

LUÍS THADEO POIANAS SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE
BACTÉRIAS DO GÊNERO *Xanthomonas* EM EUCALIPTOS**

Botucatu

2025

LUÍS THADEO POIANAS SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE
BACTÉRIAS DO GÊNERO *Xanthomonas* EM EUCALIPTOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ciência Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado.

Botucatu

2025

S586c	Silva, Luís Thadeo Poianas Caracterização morfológica, bioquímica e molecular de bactérias do gênero <i>Xanthomonas</i> em eucaliptos / Luís Thadeo Poianas Silva. -- Botucatu, 2025 80 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu Orientador: Edson Luiz Furtado 1. <i>Eucalyptus</i> sp.. 2. Fitopatologia. 3. Mancha foliar bacteriana. 4. <i>Xanthomonas</i> spp.. 5. Biologia molecular. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

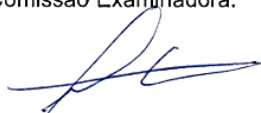
Título:

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO GÊNERO Xanthomonas EM EUCALIPTO

AUTOR: LUÍS THADEO POIANAS SILVA

ORIENTADOR: EDSON LUIZ FURTADO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Florestal,
pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO (Participação Presencial)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu UNESP



Profa. Dra. CLARISSA HAMAIO OKINO DELGADO (Participação Virtual)
. / Ikove Agro - Bioinsumos Agrícolas



Dra. VANESSA RAFAELA DE CARVALHO (Participação Presencial)
Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas

Botucatu, 31 de janeiro de 2025.

Dedico este trabalho a todos aqueles que
vislumbraram nos estudos um caminho para
concretizar suas aspirações e que, por meio disso, se
tornaram catalisadores da transformação social e da
construção de novos horizontes. Em especial, dedico-o
àqueles cujas identidades e histórias seguem
silenciadas, mas cuja força e resistência são uma fonte
constante de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão, primeiramente, é a Deus e aos espíritos benfeitores que, com sua luz, me guiam por caminhos de bondade, me fortalecem e concedem a coragem necessária para enfrentar e vencer os desafios que a vida apresenta.

Ao meu pai, Paulo, e ao meu irmão, Lucas, sou profundamente grato por todo apoio incondicional, pelos sábios conselhos e pelo amor que me cercam e fortalecem em cada passo da caminhada. Mesmo que muitas vezes distantes fisicamente, agradeço por me recordarem diariamente o propósito maior de suas presenças neste mundo. Vocês são a base sólida sobre a qual construí todos os meus sonhos.

A minha esposa, Carolina, minha parceira de vida e de ciência. Pesquisadora brilhante, você não só caminhou ao meu lado nessa jornada acadêmica, mas também me inspirou a ir além dos limites do conhecimento. Seus conselhos, apoio incondicional e o amor que me ofereceu são a força motriz que me impulsionou nos dias mais difíceis. Dedico a você, com todo meu amor e admiração, este trabalho, pois ele é tanto seu quanto meu.

A minha família em geral por serem ponto de apoio em momentos de tribulação e sempre desejarem o bem.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, por confiar em meu potencial e paciência nos momentos em que as dúvidas sobressaíam. Sem objeções, me ensinou a olhar para a ciência com curiosidade, rigor e paixão. Aos professores, Dra. Suzete A. Lanza Destéfano e Dr. José Belasque Junior, por compartilhar conhecimentos teóricos e práticos utilizados no desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos, Dra. Vanessa Rafaela de Carvalho e Dr. Bruno Cesar Rossini, pela expertise e generosidade ao compartilhar conhecimentos fundamentais de biologia molecular e agregarem no meu crescimento como pesquisador.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia e Patologia Florestal/FCA, pelas incontáveis vezes em que foram escape para os dias estressantes e desanimadores. Em especial ao Dr. Lucas A. Benso por sempre estar de prontidão em me auxiliar quando necessário e por ser um pesquisador nato, sua postura é um exemplo a ser seguido.

A Faculdade de Ciências Agrônômicas – Campus de Botucatu, Departamento de Proteção de Plantas/FCA, Centro de Análises Genômicas/IBTEC, Instituto Biológico de Campinas e Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, minha sincera gratidão pela disponibilização de uma estrutura, recursos e ambiente acadêmico de excelência. Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Danilo Simões, pela sua excepcional coordenação e pela condução de um programa que se destaca pela alta qualidade e compromisso com a formação científica. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Ilove Agro, pela oportunidade de conclusão da pesquisa. Sou grato pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de integrar uma equipe tão dedicada à inovação e ao progresso.

Pontualmente aos meus amigos, Beatriz Marques, Ricardo Paes, Isabella Rubio, Julia Tobias, Marcos Aurélio, Beatriz Pallone e Leandro Guilherme (in memoriam). Aos meus filhos não convencionais Pitú, Tado Manuel, Purê, Takeu César e Taki Manuela. Gratidão por serem meu refúgio nos momentos difíceis e por tornarem a vida mais leve.

A todos que, de uma maneira ou outra, estiveram presentes e foram importantes durante a execução da pesquisa.

“Nossos ancestrais sabiam que a cura vem em ciclos e círculos.
Uma geração carrega a dor para que a próxima possa viver e se curar.
Um não pode viver sem o outro, cada um é a esperança, o significado e a força do outro”.

Gemma B. Benton.

RESUMO

Casos de doenças não diagnosticadas provocadas por fitopatógenos em diversos segmentos de culturas agrícolas causam perdas de 15% a 100% devido ao avanço dos sintomas graves (Silva, 2019). A doença da mancha foliar bacteriana é disseminada em diversos estados do Brasil, afetando significativamente os plantios de eucalipto no território brasileiro, sendo causada predominantemente por quatro agentes bacterianos principais: *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia psidii* e *Pseudomonas cichorii*. Os métodos de diagnóstico atualmente disponíveis para a identificação rápida e precisa de fitopatógenos no campo ainda são limitados e os estudos que trazem perdas atualizadas em viveiros são escassos. Essa limitação compromete a eficácia do manejo, especialmente no caso da mancha foliar bacteriana do eucalipto, que está frequentemente associada a uma complexa interação bacteriana. A interação entre esses agentes dificulta a determinação do patógeno principal e, conseqüentemente, impacta negativamente as estratégias de controle e erradicação da doença. Este estudo tem como objetivo caracterizar, de forma aprofundada, as espécies do gênero *Xanthomonas* spp. que acometem culturas de eucalipto no interior de São Paulo. Para a consecução deste objetivo, foi construída uma biblioteca de isolados obtidos de diferentes produtores locais, permitindo capturar a diversidade dos patógenos em ambiente real de cultivo. A aplicação de métodos de biologia molecular e analítica, neste contexto, traz vantagens significativas em relação às abordagens convencionais. Técnicas moleculares, como a PCR, análise de sequências gênicas e espectrometria de massa (MALDI-TOF), possibilitam uma identificação mais precisa e rápida das espécies, superando limitações dos métodos fenotípicos, que muitas vezes carecem de sensibilidade e especificidade. Além disso, esses métodos proporcionam uma avaliação detalhada da diversidade genética dos patógenos, contribuindo para elucidar aspectos epidemiológicos fundamentais e auxiliando no desenvolvimento de estratégias de manejo e controle mais direcionadas e eficazes. Com as técnicas moleculares empregadas, o estudo identificou uma nova ocorrência de *Xanthomonas translucens* causando sintomas de mancha foliar bacteriana em eucaliptos. Ampliando assim a gama de agentes causais da doença no hospedeiro, ressaltando a necessidade de redefinir as estratégias no manejo e controle da doença.

Palavras-chave: *Eucalyptus* sp.; *Xanthomonas* spp.; mancha foliar bacteriana; biologia molecular, MALDI-TOF.

ABSTRACT

Undiagnosed diseases caused by phytopathogens in various agricultural crops can lead to losses ranging from 15% to 100%, due to the progression of severe symptoms (Silva, 2019). Bacterial leaf spot disease is widespread across several Brazilian states and significantly affects eucalyptus plantations throughout the country. It is predominantly caused by four main bacterial agents: *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia psidii*, and *Pseudomonas cichorii*. Currently available diagnostic methods for rapid and accurate identification of phytopathogens in the field remain limited, and updated studies on losses in nurseries are scarce. This limitation undermines the effectiveness of disease management, particularly in the case of eucalyptus bacterial leaf spot, which is often associated with a complex bacterial interaction. The interplay between these agents complicates the identification of the primary pathogen, thereby negatively impacting control and eradication strategies. This study aims to thoroughly characterize *Xanthomonas* spp. species affecting eucalyptus crops in the interior region of São Paulo. To achieve this objective, a library of isolates was assembled from various local producers, capturing the pathogen diversity under real cultivation conditions. In this context, the application of molecular and analytical methods offers significant advantages over conventional approaches. Molecular techniques such as PCR, gene sequencing, and mass spectrometry (MALDI-TOF) allow for faster and more accurate species identification, overcoming the limitations of phenotypic methods, which often lack sensitivity and specificity. Furthermore, these methods provide a detailed assessment of the pathogens' genetic diversity, contributing to a better understanding of key epidemiological aspects and supporting the development of more targeted and effective management and control strategies. Using these molecular techniques, the study identified a novel occurrence of *Xanthomonas translucens* causing bacterial leaf spot symptoms in eucalyptus. This finding expands the range of causal agents associated with the disease in this host and highlights the need to redefine current disease management and control strategies.

Keywords: *Eucalyptus* sp.; *Xanthomonas* spp. bacterial leaf spot; molecular biology, MALDI-TOF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 - Colônias bacterianas puras em meio nutriente ágar de <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Xanthomonas</i> spp. e <i>Erwinia</i> spp., respectivamente	30
Figura 2 - Sintomatologia típica da doença	32

Capítulo 1 – Caracterização e patogenia dos isolados bacterianos responsável pela doença mancha foliar bacteriana

Figura 1 - Local de coleta e demonstração de sintomatologia	39
Figura 2 - Exemplificação do preparo da amostra para a obtenção de colônias puras	45
Figura 3 - Exemplificação da aplicação da Coloração de Gram e certificação da morfologia bastonete e coloração avermelhada de bactéria pertencente ao gênero <i>Xanthomonas</i>	46
Figura 4 – Resultado do teste de Gram de Ryu	47
Figura 5 – Resultado do Teste de Catalase	48
Figura 6 - Retrato do teste de inoculação em folha destaca de <i>Eucalyptus urophylla</i> AEC144	50
Figura 7 - Exemplificação de metodologia de inoculação de bactéria em eucalipto..	51
Figura 8 - Colônia bacteriana pura do gênero <i>Xanthomonas</i>	52
Figura 9 - Sintomatologia característica de mancha foliar bacteriana quando realizado o Postulado de Koch	53
Figura 10 - Exemplo de colônias bacterianas re-isoladas, distintas em planta e terço	54

Capítulo 2 - Análise e sequenciamento molecular de cepas bacterianas associadas à mancha foliar bacteriana

Figura 1 - Exemplificação do processo de extração de DNA bacteriano.....	64
Figura 2 - Exemplificação das beads magnéticas aderidas ao DNA	68

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Caracterização e patogenia dos isolados bacterianos responsável pela doença mancha foliar bacteriana

Tabela 1 - Identificação dos isolados presentes na coleção bacteriológica utilizados neste estudo, armazenados no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), Botucatu – SP (continua).....	40
Tabela 1 - Identificação dos isolados presentes na coleção bacteriológica utilizados neste estudo, armazenados no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), Botucatu – SP (continua).....	41
Tabela 1 - Identificação dos isolados presentes na coleção bacteriológica utilizados neste estudo, armazenados no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), Botucatu – SP (continua).....	42
Tabela 1 - Identificação dos isolados presentes na coleção bacteriológica utilizados neste estudo, armazenados no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), Botucatu – SP (conclusão)	43

Capítulo 2 - Análise e sequenciamento molecular de cepas bacterianas associadas à mancha foliar bacteriana

Tabela 1 - Lista de primers e suas respectivas bibliografias	67
Tabela 2 - Lista de microrganismos identificados após pareamento das sequencias no GenBank	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRAF	Associação Brasileira dos Produtores de Florestas Plantadas
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPV	Departamento de Proteção Vegetal
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FCA/UNESP	Faculdade de Ciências Agrônomicas/Universidade Estadual Paulista
IBA	Instituto Brasileiro de Árvores
ITS	Espaçador Transcrito Interno
KOH	Hidróxido de Potássio
NA	Nutriente Ágar
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PD	<i>Buffer</i> de Lise e Precipitação de DNA
PIB	Produto Interno Bruto
rDNA	DNA Ribossômico
rpm	Rotações por minuto
rpg	Região de Regulação de Fatores de Patogenicidade
RNA	Ácido Ribonucleico
Spp.	Espécies (abreviação usada para referir-se a múltiplas espécies dentro de um gênero)
T3E	Efetores do Tipo III
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
→	Indica uma transformação, reação ou fluxo em processos químicos ou biológicos
°C	Grau Celsius (Unidade de temperatura)
A	Absorbância (Usado em espectrofotometria)
c	Concentração (Usado em fórmulas)
cm	Centímetro
E	Coeficiente de extinção ou absorvidade intrínseca de ácidos nucleicos
E	Coeficiente de extinção molar (Usado em espectrofotometria)
G	Força g
g/L	Gramas por litro
L	Caminho óptico
mg	Miligrama (Unidade de massa)
mL	Mililitro (Unidade de volume)
ng/μL	Nanogramas por microlitro
nm	Nanomol
pb	Pares de base (Usado em biologia molecular para medir o tamanho de fragmentos de DNA/RNA)
pH	Potencial hidrogeniônico
pm/L	Picomol por litro
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R ²	Coeficiente de retração
rpm	Rotações por minuto (Unidade de medida de velocidade de rotação)
x	Multiplicação ou fator (Usado em contextos como "3 x 10 ⁸ UFC")
μg/mL	Microgramas por mililitro
μL	Microlitro (Unidade de volume)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	25
OBJETIVOS	27
OBJETIVO GERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
REVISÃO DE LITERATURA	28
GÊNERO <i>Eucalyptus</i> spp. E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	28
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NA CULTURA DO EUCALIPTO	29
MANCHA FOLIAR BACTERIANA EM <i>Eucalyptus</i> spp.....	30
CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA	31
MANEJO DA MANCHA FOLIAR BACTERIANA EM VIVEIROS NO BRASIL	33
CAPÍTULO 1 - CARACTERIZAÇÃO E PATOGENIA DOS ISOLADOS BACTERIANOS RESPONSÁVEL PELA DOENÇA MANCHA FOLIAR BACTERIANA.....	36
1.1 INTRODUÇÃO	38
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
1.2.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	39
1.2.1.1 MAPEAMENTO E COLETA DE MUDAS INFECTADAS	44
1.2.1.2 CONSTRUÇÃO E PRESERVAÇÃO DA BIBLIOTECA DOS ISOLADOS ..	45
1.2.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS BACTERIANAS	46
1.2.2.1 TESTE DE COLORAÇÃO DE GRAM	46
1.2.2.2 TESTE DE HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH) OU GRAM DE RYU	47
1.2.2.3 TESTE DE PRODUÇÃO DA ENZIMA CATALASE	48
1.2.3 CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA DAS LINHAGENS BACTERIANAS ..	48
1.2.3.1 TESTE DE INOCULAÇÃO EM FOLHA DESTACADA DE <i>Eucalyptus urophylla</i>	49
1.2.3.2 TESTE DE INOCULAÇÃO EM FOLHA DE MUDAS DE <i>Eucalyptus urophylla</i>	50
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
1.3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	51
1.3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS BACTERIANAS	51
1.3.3 CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA DAS LINHAGENS BACTERIANAS ..	53

	REFERÊNCIAS	55
	CAPÍTULO 2 - ANÁLISE E SEQUENCIAMENTO MOLECULAR DE CEPAS BACTERIANAS ASSOCIADAS À MANCHA FOLIAR BACTERIANA.....	57
2.1	INTRODUÇÃO	59
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.2.1	EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO	62
2.2.2	AMPLIFICAÇÃO DO DNA BACTERIANO	64
2.2.3	PURIFICAÇÃO DO DNA POR <i>BEADS</i> MAGNÉTICAS E SEQUENCIAMENTO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	68
2.2.4	ESPECTROMETRIA DE MASSA DE TEMPO DE VOO DE DESSORÇÃO/IONIZAÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ (MALDI-TOF MS)	69
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
	REFERÊNCIAS	73
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
	REFERÊNCIAS	79

INTRODUÇÃO GERAL

A mancha foliar bacteriana foi reportada em vários estados brasileiros que investem na cultura de eucalipto, englobando São Paulo, Pará, Amapá, Bahia, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e Minas Gerais (Alfenas *et al.*, 2009; Auer, Santos e Neto, 2011; Gonçalves *et al.*, 2008).

