *et al.* (2010), os autores utilizaram este mesmo conjunto de oligonucleotídeos para avaliar bactérias amarelas incapazes de causar doenças em plantas de arroz. A possibilidade desses isolados serem Xo foi excluída e a existência de reações cruzadas com outras *Xanthomonas* sp. no ELISA para Xoo confirmada.

Com base na interação dos resultados obtidos, verifica-se que as técnicas moleculares, bioquímicas e biológicas utilizadas permitiram claramente distinguir os 21 isolados de *Xanthomonas* sp. positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) dos patovares de Xo. As técnicas moleculares apresentaram ser mais satisfatórias para diferenciar *Xanthomonas* saprófitas dos patovares de Xo, visto que os oligonucleotídeos iniciadores específicos para os patovares de Xo e a sonda XRS, não amplificaram com nenhum dos 21 isolados. Estes mesmos isolados não foram capazes de incitar reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco e tomateiro e nenhum sintoma foi

observado em plantas de arroz, independente do método de inoculação utilizado. Além disso, não houve correspondência para a utilização das fontes de carbono entre os isolados de *Xanthomonas* sp. e os patovares de Xo.

Essa pesquisa é importante para se conhecer a população de outras *Xanthomonas* sp. associadas a sementes de arroz, uma vez que podem gerar resultados falso-positivos. Estirpes bacterianas que foram isoladas de plantas de arroz apresentando sintomas semelhantes ao crestamento bacteriano, no Texas e na Louisiana, EUA, deram resultado positivo para Xo em testes sorológicos e de ácidos graxos (Jones *et al.*, 1989). Lang *et al.* (2010) observaram que estas estirpes podem ser patovares de Xo, mas são claramente distintas das estirpes de Xoo e Xoc dos países asiáticos e africanos. O conhecimento da diversidade destes isolados oriundos de sementes de arroz é um importante pré-requisito para o desenvolvimento de métodos de detecção, classificação taxonômica e estudos epidemiológicos, principalmente quando há ocorrência de diferentes espécies relacionadas no mesmo hospedeiro, como é o caso desta pesquisa, evitando possíveis reações cruzadas com Xoo e Xoc.

O destaque ocupado pela cultura do arroz no Brasil e o crescimento da importação de sementes, aumenta a necessidade do controle rigoroso por parte da defesa sanitária vegetal. As condições de clima temperado e tropical do país podem proporcionar ambiente favorável para adaptação dos patovares de Xo no Brasil. Além disso, o órgão de fiscalização tem interceptado sementes de arroz infectadas com essas bactérias, sendo que nos últimos anos o Brasil tem importado uma grande quantidade de sementes de arroz da Argentina, Uruguai, Estados Unidos e Índia. Embora Xoo e Xoc sejam endêmicas na

Índia, os demais importam sementes de países onde estas bactérias ocorrem. Esses fatos demonstram a importância da utilização de um método específico que permita a realização das análises fitossanitárias que assegurem a liberação do material vegetal livre desses patógenos, como uma estratégia de manejo em áreas indenizadas.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições em que o estudo foi conduzido, permitiram as seguintes conclusões:

- 1 A sonda XRS desenhada a partir do gene receptor de sideróforos apresenta especificidade e sensibilidade na detecção de *X. oryzae*.
- 2 O método utilizado credencia-o para a detecção de Xo em programas de certificação de sementes e inspeções quarentenárias.
- 3 As sementes de arroz analisadas estão livres de Xo.
- 4 O ELISA (Agdia, BRA 85000) não deve ser utilizado isoladamente para diagnosticar a presença de Xoo em lotes de sementes de arroz.
- 5 Isolados de *Xanthomonas* falso-positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para Xoo, apresentam perfis bioquímicos, biológicos e moleculares distintos de *X. oryzae*.
- 6 Populações de *Xanthomonas* sp. não patogênicas estão associadas com arroz interferem no diagnóstico fitossanitário.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, N.; OKU, T. PCR-mediated detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by amplification of 16S-23S rDNA spacer region sequence. **Journal of General Plant Pathology**, Kagoshima, v. 66, n. 4, p. 303-309, 2000.

ADHIKARI, T. B.; MEW, T. W.; LEACH, J. E. Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 89, n. 7, p. 687-694, 1999.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2008. p. 186-191.

