

## Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

### Semi-selective medium for isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *Viticola*

Ana Rosa Peixoto<sup>1</sup> Rosa de Lima Ramos Mariano<sup>2</sup>  
Ivanise Oliveira Viana<sup>2</sup>

#### -NOTA-

#### RESUMO

O cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* é a fitobacteriose mais importante da videira no Submédio São Francisco. O isolamento de *X. campestris* pv. *viticola* de tecidos vegetais infectados é dificultado pela presença de contaminantes bacterianos, entre os quais *Microbacterium barkeri*. Objetivando-se a formulação de meio de cultura semi-seletivo, 22 isolados de *X. campestris* pv. *viticola* foram testados com relação a 30 antibióticos. O meio semi-seletivo NYDAM (extrato de carne 3, peptona 5, glicose 10, extrato de levedura 5, ágar 18 e ampicilina 0,1 em g L<sup>-1</sup>) inibiu *M. barkeri* e bactérias fitopatogênicas podendo ser utilizado para isolar *X. campestris* pv. *viticola* de hospedeiros com infecção natural em campo.

**Palavras-chave:** cancro da videira, *Vitis* sp., antibióticos.

#### ABSTRACT

Bacterial canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* is the most important bacterial disease of grapevine in Submédio São Francisco. The isolation of *X. campestris* pv. *viticola* of infected plant tissues is impaired by the presence of bacterial contaminants including *Microbacterium barkeri*. Aiming to formulate a semi-selective medium 22 *X. campestris* pv. *viticola* isolates were tested in relation to 30 antibiotics. The semi-selective NYDAM medium (meat extract 3, peptone 5, glucose 10, yeast extract 5, agar 18 and ampicilin 0.1 in gL<sup>-1</sup>) inhibited *M. barkeri* and plant pathogenic bacteria allowing *X. campestris* pv. *viticola* isolation from hosts naturally infected in the field.

**Key words:** bacterial canker of grapevine, *Vitis* sp., antibiotics.

No início de 1998, foi detectado, pela primeira vez no Brasil, o cancro bacteriano da videira em parreirais do Submédio São Francisco, onde a doença vem causando prejuízos em cultivares suscetíveis (MALAVOLTA et al., 1999). O agente causal da doença é a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, cujo isolamento a partir de órgãos vegetais infectados é muitas vezes dificultado pela presença de bactérias saprófitas, destacando-se um contaminante de cor inicialmente branca e posteriormente amarela, com rápido crescimento, que dificulta o crescimento e reconhecimento de *X. campestris* pv. *viticola* em meios de cultura de rotina, identificado como *Microbacterium barkeri*.

Meios semi-seletivos são valiosos para o isolamento de bactérias fitopatogênicas de tecidos de plantas e solo e alguns podem ser tão sensíveis quanto a reação da polimerase em cadeia (PCR) (WANG et al., 1999) ou mais sensíveis que técnicas imunológicas (ALVAREZ & LOU, 1985; WANG et al., 1999), sendo fáceis de usar e menos dispendiosos (TOUSSAINT et al., 2001). Porém, um meio que restringe o surgimento de colônias de microrganismos saprófitos, geralmente apresenta altos níveis de repressão do patógeno alvo (MOURA & ROMEIRO, 1998), ou seja, baixa eficiência (WYDRA et al., 2004).

<sup>1</sup>Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Av Edgard Chastnet, s/n, 48900-000, Juazeiro, BA, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), 52171-030, Recife, PE, Brasil. E-mail: rmariano@truenet.com.br. Autor para correspondência (R.L.R. Mariano).

O objetivo deste trabalho foi formular um meio semi-seletivo para isolamento de *X. campestris* pv. *viticola* a partir de órgãos vegetais infectados.

Vinte e dois isolados de *X. campestris* pv. *viticola*, obtidos de videiras com sintomas típicos do cancro bacteriano ou de plantas invasoras com sintomas similares, coletados em parreirais comerciais (Tabela 1), foram multiplicados e mantidos em meio NYDA (extrato de carne 3, peptona 5, glicose 10, extrato de levedura 5, ágar 18g L<sup>-1</sup> de água destilada). A partir de cultivo com 48 horas em NYDA, as suspensões dos isolados foram feitas em água destilada esterilizada (ADE) e aferidas em fotolorímetro Analyser 500 M, de acordo com equação previamente determinada, onde  $A_{570} = 0,4$  corresponde a 10<sup>8</sup>UFC mL<sup>-1</sup>. Essas suspensões foram utilizadas nos antibiogramas e testes de eficiência.

Os antibiogramas qualitativos foram realizados em placas de Petri contendo NYDA solidificado, sobre o qual 100µL de suspensão bacteriana foram espalhados. Após secagem da suspensão, quatro discos de antibióticos distintos (Tabela 2) foram depositados por placa, com quatro repetições. A incubação foi realizada a 29°C, durante 48 horas, quando se verificou a ocorrência ou não de halos de inibição.