Segundo o Instituto Humanitas Unisinos (2023), o Brasil retém cerca de 30% de todas as árvores de eucalipto mundiais. A comercialização da cultura cresce de forma significativa e há previsões de que, até 2028, o mercado global irá ultrapassar os 213 milhões de dólares faturados. Segundo a Confederação de Agricultura e Pecuária do Brasil (2024), em um último levantamento realizado pela Canopy Remote Sensing Solution, o Brasil atingiu uma impressionante marca de 10,3 milhões de hectares destinados ao plantio de florestas comerciais, sendo que 76,1% são ocupados pela eucaliptocultura.

Em inúmeras regiões do país, essa doença apresentou sintomas frequentes e severidade crescente (Alfenas *et al.*, 2004; Gonçalves, 2003). Entre 2003 e 2008, houve uma perda de 7,5 milhões de dólares devido aos efeitos da doença (Alfenas *et al.*, 2009; Gonçalves *et al.*, 2008). Em 2005, foram estimadas perdas consideráveis de mudas e propágulos em fase de multiplicação de estacas, totalizando um prejuízo de 50 milhões para os estados da Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais e Pará (Furtado, 2023).

A doença mancha foliar bacteriana em eucalipto resulta da associação de quatro fitopatógenos: *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia psidii* e *Pseudomonas cichorii* (Amorim *et al.*, 2011). Na década de 1970, foram registrados os primeiros casos de manchas foliares bacterianas causadas por *Xanthomonas campestris* em espécies da família *Myrtaceae*, na cidade de Sidney, Austrália (Truman, 1974; Gonçalves *et al.*, 2008). Na década de 1990, *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonas cichorii* foram identificadas em mudas de eucaliptos no estado de São Paulo (Pomella *et al.*, 1995).

Quanto à interação entre a planta e o patógeno, Santos (2019) destaca que a primeira linha de defesa das plantas contra patógenos envolve mecanismos físicos que limitam a aderência, penetração e disseminação do fitopatógeno. O processo de defesa consiste em uma complexa rede de sinalização e ampliação desses sinais, consistindo também em mecanismos bioquímicos (Suzuki *et al.*, 2003).

As fitobactérias envolvidas são caracterizadas como parasitas facultativos e saprófitos, o que implica na capacidade de desenvolvimento em restos de culturas e materiais orgânicos presentes no solo e em viveiros. Esses patógenos utilizam a água da chuva ou irrigação que permanece no limbo foliar para infectar o órgão. Eles conseguem adentrar por aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, ou por ferimentos presentes no limbo foliar, utilizando batimentos flagelares. Uma vez no interior da folha, os fitopatógenos utilizam enzimas e substâncias tóxicas para desintegrar as células vegetais e lamelas médias, resultando no extravasamento do conteúdo celular (Amorim *et al.*, 2011; Amorim *et al.*, 2016; Blakeman, 1993).

A evolução da doença está diretamente relacionada ao ambiente em que a planta se encontra. Ambientes úmidos, com altas temperaturas, alto acúmulo de matéria orgânica, produtores que utilizam materiais de poda não higienizados e presença de plantas infectadas no viveiro tendem a apresentar uma alta taxa de infecção (Beattie *et al.*, 1999; Amorim *et al.*, 2011; Máfia *et al.*, 2017).

Atualmente, diversas práticas de manejo são empregadas para prevenir a disseminação da mancha foliar bacteriana em viveiros de eucalipto. Entre essas medidas, destacam-se a higienização de ferramentas de poda para reduzir o risco de transmissão de patógenos entre as plantas; espaçamento adequado entre as mudas evitando o contato direto entre as copas; controle da umidade foliar evitando a formação de lâmina de água no limbo foliar; limpeza regular do viveiro consistindo na remoção de matéria orgânica acumulada sendo um dos principais focos de infecção. A suscetibilidade à doença pode variar conforme a espécie de eucalipto e o estágio de desenvolvimento das mudas, sendo fundamental considerar esses fatores ao implementar estratégias de manejo (Máfia *et al.*, 2017).

Dentre os agentes bacterianos, a *Xanthomonas campestris* é constantemente associada à mancha foliar bacteriana. Atualmente, os avanços nas tecnologias moleculares permitem identificar os patógenos a nível de espécie. O presente estudo propõe relatar a caracterização das espécies de *Xanthomonas* spp. que infectam as mudas de *Eucalyptus* spp. potencialmente comercializadas, como por exemplo *Eucalyptus urophylla* AEC144.

A infecção por *X. campestris* pode causar danos significativos em áreas foliares previamente saudáveis, resultando na diminuição da taxa fotossintética da planta, o que acarreta perda de rendimento e qualidade da madeira.

Portanto, a caracterização molecular das espécies de *Xanthomonas* presentes na eucaliptocultura é crucial para a definição de métodos de remediação e manejo eficazes.

Acerca de técnicas moleculares como a extração do material genético bacteriano e o emprego da *polymerase chain reaction* (PCR) com amplificação de regiões gênicas específicas e de interesse, também é utilizado o sequenciamento de regiões gênicas conservadas entre as espécies para identificação das mesmas.

Atualmente, em ambientes laboratoriais, técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o sequenciamento genético são amplamente empregadas para a identificação bacteriana, oferecendo resultados rápidos e altamente precisos. Essas metodologias superam as limitações dos métodos tradicionais, que frequentemente são mais demorados e menos específicos. No entanto, a aplicação dessas técnicas em campo é restrita devido a limitações operacionais e de infraestrutura. Consequentemente, muitos laboratórios ainda dependem de métodos de identificação morfológica e bioquímica, que, embora úteis, podem prolongar o processo de diagnóstico e frequentemente limitam a identificação ao nível de gênero. Essa limitação pode impactar negativamente as estratégias de manejo de doenças, uma vez que a implementação de medidas de controle eficazes requer uma identificação precisa do agente patogênico em nível de espécie.

Este estudo tem por objetivo caracterizar, de maneira integrada e molecular, as espécies do gênero *Xanthomonas* associadas a infecções em eucaliptos, contribuindo para a compreensão da diversidade genética desses patógenos e de seus impactos na cadeia produtiva florestal brasileira. Para tanto, empregam-se análises bioquímicas e moleculares, utilização de primers específicos, sequenciamento Sanger e a comparação dos dados obtidos com registros disponíveis no GenBank (NCBI).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar e investigar espécies do gênero *Xanthomonas* spp. responsáveis pela mancha foliar bacteriana em *Eucalyptus* spp., utilizando metodologias clássicas e detecção molecular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Promover a criação de um robusto banco de dados de espécies bacterianas isoladas de *Eucalyptus* spp., a fim de subsidiar estudos futuros, armazenando-o no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), situado em Botucatu – SP;
- b) Realizar a caracterização bioquímica, patogênica e molecular de cepas bacterianas associadas à mancha foliar bacteriana pertencentes ao gênero *Xanthomonas* spp;
- c) Comprovar por vias específicas, por meio de técnicas moleculares atuais, o diagnóstico de *Xanthomonas* spp.

REVISÃO DE LITERATURA

GÊNERO *Eucalyptus* spp. E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O gênero *Eucalyptus* spp., originário predominantemente da Austrália, ocorre naturalmente também em Nova Guiné e Indonésia. No entanto, foi em seu país de origem que este gênero floresceu com maior vigor e diversidade de espécies (Freitas Júnior, 2014).

Dotado de elevada capacidade de adaptação a diversos contextos geográficos, sobretudo em regiões de clima tropical, o gênero *Eucalyptus* spp. tem se destacado como matéria-prima estratégica na indústria de papel e celulose, tendo sido amplamente adotado em vários países, inclusive no Brasil (Bracelpa, 2003; Gonçalves, 2003).

Segundo o Portal Embrapa (2019), o setor florestal brasileiro conta com 700 espécies catalogadas, relevantes para diversos fins como lenha, celulose, medicamentos e essências. De acordo com o Relatório Anual do Instituto Brasileiro de Árvores (IBA, 2023), a área total de árvores plantadas em 2022 alcançou 9,94 milhões de hectares, sendo o eucalipto a espécie dominante, ocupando 76% dos plantios, o que representa 7,6 milhões de hectares.

As principais regiões de cultivo de eucalipto no Brasil concentram-se nos estados de Minas Gerais (29%), Mato Grosso do Sul (15%) e São Paulo (13%) (IBA, 2023). Atualmente, segundo a Associação Brasileira dos Produtores de Florestas Plantadas (Abraf), o setor de florestas corresponde a 4% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil, sendo a cultura de eucalipto responsável por 80% das áreas utilizadas para a silvicultura (Foelkel, 2005).

BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NA CULTURA DO EUCALIPTO

Devido à elevada demanda por mudas de eucalipto para atender ao mercado, frequentemente o manejo inadequado nos viveiros propicia condições favoráveis à proliferação de agentes bacterianos fitopatogênicos. Além disso, a exploração de novos ambientes para expansão da eucaliptocultura pode introduzir novos patógenos desconhecidos, aumentando o risco de infecção nas plantações.

Diversas bactérias fitopatogênicas são identificadas como causadoras de significativa redução na produtividade do setor florestal, comprometendo o fornecimento de mudas e plantas jovens para atender à demanda crescente (Santos *et al.*, 2001). Entre os fitopatógenos relevantes, destaca-se a *Ralstonia solanacearum*, responsável pela doença conhecida como murcha bacteriana. Os sintomas característicos incluem murcha apical das plantas afetadas, além de lesões irregulares de cor marrom-clara nas folhas, associadas a deformações na região radicular que resultam em déficit hídrico. A caracterização da doença pode ser realizada pela observação do escurecimento do sistema vascular após um corte transversal no caule, devido à colonização intensa e obstrução do xilema (Alfenas, 2006; Máfia, 2006; Amorim *et al.*, 2011; Zambolim *et al.*, 2012).

Outro patógeno bacteriano relevante nas culturas de eucalipto é *Erwinia psidii*, causador da seca de ponteiros. Esta doença provoca sintomas como o ressecamento de mudas ou plantas jovens na região adaxial - abaxial, acompanhado de manchas foliares ao longo da nervura central (Amorim *et al.*, 2011; Motta *et al.*, 2012; Zauza, 2017).

Apesar de todo avanço nos estudos da mancha foliar bacteriana e o impacto negativo causado pelo avanço da doença nas culturas de eucalipto, ainda faltam estudos recentes que tragam as perdas atualizadas em viveiro, além de levantamento usando a biologia molecular para caracterizar as espécies de *Xanthomonas* spp., que têm maior incidência no mercado hoje em dia.

MANCHA FOLIAR BACTERIANA EM *Eucalyptus* spp.

A doença conhecida como mancha foliar bacteriana é ocasionada pela bactéria pertencente ao gênero *Xanthomonas*, integrante do domínio *Bacteria*, filo *Pseudomonadota*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Xanthomonadales* e família *Xanthomonadaceae* (Schoch *et al.*, 2020). Esta enfermidade nos eucaliptos resulta da interação de quatro patógenos: *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia psidii* e *Pseudomonas cichorii* (Amorim *et al.*, 2016, p. 363).

O gênero *Xanthomonas* possui uma relevância significativa na fitopatologia, sendo identificado morfológicamente como bastonete reto, móvel devido à presença de flagelo polar, além de ser aeróbico estrito e Gram-negativo.

Suas colônias, cultivadas em meio Nutriente Ágar, apresentam uma coloração amarela brilhante devido à produção de Xanthomonadinas (Figura 1), sendo também viscosas devido à secreção de goma xanthana, heteroexopolissacarídeo produzido via fermentação de açúcares, característica essencial para aderência ao tecido foliar (Amorim *et al.*, 2011).

Figura 1 - Colônias bacterianas puras em meio nutriente ágar de *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp. e *Erwinia* spp., respectivamente



Foto: Luís Thadeo Poianas Silva (2024).

Microrganismos preservados na coleção do autor.

A primeira incidência da mancha bacteriana em eucaliptos foi registrada na década de 1970, na cidade de Sidney, Austrália (Gonçalves *et al.*, 2008). No Brasil, os primeiros casos foram documentados em São Paulo na mesma década, identificando tanto *Xanthomonas campestris* quanto *Pseudomonas cichorii* como agentes causadores da doença. Apesar de ambas as bactérias apresentarem morfologias similares, a diferenciação pode ser realizada pela observação da morfologia e inserção do flagelo, onde *P. cichorii* possui um tufo de flagelo polar, diferentemente da *X. campestris*. As visualizações são comumente realizadas via microscopia eletrônica de transmissão, via técnica de sombreado. (Pomella *et al.*, 1995; Reis *et al.*, 1996; Amorim *et al.*, 2011; Blakeman, 1993).

O ciclo da doença começa com a sobrevivência do patógeno em restos de matéria orgânica no viveiro ou em plantas previamente infectadas. Sua disseminação ocorre por meio de gotículas de água provenientes de chuvas e irrigação, ou pela utilização de equipamentos não higienizados.

A penetração bacteriana é passiva, ocorrendo através dos estômatos, hidatódios ou ferimentos foliares, sendo necessária a formação de uma lâmina d'água no limbo foliar para que as bactérias possam se movimentar até as aberturas naturais da folha ou ferimentos e adentrar no tecido foliar (Amorim *et al.*, 2011; Amorim *et al.*, 2016).