AKHTAR, M. A.; RAFI, A.; HAMEED, A. Comparison of methods of inoculation of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice cultivars. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 40, n. 5, p. 2171-2175, 2008.

ALICEWEB. **Importação de sementes de arroz dezembro de 2012 a dezembro de 2013**. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em: 3 jan. 2014.

ALVAREZ, A. M. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 339-366, 2004.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-Time PCR**: understanding CT. 2008. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_053906.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2014.

ARZANLOU, M. et al. Molecular diagnostics for the sigatoka disease complex of banana. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 9, p. 1112-1118, 2007.

BACH, H. J. et al. TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 85-91, 2003.

BAI, J. et al. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 13, n. 12, p. 1322-1329, 2000.

BOGDANOVE, A. J.; SCHORNACK, S.; LAHAYE, T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, v. 13, n. 4, p. 394–401, 2010.

BRADBURY, J. F. Genus II. *Xanthomonas* Dowson. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p.199-210.

BRAR, D. S.; KHUSH, G. S. Alien introgression in rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 35-47, 1997.

CARVALHO, J. B. **Desenvolvimento e validação de qPCR para detecção de pectobactérias e *Ralstonia solanacearum* em tubérculos de batata**. 2009. 186 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CHAN, J.; GOODWIN, P. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 17, n. 6, p. 489-508, 1999.

CHO, M. S. et al. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by real-time bio-PCR using pathovar-specific primers based on an rhs family gene. **Plant Disease**, St. Paul, v. 95, n. 5, p. 589-594, 2011.

COLLARD, B .C. Y. et al. Rice molecular breeding laboratories in the genomics era: current status and future considerations. **International Journal Plant Genomics**, New York, v. 2008. 2008. 25 p.

COMMON WEALTH AGRICULTURAL BUREAU INTERNATIONAL. ***Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Rice Leaf Blight)**. CABI: Wallingford, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra Brasileira: Grãos**. 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_09_10_43_44_boletim_portuges_agosto_2013_port.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2014.

COUNCE, P.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. J. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 2, p. 436-443, 2000.

CULLEN, D. W. et al. Development and validation of conventional and quantitative polymerase chain reaction assays for the detection of storage rot potato pathogens, *Phytophthora erythroseptica*, *Pythium ultimum* and *Phoma foveata*. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 155, p. 309-315, 2007.

DE BOER, S. H.; ELPHINSTONE, J. G.; SADDLER, G. S. Molecular detection strategies for phytopathogenic bacteria. In: PUNJA, Z. K.; DE BOER, S. H.; SANFARCON, H. I. **Biotechnology and Plant disease management**. Oxford: Oxford Press, p.165-194, 2007.

DE BOER, S. H.; WARD, L. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 5, p. 854-858, 1995.

DELGADO, M. et al. Evaluación sanitaria de semillas de cuatro variedades de arroz en Venezuela. **Agronomia Tropical Maracay**, Maracay, v. 52, n. 2, p. 223-234, 2002.

DI, M. et al. Selective recovery of *Xanthomonas* spp. from rice seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 11, p. 1358-1363, 1991.

DINH, H. D. et al. Pathotype profile of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from the rice ecosystem in Cuulong River Delta. **Omonrice**, Can Tho, v. 16, n. 1, p. 34-40, 2008.

D.O.U Diário Oficial da União - Instrução Normativa nº 59, de 18 de dezembro de 2013. Estabelece a lista de pragas quarentenárias ausentes (A1) e de pragas quarentenárias presentes (A2) para o Brasil e aprovar os procedimentos para as suas atualizações. Altera a Instrução Normativa nº 41 de 01 de julho de 2008, publicada no Diário Oficial da União de 01 de julho de 2008, Seção 1, página 18. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 dez. 2013.

EL TASSA, S. O. M.; DUARTE, V. Ocorrência de mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, em Maracujazeiro no Estado de Mato Grosso. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 647-647, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistemas de produção**. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/arroz/arrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>>. Acesso em: 27 jan. 2014.

FAO. **Crop Prospects and Food Situation**. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/017/a1998e/a1998e.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2014

FAOSTAT. In: FAO STATISTICAL DATABASE. **Base de dados da produção e comércio agrícola mundial**. 2013. Disponível em: <<http://migre.me/d8uYE>>. Acesso em: 25 fev. 2014.

