



## CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*

Victor Fernando Galvão Bezerra<sup>1</sup>, Alessandra Keiko Nakasone Ishida<sup>2</sup>, Sandra Valéria Dias Cardoso<sup>3</sup>,  
Luana Cardoso de Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, [victor\\_fgb@yahoo.com](mailto:victor_fgb@yahoo.com)

<sup>2</sup>Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, [alessandra.ishida@embrapa.br](mailto:alessandra.ishida@embrapa.br)

<sup>3</sup>Mestranda, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, [sandravaléria\\_cardoso@hotmail.com](mailto:sandravaléria_cardoso@hotmail.com)

<sup>4</sup>Doutoranda Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Fitopatologia, [luanacardoso.oliveira@hotmail.com](mailto:luanacardoso.oliveira@hotmail.com)

**Resumo:** O presente trabalho teve como objetivo a caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* a partir de testes bioquímicos. Foram utilizados 35 isolados provenientes de municípios paraenses, coletados entre os anos de 2012 e 2017. Foram aplicados os testes de Gram em hidróxido de potássio (3%) e por coloração (Sigma-Aldrich), catalase pela quebra do peróxido de hidrogênio (3%), oxidase pelas tiras de p-fenilenodiamina (Laborclin), amilase pela hidrólise de amido, Xanthomonadina e Bactray (I e II). Os resultados obtidos para todos os testes corresponderam aos descritos na literatura utilizada, exceto a produção de acetoina pelos isolados que é um fenômeno não característico da espécie.

**Palavras-chave:** *Manihot esculenta*, bacteriose, testes bioquímicos

### Introdução

A bacteriose, causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, é a doença de maior importância da cultura da mandioca. Seus sintomas envolvem manchas e necroses foliares, murcha, morte descendente, exsudação gomosa e necrosamento do sistema vascular do vegetal (CEBALLOS, 1977). No Brasil, a doença encontra-se mais expressiva nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, onde pode possuir caráter altamente destrutivo. No Pará, a bacteriose está presente nos municípios de Acará, Ananindeua, Capanema, Capitão Poço, Castanhal, Igarapé Açu, Moju, Santa Isabel do Pará, São Francisco do Pará e Tracuateua, onde apenas os sintomas foliares da doença foram encontrados (ISHIDA et al., 2016). Desse modo, esse trabalho teve como objetivo caracterizar 35 isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam), a partir dos testes bioquímicos de Gram, Catalase, Oxidase, Hidrólise de amido, Xantomonadina e Bactray.

### Material e Métodos

Os isolados utilizados, provenientes dos municípios de Acará, Belém, Bragança, Capitão Poço, Castanhal, Igarapé-Açu, Marituba, Santa Izabel, Tailândia e Tracuateua no Estado do Pará, foram coletados entre o período de 2012 a 2017 e identificados como *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* por PCR com os primers específicos XV-XK (ISHIDA et al., 2016). Para o uso experimental, todos os



isolados foram cultivados em meio 523 de KADO & HESKETT por 48h a 28°C. O teste de Gram foi realizado pelo método de Ryu e por coloração. No método de Ryu, foi adicionada uma gota de KOH a 3% a uma porção de colônia bacteriana em uma lâmina de microscopia. Para a avaliação, observou-se a viscosidade desta mistura, bactérias Gram-negativas tornam-se viscosas ao contato com esse óxido devido à transformação do seu ectoplasma, enquanto as Gram-positivas nenhuma mudança visível ocorre nessa mistura (RYU, 1938). No teste de Gram por coloração, foi utilizado o Gram Staining Kit (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante. A verificação da presença ou ausência da enzima catalase foi feita pela adição de uma gota de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% em uma porção de colônia bacteriana em uma lâmina de microscopia. A catalase quebra o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podendo ser percebida com a formação de bolhas de gás durante esse processo caracterizando assim a catalase positiva (SCHAAD et al., 2001). No teste de oxidase, foram utilizadas as tiras de oxidase (Laborclin), seguindo o procedimento descrito pela empresa. Para a produção da enzima amilase as bactérias foram cultivadas em meio de amido por 48h. Após o crescimento, adicionou-se solução de lugol sobre as placas, considerando-se como hidrólise positiva a formação de um halo sem coloração ao redor das colônias e a hidrólise negativa, a coloração roxa do iodo em toda placa (SCHAAD et al., 2001). A produção de xanthomonadina foi analisada por espectrofotometria (SCHAAD et al., 2001), utilizando-se, para efeito de comparação, isolados conhecidos por produzirem esse pigmento – *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. As xanthomonadinas possuem um pico em torno de 443nm, com dois ombros em 420 e 467nm (CHUN, 2002; SCHAAD et al., 2001; VAUTERIN et al., 1995). Quanto ao sistema Bactray de diagnóstico, foram utilizados os kits I e II destinados a bactérias Gram negativas de oxidase negativa, seguindo o procedimento descrito pela empresa.