Após a penetração nos tecidos, a colonização bacteriana tem início nas células parenquimatosas, expandindo-se para os espaços intercelulares. As enzimas e substâncias tóxicas produzidas pelo patógeno no limbo foliar são responsáveis pela destruição da lamela média e da parede celular, permitindo que o patógeno obtenha recursos para seu crescimento e disseminação (Amorim *et al.*, 2011).

CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA

A sintomatologia da mancha foliar bacteriana se manifesta inicialmente por meio de manchas translúcidas e úmidas nas folhas, que posteriormente evoluem para lesões necróticas e ressecadas. Essas lesões podem ocorrer tanto na região da nervura central quanto de maneira contínua ao longo das bordas foliares (Figura 2). Conforme a doença progride, resulta na queda das folhas e, eventualmente, na morte da planta. O aspecto úmido das manchas é atribuído ao extravasamento de água celular dos espaços intercelulares (Amorim *et al.*, 2016; Arriel *et al.*, 2014).

Figura 2 - Sintomatologia típica da doença

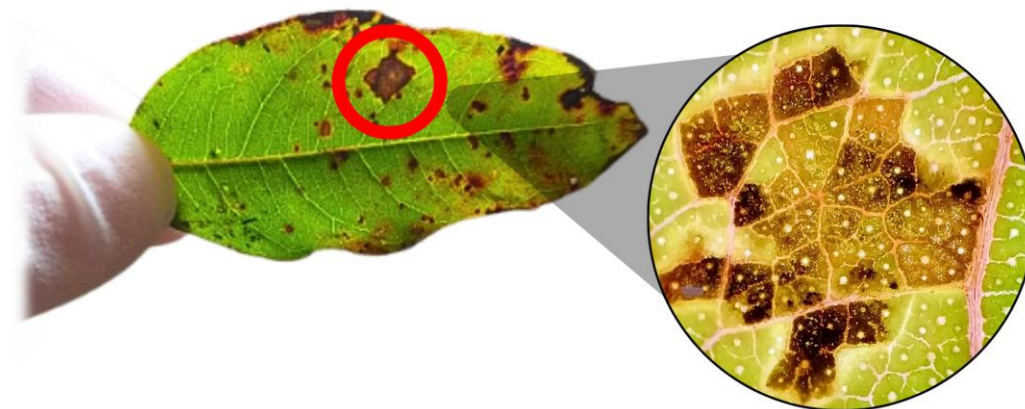


Foto: Luís Thadeo Poianas Silva (2024).

Amostragem foliar de *Eucalyptus urophylla* AEC144, retirada do terço médio da planta. Ao lado, ampliação da lesão, via Microscópio Biológico Olympus CX31 lente óptica 10x, evidenciando necrose foliar localizada em estágio inicial e amarelecimento.

A infecção pela mancha foliar bacteriana compromete diretamente a capacidade fotossintética da planta, colocando em risco sua sobrevivência ao reduzir a área foliar ativa para atividades metabólicas. Isso pode resultar em desfolhar precoce, queda ou má formação de frutos e flores (Gonçalves *et al.*, 2008; Amorim *et al.*, 2011).

As características das manchas podem variar em forma, sendo esféricas, ovaladas, fusiformes ou alongadas, e também em coloração, apresentando tons de marrom, marrom-avermelhado, amarelado, púrpura, cinza ou preto. Em algumas situações, é possível observar um halo amarelo ao redor da mancha (Amorim *et al.*, 2011, p. 640; Palladino *et al.*, 2016).

A gravidade da doença também é influenciada pela temperatura ambiental. Neves (2007) argumenta que a variável térmica desempenha um papel decisivo na agressividade da doença. A faixa ideal de temperatura para o patógeno situa-se entre 26°C e 30°C, sendo que temperaturas mais elevadas tendem a aumentar a severidade dos sintomas.

MANEJO DA MANCHA FOLIAR BACTERIANA EM VIVEIROS NO BRASIL

Embora o manejo da doença exija o desenvolvimento de novas técnicas e metodologias, estratégias práticas – tais como a remoção sistemática das folhas infectadas, a minimização do molhamento do quadrante superior da planta e o espaçamento adequado entre as mudas – têm demonstrado eficácia em reduzir a disseminação do patógeno (Amorim *et al.*, 2016). Outros autores destacam o espaçamento das mudas em sua fase de crescimento e rustificação como a forma de manejo crucial, em que as mudas se encontram mais vulneráveis. Esse método visa o maior arejamento entre as mudas e também facilita a entrada de luz nas mesmas devido ao menor contato entre as copas. Também é de extrema importância priorizar a higiene dos viveiros e restringir o acesso livre de pessoas entre as culturas, pois são possíveis vetores de doenças bacterianas e fúngicas (Alfenas *et al.*, 2009).

Segundo Alfenas *et al.* (2009), quando observados estudos sobre o estado nutricional da planta, ele está diretamente ligado à infecção de patógenos oportunistas. É sabido que o excesso de molhamento das partes aéreas das plantas pode causar o acometimento da mancha foliar bacteriana, devido à formação de um ambiente com alta umidade, que, como já explicitado, é favorável para tal doença.

Tendo em vista esses pontos, uma forma de controle para impedir a infecção pela doença é a priorização do uso de um sistema de irrigação que viabilize um melhor controle nutricional da planta e um controle da umidade da planta, como inundação temporária, por subirrigação, capilaridade em tanque de hidroponia ou por gotejamento (Taiz e Zeiger, 2004; Alfenas *et al.*, 2009; Zambolim e Ventura, 1993; Silveira e Higashi, 2003; Krauthausen *et al.*, 2011).

Xanthomonas campestris é o agente etiológico responsável pela formação de lesões angulares amareladas nas folhas, cuja disseminação ocorre predominantemente por respingos de água e ação do vento, sendo agravada por condições de clima quente e úmido. Em função disso, recomenda-se o manejo por meio do uso de mudas certificadas, a limitação da irrigação por aspersão e a aplicação de bactericidas à base de cobre.

Em contrapartida, *Xanthomonas axonopodis* induz sintomas semelhantes aos observados em *X. campestris*, porém apresenta maior agressividade, variando conforme o clone hospedeiro, sendo os efeitos igualmente exacerbados por condições ambientais quentes e úmidas.

Para essa patologia, estratégias de manejo como a rotação de clones resistentes, a realização de podas sanitárias e o controle rigoroso da umidade em viveiros são recomendadas.

Erwinia psidii gera lesões aquosas que podem evoluir para necroses e tem sua disseminação facilitada pela água, insetos vetores e ferramentas não higienizadas, encontrando condições favoráveis para sua multiplicação em ambientes com alta umidade e temperatura moderada. Assim, enfatiza-se a necessidade da higienização adequada de materiais de poda, do controle dos insetos vetores e da aplicação de agentes biológicos.

Por sua vez, *Pseudomonas cichorri* causa lesões necróticas em folhas e brotações, dispersando-se principalmente por respingos de água, e apresenta boa capacidade de sobrevivência em climas moderados a frios com alta umidade; medidas de manejo recomendadas incluem a adequação nutricional das plantas e a prevenção de danos mecânicos.

Conforme mencionado anteriormente, a higiene do local de produção das mudas é de extrema importância. Com isso, Alfnas *et al.* (2009) e Silveira (1996) destacam a necessidade da desinfecção das bandejas por um processo que envolve a imersão das mesmas em água quente com o objetivo de erradicar os inóculos de patógenos.

Essas bandejas são locais onde acontece o enraizamento das mudas de eucalipto, sendo que a desinfecção está relacionada com o tempo em que o tubo fica submerso na água quente e a temperatura em que se encontra essa água. Silveira (1996) discute em seu trabalho que a temperatura e o tempo de imersão podem variar de 70°C por 3 min ou 80°C por 30 segundos.

Uma outra forma de controle das bacterioses que afetam a eucaliptocultura e demonstram maior eficiência seria a seleção no plantio de clones que são resistentes a *X. axonopodis* (Arriel *et al.*, 2014; Ferraz *et al.*, 2015; Mafia *et al.*, 2014). Porém, existe um ponto negativo, que é a dificuldade de agregar em um único indivíduo as várias características principais que proporcionem, além da resistência bacteriana, uma qualidade boa da madeira como o comércio (Assis; Mafia, 2007).

Mafia *et al.* (2007) fez um estudo que mostra um levantamento de forma geral, em que o clone CL02 é mais suscetível à infecção pela mancha bacteriana e causa uma intensa desfolha.

Nesse clone, houve uma incidência da doença de 45%, já os clones CL01 e CL03 apresentaram uma incidência de 36% e 30%, respectivamente. A pesquisa ainda mostrou que houve uma maior severidade da doença no clone CL02, quando estavam submetidos ao sistema de irrigação por aspersão.

Portanto, vemos mais uma vez que o tipo de irrigação, modo de higienização do viveiro e bandejas de plantio, uso de clones suscetíveis e déficit nutricional da muda estão diretamente ligados à incidência da mancha foliar bacteriana em eucaliptos.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO E PATOGENIA DOS ISOLADOS BACTERIANOS RESPONSÁVEL PELA DOENÇA MANCHA FOLIAR BACTERIANA

RESUMO

O mercado de papel e celulose movimenta cerca de US\$ 500 bilhões mundialmente, sendo o Brasil o principal produtor e exportador de celulose. Uma das principais matérias deste setor é o eucalipto, que, apesar de um alto poder de adaptação, se mostra mais suscetível a doenças dependendo das condições edafoclimáticas e manejo. Entre as quais se destaca a mancha foliar bacteriana, causada pela associação de quatro fitobactérias: *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia psidii* e *Pseudomonas cichorii*, capaz de causar grande impacto na produção de mudas, na qual a alta umidade associada ao intenso uso de operações de corte e poda acaba por tornar a cultura mais vulnerável. O presente trabalho buscou elucidar questões sobre a identificação bioquímica com teste de Gram, teste de Gram de Ryu e teste de catalase, e por fim, foi realizada a inoculação em eucalipto para execução do postulado de Koch e verificação da patogenicidade bacteriana. Das mudas com folhas sintomáticas encontradas, foram isoladas inicialmente ao todo 268 amostras bacterianas, sendo que apenas 78 apresentaram semelhança bioquímica e morfológica com o gênero *Xanthomonas* spp. O estudo buscou evidenciar quantas amostras totais apresentaram características morfológicas e bioquímicas com o gênero *Xanthomonas* spp. e quais isolados efetivamente produzem efeitos patogênicos em *Eucalyptus urophylla* AEC144.

Palavras-chave: isolamento; *Xanthomonas campestris*; postulado de Koch; mancha foliar bacteriana; bactérias fitopatogênicas.

ABSTRACT

The global pulp and paper market generates approximately USD 500 billion annually, with Brazil being the leading producer and exporter of cellulose. One of the primary raw materials in this sector is eucalyptus, which, despite its high adaptability, can become more susceptible to diseases depending on edaphoclimatic conditions and management practices. Among the most significant threats is bacterial leaf spot, caused by the association of four phytopathogenic bacteria: *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia psidii*, and *Pseudomonas cichorii*. This disease can have a severe impact on seedling production, especially under conditions of high humidity and frequent cutting and pruning operations, which increase the plant's vulnerability. This study aimed to elucidate the biochemical identification of bacterial isolates through Gram staining, the Ryu Gram test, and the catalase test. Additionally, bacterial inoculation in eucalyptus was conducted to fulfill Koch's postulates and confirm pathogenicity. From symptomatic seedlings, a total of 268 bacterial isolates were initially obtained, of which only 78 exhibited biochemical and morphological characteristics consistent with the genus *Xanthomonas* spp. The study sought to determine how many of the total isolates matched *Xanthomonas* spp. in terms of morphology and biochemical traits, and which of these effectively caused pathogenic effects in *Eucalyptus urophylla* AEC144.

Keywords: isolation; *Xanthomonas campestris*; Koch's postulate; bacterial leaf spot; phytopathogenic bacteria.

1.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a expansão da cultura de eucalipto no Brasil tem se destacado de forma expressiva, impulsionada pela crescente demanda global por celulose e produtos florestais. Dados da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas apontam que, entre 2005 e 2011, as áreas destinadas ao cultivo de eucaliptos no país aumentaram em 27,9% (Anuário, 2012; Gabriel *et al.*, 2013). Esse crescimento robusto evidencia não apenas a importância estratégica do setor para a economia brasileira, mas também consolida o Brasil como um dos principais players no mercado internacional de celulose.

As doenças bacterianas de plantas constituem um problema fitopatológico e agrônômico significativo em todo o mundo, especialmente em países tropicais que fornecem um habitat ideal para a proliferação do microrganismo. O clima tropical do Brasil é um fator de extrema importância a ser considerado no contexto de infecções, devido à presença constante de chuvas e ventos, que facilitam a disseminação de bacterioses (Walker e Patel, 1964).

A infecção possui início nas folhas, com a colonização efetiva do fitopatógeno, resultando em sinais de anasarca devido ao extravasamento de conteúdo citoplasmático. Este sintoma está associado à produção de enzimas pela célula bacteriana (Romeiro, 2005; Zambolim, 2012). Com a progressão sintomatológica e o aumento da população bacteriana, ocorre a perda de metabólitos intracelulares, levando à morte das células afetadas e ao aparecimento de manchas.

Para a identificação dos patógenos, utilizam-se testes bioquímicos clássicos para a determinação a nível de gênero. Entre esses testes, destacam-se o Teste de Gram, o Teste de Gram de Ryu ou KOH e o Teste de Catalase. Todos os procedimentos foram realizados conforme os protocolos descritos por Maringoni (2010) no livro intitulado “Técnicas de Fitopatologia”.

Dentro das análises de patogenicidade, faz-se necessário a comprovação da patogenicidade do organismo isolado. Com isso, segundo Agrios (2005), essa comprovação é feita via postulado de Koch, onde, após a inoculação do patógeno identificado como fitopatogênico na muda do hospedeiro, o mesmo precisa apresentar lesões na planta, comprovando ao fim uma associação entre a planta e o patógeno (Silva, 2019).

Portanto, o presente capítulo buscou identificar os microrganismos bacterianos presentes em mudas e minicepas coletados de viveiros parceiros do interior de São Paulo, por meio de testes bioquímicos clássicos e replicação do postulado de Koch por meio de mudas e folhas destacadas de *Eucalyptus urophylla* para evidenciar a patogenicidade do organismo no hospedeiro.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Ao longo do ano de 2023, procedeu-se à coleta de amostras provenientes de mudas e minicepas de *Eucalyptus* spp. em viveiros localizados na região Centro-Sul do estado de São Paulo, nos municípios de Botucatu e Bofete. As mudas utilizadas para a coleta apresentavam um comprimento médio de 60 centímetros, cujas folhas exibiam sintomas típicos de mancha foliar bacteriana. Para cada planta infectada, foram coletadas até três folhas sintomáticas, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos e em caixas térmicas, visando assegurar a integridade dos tecidos para transporte (Figura 1).

Figura 1 - Local de coleta e demonstração de sintomatologia



Foto: Luís Thadeo Poianas Silva (2024).