GARRITY, G. et al. Part 5 The Bacteria: Phylum Proteobacteria, Class Gammaproteobacteria. **The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea**. Disponível em: <<http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/view/181/214>>. Acesso em: 9 jan. 2014.

GARRITY, G. M. et al. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. v.2. Springer-Verlag, 2005.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New Yourk: Spiinger, 2000. 1135 p.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2004. 4001 p.

GEORGE, M. L. C. et al. Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in southeast Asia detected using PCR-based DNA fingerprinting. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 3, p. 302-309, 1997.

GNANAMANICKAM, S. S. et al. An overview of bacterial blight disease of rice and strategies for its management. **Current Science**, Bangalore, v. 77, n. 11, p.1435-1443,1999.

GONZALEZ, C. et al. Molecular and pathotypic characterization of new *Xanthomonas oryzae* strains from West Africa. **Molecular Plant Microbe**, Malden, v. 20, n. 5, p. 534–546, 2007.

GOSSELE, F. et al. Differentiation between the bacteria causing bacterial blight (BLB), bacterial leaf streak (BLS), and bacterial brown blotch on rice. **International Rice Research Newsletter**, Manila, v. 10, n. 1, p. 23–24, 1985.

GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1992.

GUPTA, V. S. et al. Assessment of genetic variability and strain identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* using RAPD-PCR and IS1112-based PCR. **Current Science**, Bangalore, v. 80, n. 8, p. 1043-1049, 2001.

HAHN, S. Fiscalização encontra carga de arroz com sementes contaminadas. 2007. **No País da Fiscalização**, 18 dez. 2007. Disponível em:<<http://nopaisdafiscalizacao.com.br/?p=22>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

HALFELD-VIEIRA, B. A. et al. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv.*phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 737-740, 2001.

HAUBEN, L. et al. Comparison of 16s Ribosomal DNA Sequences of All *Xanthomonas* Species. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, n. 2, p. 328-335, 1997.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology Nature Publishing Company**, New York, v. 11, n. 1, p. 1026-1030, 1993.

HOLDEN, M. J. et al. Evaluation of extraction methodologies for corn kernel (*Zea mays*) DNA for detection of trace amounts of biotechnology-derived DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 2468-2474, 2003.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Bacterial leaf streak**. Disponível em: <<http://www.knowledgebank.irri.org/RiceDoctor/information-sheets-mainmenu-2730/diseases-mainmenu-2735/bacterial-leaf-streak-mainmenu-2759.html>>. Acesso em: 21 fev. 2014.

JABEEN, R.; IFTIKHAR, T.; BATOOL, H. Isolation, characterization, reservation and pathogenicity test of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing BLB disease in rice. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 44, n. 1, p. 261-265, 2012.

JANSE, D. D. **Phytobacteriology: principles and practice**. Wallingford: CABI Publishing, 2005.

JONES, R.K. et al. Identification of low-virulence strains of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from rice in the United-States. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 79, n. 5, p. 984-990, 1989.

KANG, M. J. et al. Specific detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in infected rice plant by use of PCR assay targeting a membrane fusion protein gene. **Journal Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 18, n. 9, p. 1492-1495, 2008.

KENNEDY, G.; BURLINGAME, B. Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 80, n. 4, p. 589-596, 2003.

KREADER, C. A. Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 3, p.1102–1106, 1996.

LAN FANG, W. et al. RAPD analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* from rice in Yunnan. **Journal of Hunan Agricultural University**, Hunan, v. 35, n. 2, p. 123-126, 2009.

LANG, J. M. et al. Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 3, p. 311-319, 2010.

LEE, K.S. et al. Inheritance of resistance to bacterial blight in 21 cultivars of rice. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 2, p. 147–152, 2003.

LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease**, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987. 216 p.

LEUNG, H. et al. Sustainable disease resistance in rice: current and future strategies. In: INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 4., 2004, Brisbane, Australia. **Proceedings...** Brisbane, Australia. 2004.

LEYNS, F. et al. The host range of the genus *Xanthomonas*. The **Botanical Review**, Bronx, v. 50, n. 3, p. 308-356, 1984.