### Resultados e Discussão

Todos os isolados apresentaram resultados negativos para os testes de Gram, oxidase e produção de xanthomonadina, e positivos para catalase e hidrólise de amido, apresentando assim, características correspondentes a este patovar, como descritas na literatura (CHUN, 2002; SCHAAD et al., 2001; VAUTERIN et al., 1995). O gênero *Xanthomonas* tem como característica a produção do pigmento Xanthomonadina, que atribui às espécies uma coloração amarelada. Porém, algumas poucas espécies desse gênero não possuem essa característica, e a Xam é uma delas (DOWSON, 1939 apud CHUN, 2002). No teste, o pico de absorbância a 443nm, e os dois ombros em 420nm e 467nm, foi percebido nos dois isolados de coloração amarela utilizados como controle, *X. axonopodis* pv. *passiflorae* e *X. campestris* pv. *campestris*, e ausente nos isolados de *Xam* estudados, confirmando a falta desse pigmento na espécie.

Nos testes bioquímicos com o uso do Bactray (Tabela 2), houve diferença apenas nos meios



Citrato de Sódio (CIT), Malonato (MAL) e Sacarose (SAC), formando 6 grupos das combinações dessas diferenças, sendo o mais representativo com resultado negativo para os três meios. Algumas características já conhecidas do gênero *Xanthomonas* são: a não produção de Urease e Indol (URE e IND negativos), a não produção de acetoina (VP negativo), produção de ácidos não é a partir de Rhamnose, Adonitol, Inositol e Sorbitol (RHA, ADO, INO e SOR negativos). Mais específico da espécie, características conhecidas da Xam são a ausência de atividade metabólica em L-fenilalanina, Manitol e Rafinose (PD, MAN e RAF negativos) (VAUTERIN et al., 1995). Logo, apenas o resultado VP foi diferente da literatura.

Tabela 2: Caracterização bioquímica de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* pelo sistema Bactray I e II.

Isolados	O N P G	A D H	L D C	O D C	H <sub>2</sub> S	U R E	V P	P D	I N D	C I T	M A L	R H A	A D O	S A C	A R A	I N O	S O R	S A C	M A N	R A F
Xam 1	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 2	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 3	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 4	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 5	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 6	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 7	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 8	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 9	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 10	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 11	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 12	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 13	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 14	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 15	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 16	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 17	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 18	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 19	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 20	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 21	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 22	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 23	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 24	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 25	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 26	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 27	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 28	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 29	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 30	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Xam 31	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-



Xam 32	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 33	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 34	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Xam 35	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

ONPG = o-nitrofenol-beta-d-galacto-piranoside; ADH = Arginina dehidrolase; LCD = Lisina descarboxilase; ODC = Ornitina descarboxilase; H<sub>2</sub>S = Sulfeto de hidrogênio; URE = Urease; VP = produção de acetoína-glicose; PD = L-fenilalanina; IND = Indol; CIT = Citrato de sódio; MAL = Malonato; RHA = Rhamnose; ADO = Adonitol; SAL = Salicina; ARA = Arabinose; INO = Inositol; SOR = Sorbitol; SAC = Sacarose; MAN = Manitol; RAF = Rafinose.

### Conclusões

Todos os isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* avaliados apresentaram características típicas da espécie, com apenas uma diferença bioquímica: produção de acetoína.

### Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica do primeiro e da terceira autora e pelo financiamento do projeto de pesquisa “Seleção e recomendação de variedades de mandioca para obtenção de produtos derivados no Estado do Pará” (02.14.00.018.00.04.002).

### Referências Bibliográficas

- CEBALLOS, L. F. **Descripcion de las enfermedades de la yuca.** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1977.
- CHUN, W. W. C. Xanthomonadins, Unique Yellow Pigments of the Genus Xanthomonas. **Topics in Plant Pathology**, 2002. Disponível em: <<https://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/Xanthomonadins.aspx>>. Acesso em: 28 jul. 2017.
- ISHIDA, A. K. N.; CARDOSO, S. V. D.; ALMEIDA, C. A.; NORONHA, A. C. S.; CUNHA, E. F. M. **Incidência da bacteriose da mandioca (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*) no Estado do Pará.** Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. 22 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 105).
- RYU, E. **On the Gram-Differentiation of Bacteria by the Simplest Method. II. The Caustic Potash Method.** Tokyo: Division of E'izootics, Kitasato Institute for Infectious Diseases, 1938.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.** 3. ed. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 2001.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.