A) Canaletão onde foram coletadas amostras de minicepas de *Eucalyptus urophylla* AEC144 no município de Bofete – SP; B) Relato visual da sintomatologia de mudas em fase de expedição (destaque dos sintomas no círculo vermelho), observa-se a proximidade entre indivíduos propiciando a disseminação do patógeno; C) Demonstração de muda com tamanho médio de 60cm em tubete, principal objeto de estudo da pesquisa, uma vez que é também a principal forma de comercialização.

Tabela 1 - Identificação dos isolados presentes na coleção bacteriológica utilizados neste estudo, armazenados no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA/UNESP), Botucatu – SP (continua)

Tipo	Coleta	Material genético	Localização
Muda	13/02/2023	<i>Eucalyptus grandis</i>	-22.85609396850474, -48.4333350966983
Muda	13/02/2023	<i>Eucalyptus grandis</i>	-22.85609396850474, -48.4333350966983
Muda	13/02/2023	<i>Eucalyptus grandis</i>	-22.85609396850474, -48.4333350966983
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	06/04/2023	<i>Eucalyptus grandis</i>	-22.85609396850474, -48.4333350966983
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	04/05/2023	<i>Eucalyptus grandis</i>	-22.85609396850474, -48.4333350966983
Muda	06/10/2023	<i>Eucalyptus grandis</i>	-22.906711119989886, -47.01548285772115
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397

Tabela 1 - Identificação dos isolados presentes na coleção bacteriológica utilizados neste estudo, armazenados no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA/UNESP), Botucatu – SP (continua)

Tipo	Coleta	Material genético	Localização
Muda	04/05/2023	<i>Eucalyptus grandis</i>	-22.85609396850474, -48.4333350966983
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397

Tabela 1 - Identificação dos isolados presentes na coleção bacteriológica utilizados neste estudo, armazenados no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA/UNESP), Botucatu – SP (continua)

Tipo	Coleta	Material genético	Localização
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397

Tabela 1 - Identificação dos isolados presentes na coleção bacteriológica utilizados neste estudo, armazenados no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA/UNESP), Botucatu – SP (conclusão)

Tipo	Coleta	Material genético	Localização
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Minicepa	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397
Muda	21/06/2023	<i>Eucalyptus urophylla</i>	-23.102572946811254, -48.258237435397

Fonte: Luís Thadeo Poianas Silva (2023).

Subsequentemente, todas as amostras foram destinadas ao Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), situado em Botucatu - SP, onde se iniciaram os procedimentos laboratoriais de isolamento, purificação e identificação dos microrganismos (Tabela 1).

1.2.1.1 MAPEAMENTO E COLETA DE MUDAS INFECTADAS

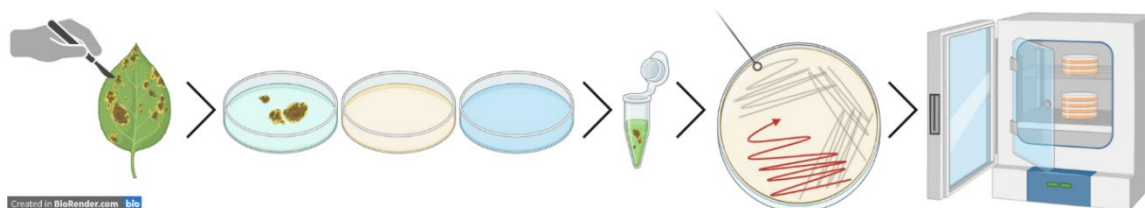
Inicialmente, realizou-se uma triagem sintomatológica do material biológico, observando-se a presença de manchas foliares em mudas de *Eucalyptus* spp. Para o isolamento dos patógenos, foram coletadas amostras através de pequenos cortes de bisturi que continham zonas intermediárias de tecido comprometido e tecido sadio. As áreas foliares selecionadas para o isolamento necessitavam apresentar as manchas angulares características da mancha foliar bacteriana, sinais de anasarca e manchas internervais. As seções foram feitas em regiões com sintomas moderados, visando evitar a seleção de organismos saprófitos e tecido vegetal saudável.

Após a triagem e a excisão das lesões foliares, procedeu-se à desinfecção das partes da planta selecionadas. Esse procedimento envolveu a imersão das amostras foliares sintomáticas em álcool 70% por 1 minuto, seguida pela imersão em hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos. Posteriormente, as amostras foram lavadas com água destilada e autoclavadas por 1 minuto, sendo então colocadas para secar sobre papel de filtro autoclavado. Esse processo de desinfecção assegurou a assepsia da superfície dos fragmentos foliares selecionados, eliminando bactérias saprófitas, visto que a bactéria de interesse reside nos espaços intracelulares do tecido foliar.

Seguindo o protocolo de preparo de isolamento (Figura 2), elaborou-se uma solução de água destilada em um microtubo de 1,5 mL e realizou-se a maceração do material selecionado. Em seguida, a suspensão resultante da maceração foliar foi depositada em placas de Petri por meio de estrias simples. As placas continham meio de cultura Nutriente Ágar (NA), composto por extrato de carne (1,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), peptona (5,0 g/L), cloreto de sódio (5,0 g/L) e ágar (15,0 g/L), com pH final ajustado para 6,8 a 25°C. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufas BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 28°C, com fotoperíodo de 12 horas. O crescimento bacteriano foi observado entre 24 e 72 horas após os procedimentos.

Para obter colônias puras ao final do processo de isolamento, o protocolo de inoculação foi repetido duas a três vezes, a partir das placas originais via estrias de esgotamento (Alfenas e Máfia, 2016).

Figura 2 - Exemplificação do preparo da amostra para a obtenção de colônias puras



Fonte: BioRender (2024).

1.2.1.2 CONSTRUÇÃO E PRESERVAÇÃO DA BIBLIOTECA DOS ISOLADOS

A partir do crescimento dos isolados bacterianos em placas de Petri contendo meio de cultura NA, procedeu-se à conservação e ao armazenamento dos isolados. Para o preparo, utilizaram-se criotubos de 1,5 mL contendo 500 μ L de água destilada autoclavada e 500 μ L de glicerol 30% autoclavado, a solução bacteriana foi congelada a -4°C . As amostras foram submetidas a rigorosos processos de reativação a cada três meses, com o objetivo de preservar suas propriedades fitopatogênicas e confirmar a ausência de contaminação do material biológico.

Todas as amostras isoladas de material vegetal proveniente de eucaliptos sintomáticos foram congeladas com crioprotetor (glicerol 30%) e registradas em um banco de dados para futuras manipulações decorrentes desta pesquisa, sendo disponibilizadas para uso do Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA/UNESP), situado em Botucatu - SP. Adicionalmente, estão armazenadas em três réplicas em congeladores distintos no Departamento de Proteção Vegetal (DPV), na Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, em Botucatu.

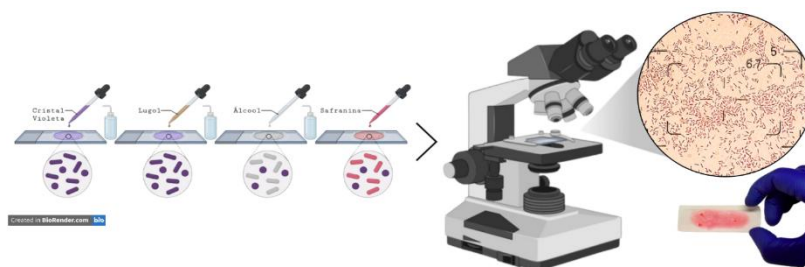
1.2.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS BACTERIANAS

1.2.2.1 TESTE DE COLORAÇÃO DE GRAM

Utilizou-se este teste com o objetivo de distinguir as amostras em dois grandes grupos: bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Suspensões bacterianas foram fixadas em lâminas de vidro utilizando solução de cloreto de sódio a 0,9%. As lâminas foram então submetidas às seguintes etapas: exposição ao cristal violeta por um minuto, lavagem delicada com água destilada, adição de lugol por um minuto, nova lavagem com água destilada, descoloração com álcool 70%, seguida de nova lavagem com água destilada e coloração final com safranina por trinta segundos (Maringoni, 2010). O teste de Gram é essencial dentro da fitopatologia por distinguir os grupos bacterianos em Gram-negativas e Gram-positivas. Normalmente, na rotina laboratorial, é possível observar que a maioria das bactérias fitopatogênicas são Gram-negativas. A coloração de Gram diferencia a espessura da camada de peptidoglicano em células bacterianas. As bactérias com a camada de peptidoglicano espessa são classificadas como Gram-positivas e adquirem a cor roxa quando submetidas aos corantes, e as bactérias com a camada mais fina apresentam coloração vermelha e são classificadas como Gram-negativas (Freitas e Picoli, 2007).

Após a conclusão deste procedimento, as amostras que mantiveram a coloração avermelhada quando visualizadas em microscópio óptico Biológico Olympus CX31, lente óptica 100x (Figura 3), foram selecionadas como material de estudo para esta pesquisa.

Figura 3 - Exemplificação da aplicação da Coloração de Gram e certificação da morfologia bastonete e coloração avermelhada de bactéria pertencente ao gênero *Xanthomonas*



Fonte: BioRender (2024).

Foi utilizado o Microscópio Biológico Olympus CX31, lente óptica 100x.

1.2.2.2 TESTE DE HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH) OU GRAM DE RYU

É necessário submeter certas bactérias ao Teste de Gram de Ryu, uma vez que, no Teste de Gram previamente mencionado, elas podem apresentar coloração ambígua ou inespecífica. Para isso, utilizando uma alça bacteriológica devidamente esterilizada, coleta-se uma pequena porção da colônia bacteriana pura. Posteriormente, adicionam-se uma ou duas gotas de solução de hidróxido de potássio a 3% sobre uma lâmina de vidro (Maringoni, 2010). O teste de KOH ou Gram de Ryu determina se a bactéria detém uma camada de peptidoglicano final, assim o hidróxido de potássio realiza a lise celular e consequentemente a formação do fio viscoso apresentado. O teste é resultado do extravasamento do conteúdo citoplasmático (Riscarolli *et al.*, 2022).

Ao manipular a alça bacteriológica na solução, observa-se a formação de um fio viscoso (Figura 4), onde, se a bactéria for Gram-positiva, ocorrerá tal formação; caso contrário, indica que se trata de uma bactéria Gram-negativa.

Figura 4 – Resultado do teste de Gram de Ryu

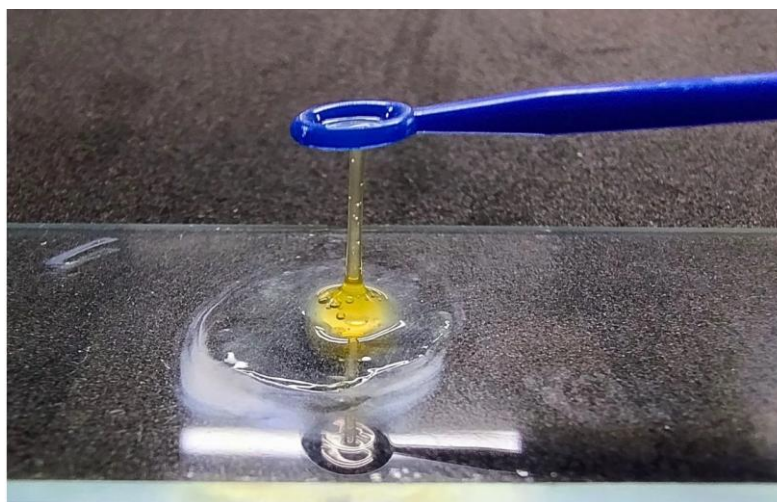


Foto: Luís Thadeo Poianas Silva (2024).

Formação de fio viscoso devido à quebra da parede celular e extravasamento de material citoplasmático, evidenciando o resultado positivo para o teste de Gram de Ryu.

1.2.2.3 TESTE DE PRODUÇÃO DA ENZIMA CATALASE

O teste de catalase é realizado para auxiliar na detecção bioquímica de bactérias, baseando-se na produção ou ausência da enzima catalase. Nesse procedimento, adicionam-se três gotas de peróxido de hidrogênio a 3% sobre uma amostra de cultura bacteriana depositada em uma lâmina de vidro (Maringoni, 2010). Em seguida, observa-se a formação de efervescência (Figura 7), que confirma a leitura de catalase positiva; ou a ausência de efervescência, indicando que a amostra é catalase negativa. As bactérias classificadas do gênero *Xanthomonas* spp. têm a presença da enzima catalase, portanto, quando em contato com o peróxido de hidrogênio, a enzima converte em oxigênio + água (adicionar fórmula), onde observamos a presença de efervescência de O_2 (Riscarolli *et al.*, 2022).

Figura 5 – Resultado do Teste de Catalase



Foto: Luís Thadeo Poianas Silva (2024).

Efervescência da colônia bacteriana na presença do peróxido de hidrogênio 3%, resultado positivo.

1.2.3 CARACTERIZAÇÃO PATOGENICA DAS LINHAGENS BACTERIANAS

O postulado de Koch é um método muito utilizado em laboratórios de fitopatologia florestal para a caracterização e reprodução dos sintomas de doenças causadas por microrganismos.

O postulado foi publicado por Robert Koch em 1890, com o objetivo de estabelecer o agente causal de uma doença em quatro etapas, englobando a associação do patógeno-hospedeiro, isolamento, inoculação do fitopatógeno em plantas saudáveis e reisolamento (Castillo, 2007). O presente estudo executou o postulado em duas metodologias, onde a inoculação ocorreu em folhas de *Eucalyptus urophylla* destacadas e em folhas de mudas.

1.2.3.1 TESTE DE INOCULAÇÃO EM FOLHA DESTACADA DE *Eucalyptus urophylla*

Para a realização do postulado de Koch com folhas destacadas, foram selecionadas folhas saudáveis de *Eucalyptus urophylla* AEC144, os órgãos de interesse foram destacados com o auxílio de uma tesoura de poda devidamente desinfetada. Todas as folhas passaram pelo processo de assepsia de superfície com álcool 70%, hipoclorito de sódio a 1%, lavagem com água destilada autoclavada e secas em papel de filtro autoclavado.

Para a realização da suspensão bacteriana, os isolados cresceram em meio NA e foram armazenados em BOD a 28°C por 48 horas. Após o crescimento, foi realizada uma suspensão bacteriana de 3×10^8 UFC de acordo com a escala nefelométrica de McFarland e inoculou-se no limbo foliar cerca de 2 mL com ajuda de uma seringa com agulha slip 13x4,5 previamente esterilizados e algumas repetições foram feitas a inoculação por osmose forçada. Esse tipo de inoculação possui como objetivo central a inserção do patógeno diretamente no parênquima foliar, permitindo sua rápida infecção e alastramento.

As folhas destacadas foram armazenadas em placas de Petri de vidro com algodão molhado com água destilada autoclavada e o período de incubação foi de 7 dias para surgimento dos sintomas (Figura 6).