LORE, J. S. et al. Genotypic and pathotypic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the cause of bacterial blight of rice in Punjab State of India. **Journal of Phytopathology**, Malden, v. 159, n. 7, p. 479–487, 2011.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerância de patógenos associados a sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, n. 1, p. 229-263, 1994.

MARTINS, O. M.; Oliveira, M. R. V. Pest risk analysis on the agent of bacterial blight of rice, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONGRESS, 16, 2007. Glasgow. Congress Proceedings...Glasgow: BCPC, 2007. p.566-567.

MACKAY, I. M. Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization. UK: Caister Academic Press Norfolk, 2007.

MCGUIERE, R. G.; JONES, J. B.; SASSER, M. Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. **Plant disease**, Saint Paul, v. 70, n. 9, p. 887-891, 1986.

MEW T. W.; MISTRA J. K. A Manual of Rice Seed Health Testing. Manila: IRRI, Manila (PH), 1994.

MEW, T. W. et al. Focus on bacterial blight of rice. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, n. 1, p. 5–12, 1993.

MEW, T. W.; VERA CRUZ, C. M.; MEDALLA, E. S. Changes in race frequency of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in response to rice cultivars planted in the Philippines. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 76, n. 10, p. 1029–1032, 1992.

MEYER, D. F.; BOGDANOVE, A. J. Plant Pathogenic Bacteria—Genomics and Molecular Biology. In: JACKSON, R. W. (Ed.). **Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2009. p. 147-161.

MIZUKAMI, T.; WAKIMOTO, S. Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 7, n. 1, p. 51–72, 1969.

MOURA, A. B. et al. Detecção de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causadora da queima bacteriana do arroz em lotes de grãos produzidos no Uruguai. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 25, p. 326, 2000. Suplemento.

NELSON, R. J. et al. Relationship between phylogeny and pathotypes for the bacterial blight pathogen of rice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 9, p. 3275–3283, 1994.

NIÑO-LIU, D. O.; RONALD, P. C.; BOGDANOVE, A. J. *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 7, n. 5, p. 303-324, 2006.

NODA, T. et al. Geographical distribution of pathogenic races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Japan in 1991 and 1993. **Annual Phytopathology Society Japan**, Tokyo, v. 62, n. 1, p. 549–553, 1996.

NYVALL, R. F. **Field crop diseases**. Ames, Iowa: State University Press. 1999. 1021 p.

OCHIAI, H. et al. Genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* suggests contribution of large numbers of effector genes and insertion sequences to its race diversity. **Japan Agricultural Research Quarterly**, Tsukuba, v. 39, n. 4, p. 275–287, 2005.

OEPP/EPOO. European and Mediterranean Plant Protection organization. Diagnostic: *Xanthomonas oryzae*. **EPP Bulletin**, Paris, v. 37, n. 3, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2338.2007.01162.x/pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2011.

OGAWA, T. et al. Grouping of rice cultivars based on reaction pattern of Philippine races of bacterial blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. **Japanese Journal of Breeding**, Tokyo, v. 41, n. 1, p. 109–120, 1991.

OU, S.H. **Rice diseases**. Kew, Surrey: Commonwealth Agricultural Bureau. 1985.

OU, S.H. **Rice Diseases**. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute. 1972.

OZAKMAN, M.; SCHAAD, N. W. A real-time BIO-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in asymptomatic potato tubers. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 25, n. 3, p. 232-239, 2003.

PARIZZI P.; MORANDINI, I. Legislação fitossanitária e normas em fitossanidade. Brasília, DF: ABEAS, 2006. 120 p.

PARKINSON, N. et al. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 57, n. 12, p. 2881–2887, 2007.

PASTRIK, K. H.; MAISS, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in Potato Tubers by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Phytopathology**, Malden, v. 148, n. 11, p. 619–626, 2000.

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**, Springer, 2008. 332 p.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PICARD, C. et al. Detection and Enumeration of Bacteria in Soil by Direct DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 9, p. 2717-2722, 1992.

RADEMAKER, J. L. et al. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 50, n. 2, p. 665-677, 2000.

RAJAGOPAL, L. et al. The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. **Federation of European Biochemical Societies**, Amsterdam, v. 415, n. 2, p. 125-128, 1997.

RAYMAEKERS, M. et al. Checklist for optimization and validation of Real-Time PCR assays. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 23, n. 3, p. 145-151, 2009.