No teste de supressividade, foram utilizadas culturas puras das espécies: *M. barkeri*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Agrobacterium tumefaciens* (biovar 1 e biovar 3), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorri*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Cada isolado foi semeado, pelo método de estrias, em placas contendo meio semi-seletivo e NYDA (controle), com quatro repetições. As placas foram incubadas a 29°C, por 48 horas, quando se verificou o crescimento ou não das culturas.

No teste de eficácia, foram utilizados os isolados Xcv1, 1385-98, UnB1190 e UnB 1216. Aliquotas de 100µL de suspensões bacterianas com 10<sup>3</sup>UFC mL<sup>-1</sup> foram plaqueadas em meio semi-seletivo e NYDA, incubadas por 48 horas, a 29°C, quando foi feita a contagem de colônias. A eficácia foi determinada pela fórmula  $E(\%) = [(UFC \text{ em meio semi-seletivo}) / (UFC \text{ em NYDA})] \times 100$  (WYDRA et al., 2004).

Dos antibióticos testados, amoxicilina (10µg), ampicilina (10µg), cefaclor (30µg), clindamicina (2µg), optoquina (5µg), oxacilina (1µg), nitrofurantoina (300µg) e trimetropina (5µg) apresentaram baixa eficácia (0 a 10%) contra os isolados de *X. campestris* pv.

Tabela 1 - Identificação, hospedeiros, origem e procedência dos isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* avaliados para sensibilidade a antibióticos.

| Identificação do isolado | Hospedeiro                               | Origem                      | Procedência         |
|--------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| UnB 1216                 | Videira cv. Red Globe                    | Petrolina-PE                | UnB <sup>1</sup>    |
| UnB 1190                 | Videira cv. Red Globe                    | Petrolina-PE                | UnB                 |
| UnB 1223                 | Videira cv. Red Globe                    | Curaçá-BA                   | UnB                 |
| UnB 1224                 | Videira cv. Red Globe                    | Curaçá-BA                   | UnB                 |
| Xcv1                     | Videira cv. Red Globe                    | Juazeiro-BA                 | UFRPE <sup>2</sup>  |
| Xcv2                     | Fedegoso ( <i>Senna obtusifolia</i> )    | Petrolina-PE                | UFRPE               |
| Xcv3                     | Alecrim ( <i>Alternanthera tenella</i> ) | Petrolina-PE                | UFRPE               |
| Xcv4                     | Videira cv. Thompson                     | Petrolina-PE                | UFRPE               |
| Xcv5                     | Videira cv. Superior                     | Petrolina-PE                | UFRPE               |
| Xcv6                     | Videira cv. Superior                     | Petrolina-PE                | UFRPE               |
| Xcv7                     | Videira cv. Catalunha                    | Juazeiro-BA                 | UFRPE               |
| Xcv8                     | Videira cv. Catalunha                    | Juazeiro-BA                 | UFRPE               |
| Xcv9                     | Videira cv. Catalunha                    | Petrolina-PE                | UFRPE               |
| 1370                     | Videira cv. Red Globe                    | Petrolina-PE                | Instituto Biológico |
| 1376                     | Videira cv. Red Globe                    | Petrolina-PE                | Instituto Biológico |
| 1377                     | Videira cv. Red Globe                    | Petrolina-PE                | Instituto Biológico |
| 1385                     | Videira cv. Itália                       | Terezina-PI                 | Instituto Biológico |
| 1386                     | Videira cv. Ribière                      | Terezina-PI                 | Instituto Biológico |
| 1456                     | Videira cv. Red Globe                    | Santa Maria da Boa Vista-PE | Instituto Biológico |
| 1502                     | Videira cv. Red Globe                    | Petrolina-PE                | Instituto Biológico |
| 1505                     | Videira cv. Red Globe                    | Petrolina-PE                | Instituto Biológico |
| 1506                     | Videira cv. Red Globe                    | Petrolina-PE                | Instituto Biológico |

<sup>1</sup> Universidade de Brasília.

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco.

*viticola* estudados (Tabela 2). Portanto, esses antibióticos foram adicionados separadamente ao meio NYDA, fazendo-se os testes de crescimento de *X. campestris* pv. *viticola* e do saprófita *M. barkeri*. O único antibiótico que inibiu esta última bactéria foi a ampicilina, quando adicionada ao NYDA na concentração de 100ppm.

A eficácia do meio semi-seletivo variou de 10,8 (isolado Xcv1) a 29,4% (isolado 1385-98), concordando com TOUSSAINT et al. (2001), que relataram índices de 5,7 a 30,6% para *X. campestris* pv. *vitiens* em meio MMG. Por outro lado, 45,6 a 188,6% de eficácia foram obtidas no meio CCM para *X. axonopodis* pv. *vignicola* (WYDRA et al., 2004) e 65 a 100% para *Pectobacterium carotovorum* e *Pectobacterium atrosepticum* (CUPPELS & KELMAN, 1974).