Figura 6 - Retrato do teste de inoculação em folha destaca de *Eucalyptus urophylla* AEC144

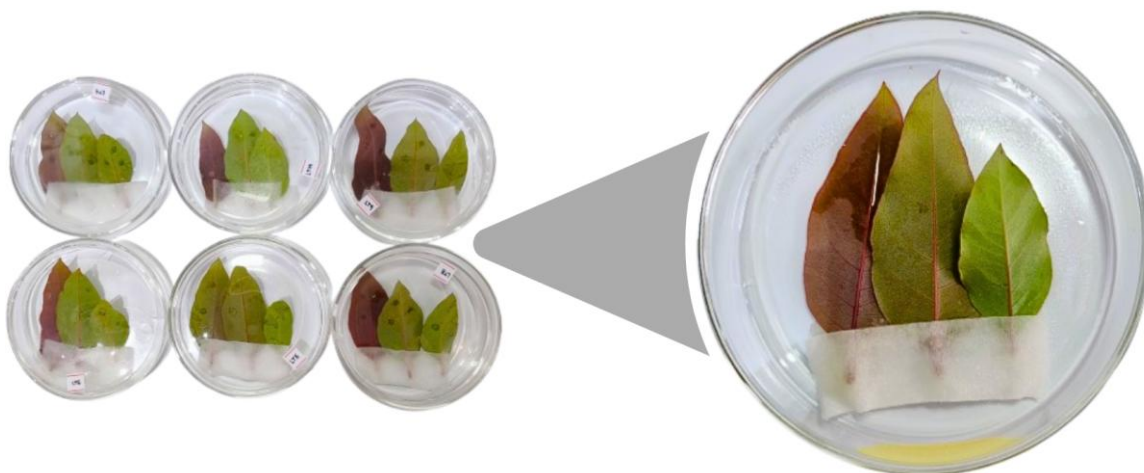


Foto: Luís Thadeo Poianas Silva (2024).

Placa de petri de vidro esterilizadas e devidamente seladas, com preservação da umidade e iluminação artificial por 12 horas.

1.2.3.2 TESTE DE INOCULAÇÃO EM FOLHA DE MUDAS DE *Eucalyptus urophylla*

Para a realização do postulado de Koch em folhas de mudas, foram selecionadas mudas saudáveis em tubetes de *Eucalyptus urophylla* AEC144 e devidamente identificadas. Foram dispostas em bandejas de forma que todas as copas estivessem espaçadas, a fim de evitar contaminação cruzada. Para a realização da suspensão bacteriana, os isolados foram crescidos em meio NA e armazenados em BOD a 28°C por 48 horas. Após o crescimento, foi realizada uma suspensão bacteriana de 3×10^8 UFC de acordo com a escala nefelométrica de McFarland e a inoculação deu-se por 2 mL via seringa com agulha slip 13x4,5 previamente esterilizados e por pressão (Figura 7: B). Além disso, foram utilizadas 3 mudas como testemunhas.

As mudas foram armazenadas em estufa com irrigação por aspersão, possibilitando o molhamento das folhas, e aguardado um período de até 14 dias para surgimento dos sintomas.

Figura 7 - Exemplificação de metodologia de inoculação de bactéria em eucalipto

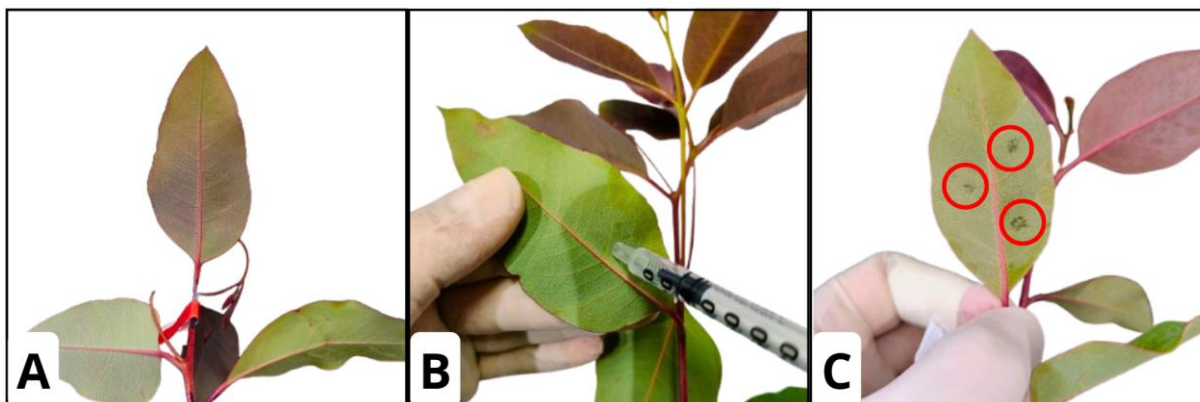


Foto: Luís Thadeo Poianas Silva (2024).

A) Planta modelo sadia; B) Inoculação de suspensão via osmose forçada; C) Demonstração de pós inoculação de suspensão em folha jovem pelo método observado na imagem.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Como resultado desta etapa da coleta de amostras para isolamento, foram obtidas cerca de 268 amostras de diversas culturas bacterianas, sendo que 68,66% foram identificadas como colônias distintas e brancas, e 31,34% (78 amostras) foram compatíveis morfologicamente com o gênero *Xanthomonas* spp., apresentando, portanto, coloração amarela quando estriadas em meio NA. Dentre as 31,34% positivas, 92,90% se apresentaram viáveis após o congelamento e repiques. Esse valor de viabilidade significativo demonstra que a maioria dos isolados manteve suas propriedades bacterianas após o processo de conservação, o que é importante para a continuidade das análises posteriores. Todas as amostras foram replicadas de acordo com a metodologia escolhida para o presente estudo.

1.3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS CEPAS BACTERIANAS

No total, 78 amostras provenientes das coletas de campo demonstraram compatibilidade com os aspectos morfofisiológicos do gênero *Xanthomonas* spp.

Apresentaram morfologia bastonete quando observadas em microscópio biológico Olympus CX31, lente óptica 100x, e a não formação de esporos. Foram estriadas em meio de cultura NA, incubadas em BOD a 28°C por 48 horas e apresentaram coloração amarela vibrante ou levemente amarelo claro quando jovens (Figura 8). Essa coloração é possível graças à produção de xanthomonadina pelo microrganismo, característico do gênero (Lima *et al.*, 2009).

Figura 8 - Colônia bacteriana pura do gênero *Xanthomonas*



Foto: Luís Thadeo Poianas Silva (2024).

Após a confirmação da coloração da cultura bacteriana, foram iniciados testes bioquímicos com o teste de Gram. As 78 amostras foram submetidas a coloração diferencial e observadas em microscópio óptico (Figura 3) e apresentam coloração vermelha e são classificadas como Gram-negativas.

Em relação ao teste de Ryu executado, todas as 78 amostras se apresentaram como KOH positivo, portanto formaram o fio viscoso (Figura 4).

O da enzima catalase realizado, foi observada a presença de efervescência de O₂ no esfregaço bacteriano, sendo catalase positivo (Figura 5).

Assim, é possível concluir nessa primeira etapa do estudo que, das 268 amostras, aproximadamente 31% dos isolados, após os testes bioquímicos, se apresentam como sendo do gênero *Xanthomonas* spp. E, realizando uma associação com os sintomas encontrados em folhas de eucalipto, os organismos podem ser classificados como fitopatogênicos, pertencentes ao grupo de Gammaproteobactérias e se apresentando como um importante grupo de doenças causais em eucaliptos.

Atualmente, os testes bioquímicos não são amplamente usados pela divergência de resultados e, com o avanço das técnicas moleculares, a segurança de resultados positivos e negativos se faz muito mais presente.

Segundo Gonçalves *et al.* (2003), 50% das mudas de eucalipto possuem sintomas de mancha foliar bacteriana, com isso se faz significativo entender mais sobre a especificidade da espécie, quais são seus patógenos, substâncias que produzem e espécies encontradas em eucaliptos. Tanto a *X. campestris* quanto a *X. axonopodis* causam efeitos em eucaliptos, mas o que difere entre elas são as sequências gênicas que estão associadas à patogenicidade.

1.3.3 CARACTERIZAÇÃO PATOGÊNICA DAS LINHAGENS BACTERIANAS

Para reproduzir as lesões e caracterizar a patogenicidade do gênero bacteriano, foram inoculadas amostras previamente confirmadas por testes bioquímicos em folhas destacadas de eucalipto e em mudas inteiras. Ambas as metodologias resultaram no desenvolvimento de lesões características e similares nas folhas (Figura 9), indicando que não houve diferença significativa na produção de sintomas entre os dois métodos. No entanto, o método de folha destacada demonstrou ser mais prático e eficiente, facilitando a condução dos experimentos e a observação dos sintomas. Esse tipo de metodologia não é comumente aplicado, porém, optou-se pelo uso devido à sua simplicidade e à capacidade de fornecer resultados consistentes na avaliação da patogenicidade de microrganismos em diferentes hospedeiros.

Figura 9 - Sintomatologia característica de mancha foliar bacteriana quando realizado o Postulado de Koch

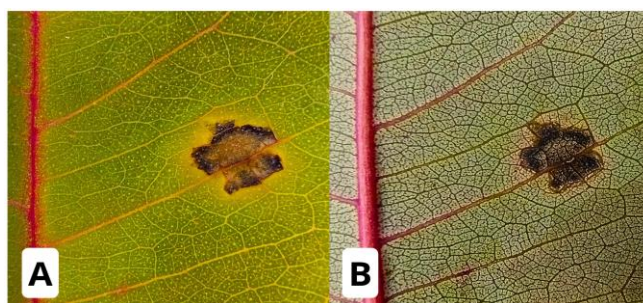


Foto: Luís Thadeo Poianas Silva (2024).

A) Lesão em face adaxial foliar; B) Lesão em face abaxial foliar.

Os isolados inoculados nas folhas de eucalipto foram avaliados diariamente de acordo com a metodologia estipulada para cada ensaio. Após o re-isolamento dos órgãos que apresentaram sintomas, foi observada similaridade quanto aos testes bioquímicos e o postulado de Koch (Figura 10). Nas colônias bacterianas inoculadas que não apresentaram sintomas, foi realizado outro reisolamento. Houve crescimento em placas de Petri contendo NA e apresentaram morfologias destoantes, conclui-se que a amostra é não patogênica endofítica, ou seja, vive no interior do órgão da planta sem causar danos (Melo, 2021).

Quanto às mudas testemunhas, passaram por plaqueamento e em nenhuma foi possível evidenciar o crescimento de organismo. Portanto, os efeitos de manchas foliares observados são decorrentes da ação de patógenos previamente inoculados, conforme estabelecido pelo cumprimento do postulado de Koch e pela confirmação da patogenicidade bacteriana.

Figura 10 - Exemplo de colônias bacterianas re-isoladas, distintas em planta e terço

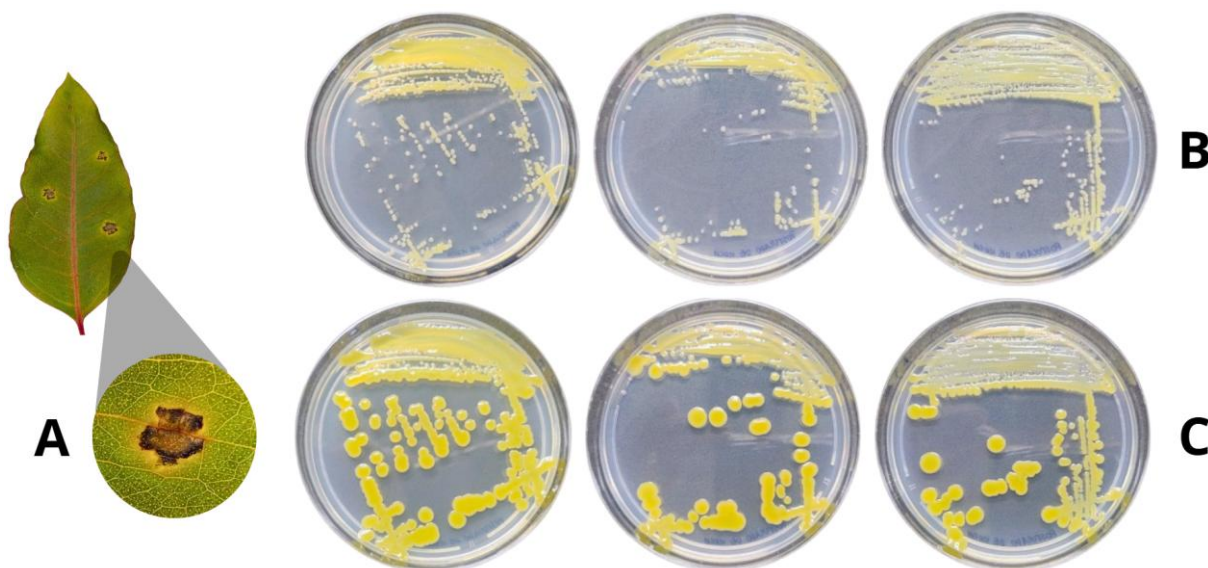


Foto: Luís Thadeo Poianas Silva (2024).

A) Sintomatologia característica da mancha foliar; B) Colônias em NA com 24 horas de crescimento em BOD a 28°C; C) Colônias em NA com 48 horas de crescimento em BOD a 28°C.

REFERÊNCIAS

- ABRAF. **ANUÁRIO Estatístico da ABRAF 2012: ano base 2011**. Brasília, DF: ABRAF, 2012. 150 p.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 952 p., 2005.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa-MG: Ed. UFV, 2016.
- BONATELLI, M. L. Técnica melhora procedimento de detecção de doença em eucalipto. **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**, 2018.
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Demanda aquecida e boa produtividade do eucalipto incorrem em resultados positivos para atividade**. CNA SENAR, 2024. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/publicacoes/demanda-aquecida-e-boua-produtividade-do-eucalipto-incorrem-em-resultados-positivos-para-atividade>.
- DOS SANTOS, C. **Identificação de proteínas e validação de genes envolvidos na resistência de Brassica oleracea a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. Tese de Doutorado—Juiz de Fora - MG: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/10231/3/cristianedossantos.pdf>. Acesso em: 09 nov. 2024.
- FOELKEL, C. E. B. Eucalipto no Brasil, história do pioneirismo. **Revista Visão Agrícola**, v. 4, p. 66–69, 2005.
- FREITAS, V. R.; PICOLI, S. U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. **NewsLab**, Ed. 82, p. 124–128, 2007.
- FURTADO, E. L. **Manejo de doenças de origem bacteriana no eucalipto**. Revista Opiniões, v. 20, n. 70, p. 54–55, 2023. Disponível em: <https://florestal.revistaopinioes.com.br/pt-br/revista/leitura/online/protecao-total-da-floresta-plantada/>. Acesso em: 05 out. 2024.
- GABRIEL, V. A.; VASCONCELOS, A. A.; LIMA, E. F.; CASSOLA, H.; BARRETTO, K. D.; BRITO, M. C. A importância das plantações de eucalipto na conservação da biodiversidade. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 2013.
- INSTITUTO HUMANITAS UNISINOS. **Para a indústria de eucalipto no Brasil, os lucros estão acima dos povos e meio ambiente**, 2023. Disponível em: <https://www.ihu.unisinos.br/categorias/632979-para-a-industria-de-eucalipto-no-brasil-os-lucros-estao-acima-dos-povos-e-meio-ambiente>. Acesso em: 09 nov. 2024.
- LIMA, M. F.; LOPES, D. B.; TAVARES, S. C. C. de H.; TESSMANN, D. J.; MELO, N. F. de. **Doenças e alternativas de controle**. Embrapa, 2009.