RAYMUNDO, A.K. et al. Analysis of DNA polymorphism and virulence in Philippine strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 5, p. 434-440, 1999.

REDDY, A. P. K. et al. Relationship of bacterial leaf blight severity to grain yield of rice. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 1, p. 967-969, 1979.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0, User's Guide**. New York: Exeter Software. 1998.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV, 1995. 283 p.

ROSSEN, L. et al. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 17, n. 1, p. 37-45, 1992.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **Genome Research**, New York, v. 4, n. 1, p. 185-194, 1995.

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

RYBA-WHITE, M.; NOTTEGHEM, J. L.; LEACH, J. E. Comparison of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains from Africa, North America, and Asia by restriction fragment length polymorphism analysis. **International Rice Research**, Manila, v. 20, n. 1, p. 25-26, 1995.

SAKTHIVEL, N.; MORTENSEN, C. N.; MARTHUR, S. B. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 56, n. 3, p. 435-441, 2001.

SALZBERG, S. et al. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A. **BMC Genomics**, London, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2008.

SCHAAD N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3 ed. St. Paul. **The American Phytopathology Society**, St. Paul, 2001, 373 p.

SCHAAD, N. W *et al.* Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, n. 12, p. 1095–1100, 1999.

SCHAAD, N. W.; FREDERICK, R. D. Real Time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Burnaby, v. 24, n. 3, p. 250-258, 2002.

SCHAFER, J. T.; MOURA, A. B.; ALVARADO, I. C. M. Ocorrência DE *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* em arroz produzido no Rio Grande do Sul. In: XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2009, Rio de Janeiro. **Tropical Plant Pathology** - Suplemento, 2009.

SCHMITZ, J. F. *et al.* Presença de xantomonadina e PCR com primers universais no isolamento de *Xanthomonas* spp. associadas a sementes de arroz. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA- UFRGS, 22., 2010, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre: UFRGS, 2010.

SCHMITZ, J. F. *et al.* Caracterização de isolados de *Xanthomonas* sp. oriundos de sementes de arroz. In: 43º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2010, Cuiabá. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, Suplemento, p. 259, 2010.

SEAL, S. E. *et al.* Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16s rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 139, n. 1, p. 1587-1594, 1993.

SHENGE, K. C.; MABAGALA, R. B.; MORTENSEN, C. N. Identification and characterization of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Tanzania by Biolog system and sensitivity to antibiotics. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 6, n. 1, p.15-22, 2007.

SHIVALINGAIAH, U. S.; SATEESH, M.K. Molecular Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice seeds. **Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**, Ikenobe, v. 6, n. 1, p. 44-47, 2012.

SINGH, D. V. *et al.* Effect of bacterial leaf streak on the quantitative and qualitative characters of rice. **Indian Journal Mycology Plant Pathology**, Shakti Nagar, v. 10, n. 1, p. 67–68, 1980.

SOSBAI. **Arroz Irrigado**: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Porto Alegre: Sosbai, 2010. 188 p.

SOSBAI. **Arroz Irrigado**: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Gravatal: Sosbai, 2012. 177 p.

STARR, M. P. *et al.* Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins, novel brominated aryl-polyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 113, n. 1, p. 1-9, 1977.

SUNDARAM, R. M. *et al.* Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. **Euphytica**, Wageningen, v. 163, n. 2, p. 215-224, 2008.

SWINGS, J. *et al.* Reclassification of the causal agents of bacterial blight *Xanthomonas campestris* pathovar *oryzae* and bacterial leaf streak *Xanthomonas campestris* pathovar *oryzicola* of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* new species Ex Ishiyama 1922 Revived Name. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 40, n. 3, p. 309–311, 1990.

TENGEL, C. *et al.* PCR-Based Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Highly Processed Foodstuffs. **BioTechniques**, New York, v. 31, n. 2, p. 426-429, 2001.

TRÉBAOL, G. *et al.* Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae*: a new species causing bacterial bract spot of artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, London, v. 50, n. 4, p. 1471–1478, 2000.

TRIPLETT, L. R. *et al.* Genomic Analysis of *Xanthomonas oryzae* isolates from rice grown in the United States reveals substantial divergence from known *X. oryzae* pathovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 12, p. 3930–3937, 2011.