O meio semi-seletivo foi supressivo apenas aos isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*, de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e de *Microbacterium barkeri*, os quais tiveram o crescimento totalmente inibido. Segundo MOURA & ROMEIRO (1993), meios semi-seletivos ou seletivos desenvolvidos para outras espécies de bactérias fitopatogênicas podem apresentar alta supressividade.

O meio semi-seletivo NYDAM (NYDA + ampicilina) (extrato de carne 3 g, peptona 5g, glicose 10g, extrato de levedura 5g, ágar 18g, ampicilina 100mg L<sup>-1</sup> de água destilada) desenvolvido neste trabalho permitiu o isolamento de *X. campestris* pv. *viticola* sem a presença de saprófitas, a partir de diversos tecidos vegetais infectados, facilitando a identificação do patógeno. NYDAM é um meio de preparo fácil e

Tabela 2 - Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* a diferentes antibióticos.

| Antibióticos                  | Concentração | % de isolados sensíveis <sup>1</sup> |
|-------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| Ácido nalidíxico              | 30µg         | 100                                  |
| Ácido Pipemídico              | 20cg         | 90                                   |
| Amicacina                     | 30µg         | 80                                   |
| Amoxicilina/Ácido clavulânico | 10µg         | 90                                   |
| Amoxicilina <sup>2</sup>      | 30µg         | 0                                    |
| Ampicilina + Sulbactam        | 10µg         | 55                                   |
| Ampicilina <sup>2</sup>       | 10µg         | 10                                   |
| Aztreoram                     | 30µg         | 70                                   |
| Cefaclor <sup>2</sup>         | 30µg         | 0                                    |
| Cefotaxima                    | 30µg         | 100                                  |
| Cefoxetina                    | 30µg         | 55                                   |
| Ceftazidima                   | 30µg         | 100                                  |
| Ceftriaxona                   | 30µg         | 90                                   |
| Ciprofloxacina                | 5µg          | 100                                  |
| Clindamicina <sup>2</sup>     | 2µg          | 0                                    |
| Cloranfenicol                 | 30µg         | 100                                  |
| Eritromicina                  | 15µg         | 100                                  |
| Estreptomicina                | 10µg         | 100                                  |
| Imipenem                      | 10µg         | 100                                  |
| Neomicina                     | 30µg         | 90                                   |
| Netilmicina                   | 30µg         | 100                                  |
| Nitrofurantoina <sup>2</sup>  | 300µg        | 0                                    |
| Norfloxacina                  | 10µg         | 100                                  |
| Optoquina <sup>2</sup>        | 5µg          | 0                                    |
| Oxacilina <sup>2</sup>        | 1µg          | 0                                    |
| Sulfazotrin                   | 25µg         | 100                                  |
| Sulfonamida                   | 300µg        | 80                                   |
| Tetraciclina                  | 30µg         | 100                                  |
| Ticarclina/Ácido Clavulânico  | 85µg         | 100                                  |
| Trimetropina <sup>2</sup>     | 5µg          | 0                                    |

<sup>1</sup>Porcentagem em relação a 22 isolados.

<sup>2</sup>Antibiótico com baixa eficácia a isolados de *X. campestris* pv. *viticola*.

não requer luz UV ou reagentes para a visualização e contagem de colônias. Nesse meio, bem como em NYDA, as colônias apresentam coloração branca, forma arredondada e bordos lisos, diferindo apenas no diâmetro da colônia (cerca de 1,5mm no meio NYDAM e 2,5mm em NYDA) após 48 horas de cultivo a 29°C. WYDRA et al. (2004) também observaram redução do tamanho das colônias de *X. axonopodis* pv. *vignicola* de 5mm para 1,5mm quando usaram o meio semi-seletivo CCM. Para identificação dos isolados obtidos no meio NYDAM, recomenda-se a inclusão de isolados de referência de *X. campestris* pv. *viticola* e a realização de testes de patogenicidade.

#### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de Doutorado, Produtividade em Pesquisa e Apoio Técnico concedidas.

#### REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, A.M.; LOU, K. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by ELISA. **Plant Disease**, Saint Paul, v.69, n.12, p.1082-1086, 1985.
- CUPPELS, D.; KELMAN, A. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. **Phytopathology**, Saint Paul, v.64, n.4, p.468-475, 1974.
- MALAVOLTA JR., V.A. et al. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.25, n.3, p.26-27, 1999.
- MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S. Desenvolvimento de um meio seletivo para *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.15, n.1, p.209-214, 1993.
- MOURA, A.B.; ROMEIRO, R.S. Meio seletivo para *Ralstonia solanacearum* baseado em resistência múltipla natural a antibióticos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.4, p.466-470, 1998.
- TOUSSAINT, V. et al. A new semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *vitiens*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. **Plant Disease**, Saint Paul, v.85, n.2, p.131-136, 2001.
- WANG, Z. K. et al. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, Oxford, v.48, n.2, p.245-252, 1999.
- WYDRA, K. et al. A diagnostic medium for the semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.110, n.10, p.991-1001, 2004.