MARINGONI, A. C. Técnicas em Fitobacteriologia. **Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais (FEPAF)**, Botucatu - SP, 2010.

MELO, I. S. de. **Endofíticos**. Embrapa Meio Ambiente, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/manejo/recursos-geneticos/endofiticos>. Acesso em: 30 out. 2024.

RISCAROLLI, J.; CASA, R. T.; MARTINS, F. C. **Caracterização biológica, bioquímica e molecular de bactérias fitopatogênicas do trigo**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages - SC, 2022.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Viçosa: Editora UFV, 2005.

SILVA, D. F. S. H. S. **Caracterização das doenças causadas por bactérias em viveiros e plantios florestais de *Eucalyptus* spp.** Dissertação de Mestrado – Botucatu – SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2019.

SUZUKI, H.; XIA, Y.; CAMERON, R.; SHADLE, G.; BLOUNT, J.; LAMB, C.; DIXON, R. A. Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 391-401, 1970.

WALKER, J. C.; PATEL, P. N. Splash dispersal and wind as factors in epidemiology of halo blight on bean. **Phytopathology**, v. 54, n. 2, p. 140-141, 1964.

ZAMBOLIM, L.; JESUS-JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. **O essencial da fitopatologia: Agentes causais**. 1. ed. Viçosa-MG: UFV, 2012.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE E SEQUENCIAMENTO MOLECULAR DE CEPAS BACTERIANAS ASSOCIADAS À MANCHA FOLIAR BACTERIANA

RESUMO

Para manter a alta produtividade do mercado do eucalipto, a área de genética molecular tornou-se inseparável da prática laboratorial. Conforme o setor florestal avança em termos de expansão territorial, as doenças fitopatológicas são mais frequentes. Com isso, a identificação dos patógenos acaba sendo indispensável para que ocorra um manejo direcionado ao problema. Para garantir a precisão na identificação, técnicas de biologia molecular fundamentam-se na amplificação direcionada de regiões específicas do DNA, permitindo a detecção e a caracterização precisa do patógeno de interesse. Tendo em vista todo esse cenário de importância, o estudo a seguir realizou a identificação de 78 microrganismos bacterianos retirados de folhas de eucaliptos em mudas que apresentaram sintomas de mancha foliar bacteriana em viveiros. As plantas afetadas apresentam sintomatologia em áreas com altas temperaturas e umidade elevada, onde mudas costumam ficar em bandejas com pequeno ou nenhum distanciamento entre elas. Todas as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) com o uso de primers específicos como DLH, X-GUM, X-FYUA, ITS e 16S, e por fim, as amostras positivas foram purificadas e sequenciadas. Os resultados comprovam que apenas 6 amostras foram positivas para os primers específicos e resultados de sequenciamento para o gênero *Xanthomonas*. Essas cepas pertencentes ao gênero de interesse foram submetidas à técnica analítica MALDI-TOF. Foi possível evidenciar que algumas cepas de *Xanthomonas translucens*, não catalogadas anteriormente, foram isoladas causando sintomas de doenças foliares em eucaliptos. Com isso, destaca-se a importância do uso da genética molecular e analítica para a identificação de patógenos bacterianos que podem causar perdas econômicas graves no setor florestal.

Palavras-chave: *Xanthomonas* spp.; bactérias fitopatogênicas; sequenciamento; primers; MALDI-TOF.

ABSTRACT

To maintain the high productivity of the eucalyptus industry, molecular genetics has become inseparable from routine laboratory practices. As the forestry sector continues to expand territorially, the incidence of phytopathological diseases increases, making pathogen identification essential for targeted management strategies. To ensure accurate identification, molecular biology techniques rely on the directed amplification of specific DNA regions, enabling the precise detection and characterization of the pathogen of interest. In this context, the present study identified 78 bacterial microorganisms isolated from eucalyptus leaves collected from nursery seedlings exhibiting symptoms of bacterial leaf spot. The affected plants were located in areas with high temperatures and humidity, where seedlings are typically grown in trays with little or no spacing between them. All isolates were subjected to polymerase chain reaction (PCR) using specific primers, including DLH, X-GUM, X-FYUA, ITS, and 16S. Positive samples were subsequently purified and sequenced. The results revealed that only six isolates tested positive with specific primers and sequencing results consistent with the genus *Xanthomonas*. These strains were further analyzed using the analytical technique MALDI-TOF. Notably, some isolates of *Xanthomonas translucens*—not previously cataloged—were identified as causative agents of foliar disease symptoms in eucalyptus. These findings underscore the importance of molecular genetics and analytical tools in the identification of bacterial pathogens that can cause significant economic losses in the forestry sector.

Keywords: *Xanthomonas*; phytopathogenic bacteria; sequencing; primers; MALDI-TOF.

2.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o setor de papel e celulose depende fortemente do cultivo de eucalipto, que desempenha uma função crucial no cenário florestal. Nesse contexto, o desenvolvimento de pesquisas focadas na proteção florestal, aprimoramento do manejo e técnicas de identificação de patógenos é de grande importância.

A mancha foliar bacteriana é uma doença amplamente conhecida no setor da produção e comercialização de mudas de eucalipto no Brasil, uma vez que tal fitopatologia gera sintomas expressivos que acarretam na redução da área fotossintética foliar devido ao aparecimento de manchas cloróticas que evoluem para pontos de necrose, além de impossibilitar a propagação.

Segundo Bergamin Filho e Amorim (2011), sabe-se que atualmente até duas espécies do gênero *Xanthomonas* podem ser encontradas em viveiros comerciais, sendo elas *Xanthomonas axonopodis* e *Xanthomonas campestris*. A ocorrência desses patógenos aumenta devido aos elevados níveis de umidade e temperatura que são encontrados dentro dos ambientes de armazenamento das mudas. Outro ponto que agrava o surgimento da doença e a proliferação de microrganismos é o acúmulo de matéria orgânica nas bandejas e a ausência de técnicas de assepsia de materiais de poda.

Para que o produtor de mudas possua medidas direcionadas para o controle e a prevenção dos causadores da mancha foliar bacteriana, são utilizadas combinações de metodologias para a detecção das espécies fitopatogênicas. Dentre as técnicas, podemos utilizar a reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction – PCR) com a adição de primers específicos para a identificação do patógeno ou combinar a PCR com a adição de primers generalistas, adicionando ao final da etapa o sequenciamento das regiões gênicas amplificadas. Essas sequências são posteriormente comparadas e analisadas em bancos de dados genômicos, permitindo a identificação precisa da espécie bacteriana (Merck, 2024).

Bansal *et al.* (2002) ressaltam que o gênero *Xanthomonas* possui um alto grau de similaridade fenotípica e entre as regiões 16S do rDNA. Com o avanço das técnicas em taxonomia e filogenia debruçadas sobre o genoma de *Xanthomonas* spp., aplicaram-se diversas variações quanto às suas espécies constituintes.

Estudos realizados anteriormente mostram que existem divergências de outras espécies de *Xanthomonas* spp., quando comparadas à espécie de *Xanthomonas campestris* usando a região de regulação de fatores de patogenicidade (*rpg*) (Takita *et al.*, 2004).

Para a determinação da gama de hospedeiros em *Xanthomonas* spp., são utilizadas ferramentas genéticas e moleculares que, em sua maioria, ainda se apresentam como desconhecidas (Jacques *et al.*, 2016). Além disso, todos os estudos moleculares comparativos elucidam como as espécies deste gênero bacteriano se adaptam de tal forma, onde alcançam hospedeiros muito heterogêneos e diversos tecidos vegetais diferentes (Ryan *et al.*, 2011). Segundo esses estudos moleculares, as características que abrangem cada especificidade do patógeno compreendem pontos como o polimorfismo de nucleotídeos únicos, a transferência horizontal de genes e a pressão da seleção provocada pelo hospedeiro (Darrasse *et al.*, 2013).

Quanto à restrição da gama de hospedeiros de uma determinada bactéria, se dá à ação de proteínas denominadas efetores do tipo III (T3E) que desencadeiam a imunidade da planta pelas PAMPs (Padrão molecular associado ao patógeno) ou PTI (Imunidade desencadeada por PAMPs). As T3E surgem a partir de uma infecção bem-sucedida, onde a planta considerada como hospedeira depende do sistema de secreção proteica do patógeno. Esse sistema secreta proteínas no meio extracelular e pode transportar essas proteínas ou DNA diretamente para o citosol celular do hospedeiro. Todo esse processo recebe o nome de translocação, e as proteínas translocadas são chamadas de proteínas efetoras (An *et al.*, 2019; Buttner; Bonas, 2010; Boulanger; Noel, 2016; Jones; Dangl, 2006).

Segundo White *et al.* (2009), a chave para a patogenicidade e a expansão da gama de hospedeiros ser realmente efetiva, o patógeno precisa ter a capacidade de suprimir a PTI, e essa característica está intrinsicamente ligada aos genes *avr* bacterianos.

Os estudos de genes envolvidos com a patogenicidade de *Xanthomonas* spp. deram início quando foi executado e publicado o sequenciamento e descrição do genoma de *Xanthomonas citri* pv. *citri* por Silva *et al.* (2002). Com as novas tecnologias de sequenciamento genômico e do genoma de diferentes espécies de *Xanthomonas* spp., possibilitou-se a identificação de genes que estão associados com a virulência e patogenicidade (Farias, 2020).

Bonas *et al.* (1991) e Kim *et al.* (2003) realizaram um estudo sobre os genes de resposta de hipersensibilidade e patogenicidade (*hrp*) encontrados em bactérias fitopatogênicas e consequentemente em *Xanthomonas* spp., sendo que estes são encontrados em 20 genes organizados em diversas unidades de transcrição.

Com o objetivo de evidenciar a diversidade genética que se faz presente na população bacteriana em questão, o acesso a essas características podem ser obtidas por meio da rep-PCR, onde ocorre a amplificação de sequências repetitivas conservadas no genoma bacteriano (Ferraz *et al.*, 2023).

Segundo os estudos desenvolvidos por Ferraz *et al.* (2023), a análise genômica e molecular para o esclarecimento das espécies do gênero *Xanthomonas* acontece a partir da rep-PCR, sequenciamento, análise do rDNA 16S, análise de sequência multilocus de genes de manutenção *fyuA* (Young *et al.*, 2008) e posteriormente sua análise comparativa.

Ferraz *et al.* (2023) evidenciaram, por meio de seu trabalho, que outras 8 espécies com patovares diferentes de *Xanthomonas* spp. podem ser encontradas em eucaliptos com uma reação patogênica. Estas são: *X. euvesicatoria*, *X. citri*, *X. faseoli*, *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. euvesicatoria* pv. *phaseoli*, *X. euvesicatoria* pv. *perfurans*, *X. citri* pv. *fuscans* e *X. axonopodis*.

A doença causada pela *Xanthomonas* spp. traz diversos pontos importantes sobre a perda de mudas, investimentos e a difícil erradicação do patógeno em viveiros. Com isso, diversos pesquisadores se debruçam em cima da biologia molecular para descobrir as espécies e distinguir patótipos que podem estar englobados dentro do gênero *Xanthomonas* spp. Uma vez descoberto o gênero causador da doença nos viveiros, as medidas de controle, mitigação e controle de focos bacterianos se apresentam de forma mais direcionada para o problema (Diniz, 2021).

O agente responsável por realizar a fiscalização e controle de insumos agrícolas no Brasil é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e com isso, existem regras que permeiam a regulamentação da qualidade do eucalipto produzido no país. Para a presença de doenças em eucalipto, é considerada a quarentena ou a queima total dos produtos infectados, ressaltando assim a importância da identificação do patógeno causador da doença (Bonatelli, 2018).

Outra técnica pouco explorada é a aplicação da espectrometria de massa de tempo de voo de ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) na patologia de plantas florestais, onde representa um avanço significativo na rápida detecção e identificação de patógenos vegetais. Essa técnica inovadora permite a análise de microrganismos intactos, permitindo a identificação de vários patógenos associados a plantas, incluindo bactérias, fungos e vírus, por meio de impressões digitais proteicas exclusivas, resultando em nível de gênero e espécie quando possível (Ahmad *et al.*, 2012; Chowdappa *et al.*, 2023).

Com isso, o presente trabalho reforça a necessidade da execução de análises genéticas em regiões conservadas pelo gênero *Xanthomonas* spp., genes de patogenicidade e hipersensibilidade, genes de conservação e genes de produção de polissacarídeos extracelulares para a identificação a nível de espécie do gênero em questão para acompanhamento da expansão de hospedeiros do patógeno. Para confirmação dos processos genéticos, buscou-se alternativas como a aplicação do MALDI-TOF, aprimorando assim a compreensão das interações planta-patógeno.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO

No presente trabalho, foram utilizados isolados bacterianos retirados de amostras foliares de *Eucalyptus* spp. que apresentavam sintomas de mancha foliar bacteriana. Foram selecionados pequenos cortes em que a área de transição do tecido doente para o tecido saudável se fazia presente. Após esse procedimento de triagem das lesões, todas as amostras passaram por assepsia da superfície do limbo foliar e depois foram depositadas em meio NA para o posterior isolamento das colônias bacterianas de interesse.

O gênero *Xanthomonas* spp., quando semeado em meio de cultivo NA, apresenta coloração amarela com a produção de goma xanthana, um heteroexopolissacarídeo que confere a característica de viscosidade aguda na colônia bacteriana. Os isolados que apresentaram as características esperadas para o gênero do microrganismo em questão foram utilizados para a caracterização molecular.

Para a realização do procedimento de extração de DNA do material biológico, foi empregado o protocolo padrão com algumas adaptações do *Trans Direct Plant Tissue PCR Kit – Transgen Biotech Co.* Inicialmente, as bactérias congeladas a -4°C em tubos de ensaio contendo água destilada autoclavada e glicerol a 30% foram reativadas por meio do plaqueamento em placas de Petri com meio de cultivo NA. Essas placas foram incubadas em BOD a 28°C por um período de 48 horas (Embrapa, 2007).

Após o crescimento adequado das culturas puras, utilizando uma alça bacteriológica estéril, foram raspadas as colônias isoladas pelo método da estria de esgotamento e transferidas para um microtubo contendo 200 μL de água destilada autoclavada. Desta suspensão, foram retidos 2 μL e adicionados 2 μL de água *nuclease-free*, transferidos para outro microtubo estéril e submetidos à centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. Após este processo, o sobrenadante foi removido, obtendo-se o pellet com o material biológico de interesse.