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

VAUTERIN, L.; RADEMAKER, J.; SWINGS, J. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 677-682. 2000.

VERA CRUZ, C. M. *et al.* Laboratory manual on detection of *Xanthomonas oryzae* pathovars from rice seeds, Manila, IRRI, 2012. 49 p.

- VERNIERE, C. et al. Evaluation of the Biolog substrate utilization system to identify and assess metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 1, p. 243-249, 1993.
- WELLER, S. A.; STEAD, D.E. Detection of root mat associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 92, n. 1, p. 118–126, 2002.
- WELLER, S. A.; ELPHINSTONE, J. G.; SMITH, N. Detection of *Ralstonia solanacearum* from potato tissue by post enriched TaqMan™ PCR. Bull. **OEPP**, France, v. 30, n. 3, p. 381–383, 2000.
- WHITE, F. F.; YANG, B. Host and pathogen factors controlling the rice *Xanthomonas oryzae* interaction. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 150 , n. 4, p. 1677–1686, 2009.
- WILSON, Z.; POWER, J. B. Elimination of systemic contamination in explants and protoplast cultures of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 7, n. 8, p. 622-625, 1989.
- WONNI I. et al. Analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* population in Mali and Burkina Faso reveals a high level of genetic and pathogenic diversity. **Phytopathology**, Saint Paul, 2013.
- XIE, G.L.; MEW, T. W. A leaf inoculation method for detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* from rice seed. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 9, p. 1007-1011, 1998.
- XIN JIAN, Z. et al. DNA microarray expression analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice leaves at early infection stages using selective bacterial transcript labeling with genome-directed primers. **Scientia Agricultura Sinica**, Windsor, v. 42, n. 10, p. 3501-3508, 2009.
- ZHAO, W. J. et al. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in seeds using a specific TaqMan probe. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 35, n. 2, p. 119-127, 2007.
- ZIJLSTRA, C.; VAN HOOFF, R. A. A multiplex Real time Polymerase Chain Reaction (TaqMan) assay for the simultaneous detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, n. 11, p. 1255-1262, 2006.

7 APÊNDICE

APÊNDICE 1. Média da atividade metabólica de 18 isolados positivos no ELISA (Agdia, BRA 85000) para *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em 95 fontes de carbono. Porto Alegre, RS, 2014.

Fonte de Carbono	Isolados ¹																	% ²	%Xo ³	
	EL5019	EL5013	EL5001	EL5008	EL5010	EL5005	EL5007	EL5016	EL6001	EL6005	EL6008	EL5009	EL6007	ET4001	ET3017	ET4013	13110L01			ET3021
A2	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	33	0
A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100
A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	70
A5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	30
A6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	40
A7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
A8	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	67	40
A9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
A10	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	67	20
A11	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	50	0
A12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	90

continuação APÊNDICE 1. Média da atividade metabólica de 18 isolados positivos no ELISA (Agdia, BRA85000) para *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em 95 fontes de carbono. Porto Alegre, RS, 2014.

Fonte de Carbono		Isolados ¹																% ²	%Xo ³		
		EL5019	EL5013	EL5001	EL5008	EL5010	EL5005	EL5007	EL5016	EL6001	EL6005	EL6008	EL5009	EL6007	ET4001	ET3017	ET4013			13110L01	ET3021
B1	meso-Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
B2	D-Frutose	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	67	100	
B3	L-Fucose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	11	30	
B4	D-Galactose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	94	40	
B5	Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	89	70	
B6	α-D-Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	0	
B7	meso-Inositol	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	33	0	
B8	α-D-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	94	0	
B9	Lactulose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	94	0	
B10	Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100	
B11	D-Manitol	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	67	0	
B12	D-Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	90	
C1	D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	94	0	
C2	β-Metil-D-glucosídeo	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	61	0	
C3	D-Psicose	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	44	90	
C4	D-Raffinose	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	83	0	
C5	L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	6	0	
C6	D-Sorbitol	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	33	10	
C7	Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	70	
C8	D-Trealose	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	83	100	
C9	Turanose	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	61	40	
C10	Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	
C11	Metilpiruvato	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	78	100	
C12	Succinato de Metila	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	50	70	

continuação APÊNDICE 1. Média da atividade metabólica de 18 isolados positivos no ELISA (Agdia, BRA8500) contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em 95 fontes de carbono. Porto Alegre, RS, 2014.