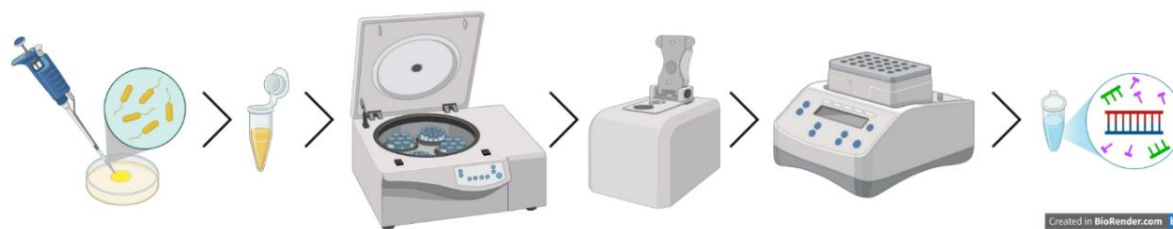
A fim de alcançar uma concentração aceitável de DNA bacteriano para uma extração e amplificação satisfatória, as amostras foram submetidas à quantificação fotométrica por medidas de absorbância utilizando o equipamento *Thermo NanoDrop 1000 Spectrophotometer*. Este método é amplamente utilizado para estimar as concentrações de ácidos nucleicos nas amostras, podendo a concentração ser determinada a partir da lei de Lambert-Beer:

$$c = \frac{\mathcal{A}}{\varepsilon \cdot \mathcal{L}}$$

- a) c = Concentração;
- b) $\mathcal{A}$ = Absorbância medida a 260nm;
- c) $\mathcal{L}$ = Caminho óptico (cm);
- d) ε = Coeficiente de extinção, ou absortividade intrínseca, de ácidos nucleicos expressos em $(\mu\text{g/mL})^{-1}(\text{cm})^{-1}$.

Posteriormente, foram adicionados 40 μL do PD1 *Buffer* e as amostras foram levadas ao banho seco por 15 minutos a 95°C . Após esse procedimento, foram adicionados 40 μL do PD2 *Buffer*. Separadamente, foi preparado o mix contendo a enzima, os *primers* de interesse, água e o DNA bacteriano (Figura 1).

Figura 1 - Exemplificação do processo de extração de DNA bacteriano



Fonte: BioRender (2024).

2.2.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA BACTERIANO

Após a extração do material bacteriano, foram adicionados 23µL de mix (contendo enzima, *primers*, água *nuclease-free* e dimetilsulfóxido) a cada microtubo de 0,2mL. Em seguida, adicionaram-se 2µL de DNA bacteriano, completando assim um volume total de 25µL (Zambolim *et al.*, 2012; Alfenas 2 Mafia, 2016, p.310-314).

Para a amplificação das regiões de interesse do genoma bacteriano, foram utilizados primers de regiões conservadas e específicos para o gênero *Xanthomonas* spp. (Tabela 1). O par de primers DLH120 e DLH125, desenvolvidos por Berg *et al.* (2005), amplifica um fragmento de 619 pares de base envolvidos na região do gene *hrpF*. Essa região está intrinsicamente ligada à hipersensibilidade e patogenicidade bacteriana. Na etapa da amplificação, foi utilizado o termociclador da marca *Applied Biosystems*, modelo *Veriti*, com o seguinte perfil de temperatura: etapa de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 40 segundos, 6 vezes a 58°C por 40 segundos, 63°C por 40 segundos, 72°C por 40 segundos, finalizando com 72°C por 5 minutos. A concentração de primer utilizada foi de 5 pm/L. (Berg *et al.*, 2005).

Os dois primers X-GUMFW7 e X-GUMDRV7 foram utilizados com o objetivo de amplificar a região do gene *gum* responsável pela produção de polissacarídeos extracelulares, uma característica principal de produção do gênero *Xanthomonas* spp. É uma região extremamente conservada dentro do gênero e entre as diferentes espécies. Para a amplificação, foi utilizado um termociclador da marca *Applied Biosystems*, modelo *Veriti*, com o ciclo iniciando com a desnaturação em 95°C por 3 minutos, 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 66°C por 15 segundos, 72°C por 15 minutos e finalizando com 72°C por 3 minutos.

A concentração de primers utilizada foi de 25 pm/L e foi esperado ao final do processo o aparecimento de uma banda positiva indicando 402 pb (Adriko *et al.*, 2014).

Os primers X-ITS-FW3C, X-ITS-RV2 foram utilizados com o objetivo de identificar a região do espaçador transcrito interno (ITS), uma vez que é considerada uma região de conservação dentro do gênero de *Xanthomonas* spp. Ao final do processo, foi esperada a amplificação de 254pb (Adrikos *et al.*, 2014). Para a amplificação, foi utilizado um termociclador da marca *Applied Biosystems*, modelo *Veriti*, com o ciclo iniciando com a desnaturação em 95°C por 3 minutos, 29 ciclos de 94°C por 15 segundos, 69°C por 10 segundos, 72°C por 10 minutos e finalizando com 72°C por 3 minutos. A concentração de primer utilizada foi de 25 pm/L (Adriko *et al.*, 2014).

Os primers FyuA-RV5, FyuA-RV3 foram selecionados para identificar a presença da sequência gênica do receptor dependente de *TonB*. Esses receptores caracterizam uma classe proteica que desempenha papéis fundamentais para o metabolismo de bactérias gram-negativas (Souza *et al.*, 2022; Silale & Berg, 2023). Ao final do processo, foi esperada a produção de uma banda de 239pb. Para a amplificação, foi utilizado um termociclador da marca *Applied Biosystems*, modelo *Veriti*, com o ciclo iniciando com a desnaturação em 95°C por 3 minutos, 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 66°C por 12 segundos, 72°C por 10 minutos e finalizando com 72°C por 3 minutos. A concentração de primer utilizado é de 12,5 pm/L (Adriko *et al.*, 2014).

O primer 16S foi utilizado para amplificação de região conservada entre os gêneros bacterianos e o produto dessa PCR foi submetido ao sequenciamento das regiões específicas do gene que codifica o RNA funcional ribossomal da subunidade 16S (Halsey, 2012). Para a amplificação, foi utilizado um termociclador da marca *Applied Biosystems*, modelo *Veriti*, com o ciclo iniciando com a desnaturação em 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 40 segundos, 72°C por 40 minutos e finalizando com 72°C por 5 minutos. A concentração de primer utilizado é de 10 pm/L. Para melhorar a estabilidade das enzimas adicionadas ao mix e aumentar a especificidade da Taq polimerase pela sequência-alvo do DNA, foi adicionado o BSA (Albumina de soro bovino) (Turner *et al.*, 1999; Aboim *et al.*, 2004).

O produto das amplificações por PCR realizadas com cada primer de regiões gênicas específicas foi analisado em gel de agarose de 1% em Tris Boro EDTA (TBE 1,0x), corado com Gel Red Unisafe (Uniscience) e, ao final, foi visualizado por meio do equipamento *GE Healthcare Life Science, ImageQuant LAS 500*.

Tabela 1 - Lista de primers e suas respectivas bibliografias

Primers	Sequência (5' - 3')	Gene Alvo	Tamanho do Produto (pb)	Bibliografia
DLH 120	(CCGTAGCACTTAGTGCAATG)	Gene <i>hrpF</i> , indica reação de hipersensibilidade e patogenicidade bacteriana. Altamente conservado na espécie <i>Xanthomonas campestris</i> .	619pb	Berg <i>et al.</i> , 2005
DLH 125	(GCATTTCATCGGTCACGATTG)			
X-GUMDFW7	(GGCCGCGAGTTCTACATGTTCAA)	Gene <i>gum</i> , indica produção heteroexopolissacarídeo, via fermentação de açúcares por bactérias do gênero <i>Xanthomonas</i> .	402pb	
X-GUMDRV7	(CACGATGATGCGGATATCCAGCCACAA)			
X-FYUA-RV5	(CGGTGGCGAACAGGCTCA)	Identifica a presença da sequência gênica do receptor de <i>TonB</i> , altamente conservada no gênero <i>Xanthomonas</i> .	239pb	Adriko <i>et al.</i> , 2014
X-FYUA-RV3	(GTCGCGGCGCCACTTCA)			
X-ITSFW3C	(CGGGGACCTCGAGTCCCTA)	Identifica a região do espaçador transcrito interno, região conservada entre espécies de <i>Xanthomonas</i> .	254pb	
X-ITS-RV2	(CTGCAGGATACTGCCGAAGCA)			

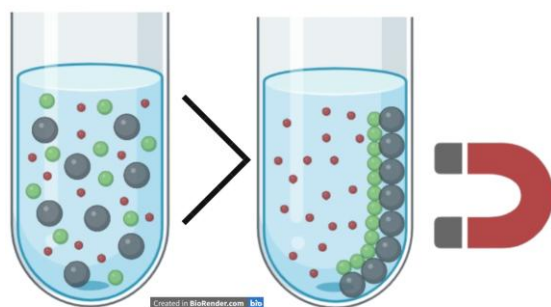
Fonte: Luís Thadeo Poianas Silva (2023).

2.2.3 PURIFICAÇÃO DO DNA POR *BEADS* MAGNÉTICAS E SEQUENCIAMENTO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os primeiros sequenciamentos do gênero *Xanthomonas* spp. resultaram em um depósito de 1.500 genomas de diversas espécies pertencentes ao gênero na plataforma do NCBI. De uma forma geral, os genomas sequenciados possuíam um cromossomo do tipo circular codificando de 3.166 a 5.135 genes. Além do mais, os genomas sequenciados possuíam clusters em comum, como os genes *hrp* para patogenicidade e os genes *gum* para síntese de heteroexopolissacarídeo xantana (Ryan *et al.*, 2011).

Após a conclusão da extração do DNA e a execução da PCR, as amostras positivas foram submetidas à purificação do DNA utilizando *beads* magnéticas. Para este fim, emprega-se um protocolo no qual as amostras são distribuídas em placas de 96 poços. Adiciona-se o dobro do volume de *beads* magnéticas em relação ao volume de DNA, realizando uma homogeneização por 10 vezes com pipeta e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, a placa é posicionada em suporte magnético por 3 minutos, onde as *beads* magnéticas ficam aderidas ao DNA e são atraídas para um lado magnético da placa (Figura 2).

Figura 2 - Exemplificação das *beads* magnéticas aderidas ao DNA



Fonte: BioRender (2024).

Sem remover a placa do suporte magnético, o líquido é cuidadosamente retirado do poço, preservando o *pellet* formado pelas *beads* magnéticas. A seguir, adiciona-se 180 μ L de etanol 70% recém-preparado em cada poço, aguardando 30 segundos e remove-se completamente todo o etanol do poço. Esse processo é repetido até 2 vezes a fim de garantir a eliminação total do etanol em cada etapa.

Posteriormente, a placa é retirada do suporte magnético, e adiciona-se 40µL de água *nuclease free* para permitir que as *beads* magnéticas se soltem do DNA. Para remover as *beads* magnéticas, a placa é novamente colocada no suporte magnético, e 40µL da solução contendo o DNA desligado das *beads* magnéticas são transferidos para um novo *eppendorf*, sendo então armazenado a -4°C para futura quantificação.

Após a purificação das amostras, foi crucial realizar a quantificação no *Thermo NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, utilizando 1µL de DNA e observando os resultados na faixa de 260 a 280 nm, com uma relação de absorbância entre 1 e 2 para indicar a pureza adequada. Idealmente, as concentrações das amostras devem estar entre 10-20 ng/µL.

Ao final do método, as amostras foram submetidas ao sequenciamento Sanger no Instituto de Biotecnologia da UNESP de Botucatu. Nesse processo, emprega-se a incorporação de dideoxirribonucleotídeos marcados, que interrompem de forma aleatória a síntese do DNA, resultando em fragmentos de diversos comprimentos que correspondem à sequência original (Sanger *et al.*, 1977). Os produtos de reação foram então analisados por meio de eletroforese capilar automatizada, e as sequências geradas foram reconstruídas com o auxílio do software Chromas, que assegura a qualidade e a exatidão dos dados obtidos. Em etapa subsequente, as sequências foram comparadas com as disponíveis no banco de dados internacional GenBank (NCBI) utilizando algoritmos de alinhamento, como o BLAST (Altschul *et al.*, 1990), permitindo a identificação e a validação dos isolados estudados de forma precisa e assertiva.

2.2.4 ESPECTROMETRIA DE MASSA DE TEMPO DE VOO DE DESSORÇÃO/IONIZAÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ (MALDI-TOF MS)

A análise analítica MALDI-TOF MS surgiu como uma ferramenta fundamental na fitopatologia florestal para a rápida identificação e caracterização de patógenos vegetais. Com ela, é possível analisar células intactas ou extratos celulares de tecidos vegetais, permitindo a identificação de forma direta (Chavan & Khatoon, 2023). A técnica registra íons biomarcadores exclusivos de microrganismos, facilitando a identificação taxonômica com base no peso molecular, caracterizada como “*fingerprint*” proteico (Ahmad *et al.*, 2012).

De forma simplificada, a bactéria é colocada em uma placa, adiciona-se uma matriz química e, em seguida, um laser ioniza as proteínas presentes. Os íons gerados são acelerados e analisados com base no seu tempo de voo. O espectro obtido é então comparado com um banco de dados para identificar rapidamente e com precisão a espécie bacteriana. As amostras submetidas a essa técnica foram aquelas previamente identificadas, por meio de análises moleculares, como pertencentes ao gênero *Xanthomonas*.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de extração, amplificação e sequenciamento do DNA de uma amostra é simples e eficaz, pois define de forma assertiva qual o microrganismo que está sendo manipulado. Os isolados do presente estudo foram compatíveis com bactérias do gênero *Xanthomonas*, compactuando com os resultados obtidos nas etapas de classificação bioquímica e patogênica. Além disso, é importante considerar que, embora os testes bioquímicos sejam úteis na identificação inicial de isolados bacterianos, estudos como o de Wruck (2001) enfatizam a importância de análises moleculares para uma caracterização mais precisa e para a compreensão da diversidade genética entre isolados de *Xanthomonas*.

Em relação aos primers utilizados ao realizar a eletroforese, apresentaram resultados satisfatórios e bandas definidas compatíveis com os pares de bases descritos na literatura selecionada, havendo modulação apenas para a adição de dimetilsulfóxido e albumina sérica bovina em proporções ideais de manipulação.

Os resultados advindos do sequenciamento Sanger foram editados pelo software Chromas (versão 2.6.6) e comparados no GenBank pelo Blast em formato FASTA (Tabela 2).

Tabela 2 - Lista de microrganismos identificados após pareamento das sequencias no GenBank

Nome Científico	Similaridade	Código GenBank
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	99,89%	CP166448.1
<i>Xanthomonas campestris</i>	99,89%	CP167216.1
<i>Xanthomonas campestris</i>	100%	MW741556.1
<i>Xanthomonas translucens</i>	100%	OP811580.1
<i>Xanthomonas translucens</i>	99,88%	KX507147.1
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	97.70%	KY287944.1

Fonte: Luís Thadeo Poianas Silva (2024).

Observa-se inicialmente que o grau de similaridade das cepas descritas é acima de 97,50%, o que indica alta compatibilidade entre os fragmentos analisados no banco de dados internacional. As espécies *Xanthomonas campestris* e *Xanthomonas axonopodis* já foram descritas por Alfenas (2016) como principais patógenos da mancha foliar bacteriana. A incidência de *Xanthomonas euvesicatoria* e *Xanthomonas translucens* corrobora com dados descritos por Ferraz *et al.* (2024), porém a utilização do primer 16S amplifica uma região muito específica e curta do genoma bacteriano. Desta forma, há um consenso entre os pesquisadores de que, ao se utilizar o 16S, os resultados obtidos no GenBank sejam apenas assertivos em nível de gênero e não precisos para determinação em nível de espécie.

O uso da espectrometria de massa MALDI-TOF confirmou a identificação de duas cepas de *Xanthomonas* como *X. translucens* e *X. euvesicatoria*, com altos índices de confiança de 2,29 e 2,14, respectivamente. Essas espécies são conhecidas por sua patogenicidade em plantas, facilitada pelo Sistema de Secreção Tipo III (T3SS), que desempenha um papel crucial nas interações patógeno-hospedeiro. O T3SS permite que a bactéria injete proteínas efetoras nas células vegetais, suprimindo a resposta imune da planta e permitindo a infecção. Esse mecanismo é fundamental para a patogenicidade de *X. translucens* e *X. euvesicatoria*, embora haja diferenças em suas faixas de hospedeiros e proteínas efetoras específicas.

X. translucens afeta principalmente plantações de cereais, causando estrias bacterianas nas folhas (BLS) em espécies como trigo e cevada (Sapkota *et al.*, 2020). O patógeno utiliza um T3SS para fornecer efetores, incluindo efetores semelhantes a ativadores de transcrição (TALEs), que modulam a expressão do gene do hospedeiro para facilitar a infecção (Pesce, 2014). Isolados recentes de *X. translucens* mostraram aumento da virulência, potencialmente devido a variações genéticas (Gutierrez-Castillo *et al.*, 2023).

X. euvesicatoria é conhecida por causar manchas bacterianas em tomates e pimentões, com uma ampla gama de hospedeiros. O T3SS em *X. euvesicatoria* é essencial para a patogenicidade, com efetores específicos sendo cruciais para sua função. A variabilidade no agrupamento do gene *hrp*, particularmente na proteína *hrpE*, afeta a secreção de efetores e, portanto, a virulência do patógeno (Choudhary *et al.*, 2023).

Ambas as espécies desencadeiam a imunidade desencadeada por *PAMP* (PTI) nas plantas, que é combatida pelos efetores bacterianos do *T3SS* que suprimem a resposta imune do hospedeiro (Sapkota *et al.*, 2020; Pesce, 2014). Os genes *hrp* e *hrc* são parte integrante do *T3SS*, com os genes *hrp* sendo mais variáveis e os genes *hrc* sendo altamente conservados (Pesce, 2014).

Embora o *T3SS* seja uma característica comum entre as espécies de *Xanthomonas*, os efetores específicos e suas interações com as plantas hospedeiras podem variar significativamente, influenciando a variedade de hospedeiros e a virulência do patógeno. Compreender essas diferenças é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de gerenciamento de doenças em viveiros em campo na eucaliptocultura.

REFERÊNCIAS

- ABOIM, M. C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PEREIRA, C. S.; SANTOS, L. A.; FERREIRA, M. J.; SOUZA, T. R. **Avaliação da diversidade microbiana em amostras de solos: técnica do PCR/DGGE (Protocolo Laboratorial)**. Embrapa Solos, Rio de Janeiro, 2004.
- ADRIKO, J.; MBEGA, E. R.; MORTENSEN, C. N.; WULFF, E. G.; TUSHEMERWE, W. K.; KUBIRIBA, J.; LUND, O. S. Improved PCR for identification of members of genus *Xanthomonas*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 138, p. 293-306, 2014.
- AHMAD, F. *et al.* Potencial da espectrometria de massas MALDI-TOF como técnica de detecção rápida em patologia vegetal: identificação de microrganismos associados a plantas. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404 (4), 1247-1255, 2012.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa-MG: Ed. UFV, 2016.
- AN, S. Q.; POTNIS, N.; DOW, M.; VORHÖLTER, F. J.; HE, Y. Q.; BECKER, A.; TEPPER, D.; LI, Y.; WANG, N.; BLERIS, L.; TANG, J.-L. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 44, p. 1-32, 2019.
- BANSAL, K.; MIDHA, S.; KUMAR, S.; PATIL, P. B. Ecological and evolutionary insights into *Xanthomonas citri* pathovar diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 83, p. e02993-16, 2017.
- BERG, T.; TESORIERO, L.; HAILSTONES, L. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. **Plant Pathology**, v. 54, p. 416-427, 2005.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Manejo integrado de doenças**. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 409-419, 2011.
- BONAS, U.; SCHULTE, R.; FENSELAU, S.; MINSAVAGE, G. V.; STASKAWICZ, B. J.; STALL, R. E. Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 4, p. 81-88, 1991.
- BOULANGER, A.; NOËL, L. D. *Xanthomonas* whole genome sequencing: Phylogenetics, host specificity and beyond. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 1100, 2016.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, 2010.

CHAVAN, D. D. & KHATOON, H. MALDI-TOF-MS: Uma ferramenta de diagnóstico rápido para doenças de plantas. **Medicon Agriculture & Environmental Sciences**, v. 5, p. 32-36, 2023.

CHOUDHARY, M. I. *et al.* Whole genome sequence-based classification of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *Eucalypti* and computational analysis of type III secretion system. **Phytopathology**. 2023.

CHOWDAPPA, L. *et al.* Espectrometria de massas por ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) para identificação de espécies de *Alternaria* patogênicas para plantas. **Phytoparasitica**, v.41 (2), p. 169-179, 2013.

DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGLIO, F.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M.; DO AMARAL, A. M., *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v. 417, p. 459-463, 2002.

DARRASSE, A., *et al.* Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. **BMC Genomics**, London, v. 14, 2013.

DE FARIAS, A. R. G. **Análise comparativa e funcional do genoma de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*: aplicação sobre virulência, patogenicidade e posicionamento taxonômico**. Tese de Doutorado—Recife - PE: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2020.

DINIZ, R. L. C. **Deteção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em sementes de canola tratadas e variabilidade genética de uma coleção de isolados**. Dissertação (Mestrado)—Uberlândia - MG: Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Agrárias, 2021.

EMBRAPA. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Embrapa, São Carlos, 2007. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2024.

FERRAZ, H. G. M.; BADEL, J. L.; NEVES, Y. F.; ELOI, A. C. L.; VIDIGAL, P. M. P.; GUIMARÃES, L. M. S., *et al.* Espécies de *Xanthomonas* causando queimadura foliar em plantas de eucalipto no Brasil e transferência de *Xanthomonas axonopodis* pv. **Plant Pathology**, v. 73, p. 677–691, 2024.

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry: A Textbook**. Springer, Ed 2, 2011.

GUTIERREZ-CASTILLO, D. E. *et al.* A recently collected *Xanthomonas translucens* isolate encodes TAL effectors distinct from older, less virulent isolates. **BioRxiv**. 2023.

HALSEY, J. A. **Diversidade de bactérias associadas aos cogumelos de Mata Atlântica no Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado)—Piracicaba - SP: Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.

JACQUES, M.-A.; ARLAT, M.; BOULANGER, A.; BOUREAU, T.; CARRÈRE, S.; CESBRON, S., *et al.* Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, 2016.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.

JUHAS, M.; CROOK, D. W.; HOOD, D. W. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 2377-2386, 2008.

KIM, J. G.; PARK, B. K.; YOO, C.-H.; JEON, E.; OH, J.; HWANG, I. Characterization of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* Hrp pathogenicity island. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, p. 3155-3166, 2003.

MERK. **Etapas e método de sequenciamento de Sanger**, 2024. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>. Acesso em: 24 jun. 2024.

PESCE, C. Funcional analysis of type III secretion system and transcription activator-like effectors of *Xanthomonas translucens*, the causal agent of bacterial leaf streak on cereals. 2014.

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F.-J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; VAN SLUYS, M.-A.; BOGDANOVE, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, p. 344-355, 2011.

SAPKOTA, S. *et al.* The translucens group of *Xanthomonas translucens*: Complicated and important pathogens causing bacterial leaf streak on cereals. **Molecular Plant Pathology**, v.21, p. 291-302, 2020.

SILALE, A.; BERG, B. V. D. TonB-dependent transport across the bacterial outer membrane. **Annual Review of Microbiology**, v. 77, p. 67-88, 2023.

SOUZA, P. H. F. C., *et al.* **Potótipo vacinal baseado em bacterina recombinante de *Escherichia coli* expressando porções de receptores dependentes de TonB de *Leptospira* spp.** In: 8ª Semana Integrada da UFPel 2022 - XXXI CIC: Congresso de Iniciação Científica. Universidade Federal de Pelotas, 2022.

TAKITA, M. A.; SOUZA, A.; BORGES, K. M.; COLETA-FILHO, H. D.; RODRIGUES NETO, J.; MACHADO, M. A. A região rpf (regulation of pathogenicity factors) distingue espécies de *Xanthomonas*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. S253-54, 2004.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among Cyanobacteria and Plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **J. Eukaryont Microbiol.** v. 46, Ed. 4, p. 327- 338, 1999.

WHITE, F. F.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; KOEBNIK, R. The type III effectors of *Xanthomonas*. **Molecular Plant Pathology**, 2009.

WRUCK, D. S. M. **Análises bioquímica, patogênica, sorológica e molecular de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG, 2001.

YOUNG, J. M.; WILKIE, J. P.; PARK, D. C.; WATSON, D. R. Cepas neozelandesas de bactérias patogênicas de plantas classificadas por análise de sequência multilocus; proposta de *Xanthomonas dyei* sp. nov. **Plant Pathology**, v. 59, p. 270–281, 2010.

ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. **O essencial da fitopatologia: Agentes causais**. 1. ed. Viçosa-MG: UFV, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para futuras análises e aprofundamento dos resultados obtidos no presente trabalho, todas as amostras coletadas estão disponíveis no banco de dados armazenado no Laboratório de Patologia Florestal e Microbiologia do Solo da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), situado em Botucatu – SP. No contexto geral, os objetivos foram contemplados e cumpridos em sua totalidade.

Como exposto, a caracterização bioquímica se faz de modo complementar à identificação de fitobactérias. Já a caracterização utilizando vias moleculares é importante para a detecção específica e possibilita a classificação taxonômica a nível de gênero. Desta forma, se faz necessário o destaque para o sequenciamento geral e não parcial do genoma bacteriano, porém tal via de identificação é custosa.

Técnicas complementares e não tão convencionais dentro da fitopatologia podem ser aplicadas visando a redução de custos, tempo e divergência de resultados, uma vez que possuem maior exatidão. Como, por exemplo, o emprego de técnicas de espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) segundo Gross (2011), ou a utilização do BioLog OmniLog, que consiste na análise automatizada de padrões bioquímicos específicos (Bochner, 2009) e determina os microrganismos via *fingerprint*.

Como exposto, o presente estudo sugere que *Xanthomonas translucens*, por meio de variações gênicas como mutações, recombinação ou transferência horizontal, adquiriu o gene *hrc*, responsável por codificar proteínas capazes de suprimir o sistema de defesa de *Eucalyptus* spp. Essa hipótese foi levantada a partir da identificação molecular e confirmada por espectrometria de massas via MALDI-TOF.

Conclui-se, portanto, que há necessidade de aprofundar os estudos sobre cepas de *Xanthomonas* spp. associadas a fitobactérias já descritas na literatura. O estudo indica uma alta probabilidade de associação entre diferentes espécies de *Xanthomonas* spp. com a ocorrência de mancha foliar bacteriana em eucaliptos. Ademais, sugere-se que cepas distintas, incluindo *Xanthomonas translucens*, possam estar envolvidas em doenças com sintomatologia semelhante em *Eucalyptus*.

REFERÊNCIAS

ABRAF. **ANUÁRIO Estatístico da ABRAF 2012: ano base 2011**. Brasília, DF: ABRAF, 2012.

ADRIKO, J.; MBEGA, E. R.; MORTENSEN, C. N.; WULFF, E. G.; TUSHEMERIRWE, W. K.; KUBIRIBA, J.; LUND, O. S. Improved PCR for identification of members of genus *Xanthomonas*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 138, p. 293-306, 2014.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa-MG: Ed. UFV, 2016.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016.

ALFENAS, A. C.; ZAURA, E. A. V.; MAFIA, R.; ASSIS, T. F. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B.; CAMARGO, I. E. A. **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. v. 2. Ouro Fino-MG: Agronômica Ceres, 2016.

ARRIEL, D. A. A.; FONSECA, N. R.; GUIMARÃES, L. M. S.; HERMENEGILDO, P. S.; MAFIA, R. G.; BORGES, N.; SOUZA, H. P.; ALFENAS, A. C. Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. **Forest Pathology**, v. 44, n. 4, p. 255-265, 2014.

ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. **Hibridação e clonagem**. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotechnology Florestal**. Viçosa: Suprema, 2007. p. 93-121.

BERG, T.; TESORIERO, L.; HAILSTONES, L. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in Brassica seed. **Plant Pathology**, v. 54, p. 416-427, 2005.

BOCHNER, B. R. Global phenotypic characterization of bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, n.1, p. 191-205, 2009.

EMBRAPA. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa, 2007. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2024.

FERRAZ, H. G. M.; DEMUNER, G. A.; GUIMARÃES, L. M. S.; ARRIEL, D. A. A.; SILVA, A. C.; JUNIOR, N. B.; MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C. Methods of inoculation and evaluation of *Erwinia psidii* in eucalypt. **Forest Pathology**, v. 46, n. 3, p. 240-247, 2015.

GABRIEL, V. A.; VASCONCELOS, A. A.; LIMA, E. F.; CASSOLA, H.; BARRETTO, K. D.; BRITO, M. C. A importância das plantações de eucalipto na conservação da biodiversidade. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 2013.

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry**: A Textbook. Springer, Ed 2, 2011.

KRAUTHAUSEN, H. J.; LAUN, N.; WOHANKA, W. Methods to reduce the spread of the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, in Brassica transplants. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 118, n. 1, p. 7-16, jan. 2011.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, M. A. Avaliação da resistência do eucalipto à murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 4, p. 649-656, 2014.

MARINGONI, A. C. Técnicas em Fitobacteriologia. Botucatu-SP: **Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais** (FEPAF), 2010.

MERK. **Etapas e método de sequenciamento de Sanger**. 2024. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>. Acesso em: 24 jun. 2024.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Viçosa: Editora UFV, 2005.

SILVEIRA, R. L. V. A.; HIGASHI, E. N. Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para o eucalipto. **IPEF** (Circular Técnica nº200), 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2004.

WALKER, J. C.; PATEL, P. N. Splash dispersal and wind as factors in epidemiology of halo blight on bean. **Phytopathology**, v. 54, n. 2, p. 140-141, 1964.

ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. **O essencial da fitopatologia: Agentes causais**. 1. ed. Viçosa-MG: UFV, 2012.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 275-318, 1993.