Fonte de Carbono	Isolados ¹																% ²	%Xo ³		
	EL5019	EL5013	EL5001	EL5008	EL5010	EL5005	EL5007	EL5016	EL6001	EL6005	EL6008	EL5009	EL6007	ET4001	ET3017	ET4013			13110L01	ET3021
D1	Ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	22	0
D2	Ácido cis-aconítico	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	39	10
D3	Ácido cítrico	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	39	10
D4	Ácido Formico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	11	0
D5	Ácido D-Galacturônico lactona	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	11	0
D6	Ácido D-Galacturônico	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	56	0
D7	Ácido D-Glucônico	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	72	0
D8	Ácido D-Glucosamínico	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	50	0
D9	Ácido D-Glucurônico	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	61	0
D10	Ácido α-Hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	11	10
D11	Ácido β-Hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	17	0
D12	Ácido γ-Hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	6	0
E1	Ácido p-Hidroxifenilacético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
E2	Ácido Itacônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
E3	Ácido α-Ketobutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	6	0
E4	Ácido α-Ketoglutárico	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	33	100
E5	Ácido α-Ketovalérico	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	22	0
E6	Ácido D,L-Láctico	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	72	70
E7	Ácido Malônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
E8	Ácido Propiônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	6	10
E9	Ácido Quínico	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	44	0
E10	Ácido D-Sacárico	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	39	0
E11	Ácido Sebácico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
E12	Ácido Succínico	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	61	90
F1	Ácido Bromosuccínico	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	78	70
F2	Ácido Succinâmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	6	30

continuação APÊNDICE 1. Média da atividade metabólica de 18 isolados positivos no ELISA (Agdia, BRA8500) contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em 95 fontes de carbono. Porto Alegre, RS, 2014.

Fonte de Carbono	Isolados ¹																	% ²	%Xo ³	
	EL5019	EL5013	EL5001	EL5008	EL5010	EL5005	EL5007	EL5016	EL6001	EL6005	EL6008	EL5009	EL6007	ET4001	ET3017	ET4013	13110L01			ET3021
F3	Glucuronamida	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	17	0
F4	Alaninamida	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	50	60
F5	D-Alanina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	28	60
F6	L-Alanina	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	67	60
F7	L-Alanil glicina	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	50	50
F8	L-Asparagina	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	44	0
F9	Ácido L-aspártico	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	67	0
F10	Ácido L-Glutâmico	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	72	80
F11	Ácido Glicil-L-aspártico	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	33	10
F12	Ácido Glicil-L-glutâmico	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	61	80
G1	L-Histidina	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	44	0
G2	Hidroxi-L-prolina	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	33	0
G3	L-Leucina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	11	0
G4	L-Ornitina	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	39	0
G5	L- Fenil alanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
G6	L-Prolina	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	56	0
G7	Ácido l- Piroglutâmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
G8	D-Serina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
G9	L-Serina	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	61	0
G10	L-Treonina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	6	0
G11	DL-Carnitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
G12	Ácido γ-Amino butírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
H1	Ácido Urocânico	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	33	10
H2	Inosina	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	33	0

continuação APÊNDICE 1. Média da atividade metabólica de 18 isolados positivos no ELISA (Agdia, BRA8500) contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em 95 fontes de carbono. Porto Alegre, RS, 2014.

Fonte de Carbono		Isolados																% ¹	%Xo ²	
		EL5019	EL5013	EL5001	EL5008	EL5010	EL5005	EL5007	EL5016	EL6001	EL6005	EL6008	EL5009	EL6007	ET4001	ET3017	ET4013			13110L01
H3	Uridina	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	28	0
H4	Timidina	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	39	0
H5	Fenil etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
H6	Putrescina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
H7	2-Aminoetanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	11	0
H8	2,3-Butanediol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
H9	Glicerol	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	83	0
H10	DL- α -Glicerolfosfato	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	33	0
H11	Glicose 1-fosfato	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	39	0
H12	Glicose 6-fosfato	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	44	0

¹ Porcentagem de isolados positivos. ² Porcentagem de isolados de *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* e *X. oryzae* pv *oryzicola* positivos (Vauterin, et al. , 1995).