

COLEÇÃO E PRESERVAÇÃO DE CULTURAS DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

THAÍSSA VITORINO DOS ANJOS¹; NILVANIRA DONIZETE TEBALDI²; CILSON
CEZAR FAGIANI³

RESUMO: As bactérias são agentes causais de doenças de plantas de importância agrícola, devido às perdas que causam e seu difícil controle, tornando inviável a exploração econômica de determinadas culturas. Coleções bacterianas tendem a viabilizar a manutenção de culturas de organismos coletados, garantindo a preservação e um possível uso em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos e testes de controle de qualidade de produtos e materiais, além de troca de informações entre centros de pesquisas e instituições de ensino. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo obter um acervo de bactérias a partir da coleta de plantas infectadas pelas mesmas, através do isolamento, caracterização, identificação e preservação. Para a caracterização e identificação dos isolados fitobacterianos foram realizados diferentes testes como a caracterização cultural, cor da colônia, Gram, Oxidação/Fermentação (O/F), cultivo em meios de cultura King B, Kelman e YDC, reação de hipersensibilidade em fumo, podridão em batata, inoculação na planta hospedeira, e teste de exsudação, sendo as mesmas registradas no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da UFU e preservadas em tirinhas de papel e água, para disposição de estudos periódicos. No período de fevereiro de 2009 a julho de 2010 foram caracterizados, identificados e preservados 52 isolados bacterianos de diferentes gêneros: *Dickeya*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Xanthomonas*, de diferentes hospedeiros de importância agrícola, como, repolho, batata, alface, almeirão, milho, mandioca, tomate, couve, cenoura, maracujá, café, pimentão e couve-flor.

Palavras chave: plantas cultiváveis, doenças bacterianas, caracterização cultural e bioquímica.

¹Acadêmica em Agronomia, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia. Rua Iguçu, 1370, Umuarama, Uberlândia, MG, CEP 38.405-328. E-mail: thaissavitorino@gmail.com

²Professora Doutora do Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Amazonas s/n, Bloco 4C 127, Campus Umuarama, CEP 38.400-902. Uberlândia, MG.

³Técnico de Laboratório de Virologia Vegetal do Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Amazonas s/n, Bloco 2E 123, Campus Umuarama, CEP 38400-902. Uberlândia, MG.

ABSTRACT: The bacterial are the most relevant causes agents of plants diseases, because the losses that induces and its difficult control, becoming useless your economics exploration of specifics cultures. Bacterial collections tend make feasible the maintenance by cultures of collected organisms, insure the preservation and a possible use in learn activity, taxonomy studies, identification of pathogens and tests by quality control of products and materials, furthermore changes of information between searches centers and colleges institutions. In fact, this work up to procure a collection of bacterial from the collect of plants infected by themselves, through isolation, description, identification and preservation. For the description and identification of isolated that were made different tests: culture description, color, Gram, oxidation/fermentation (O/F), King B (KB), hypersensitivity reaction in tobacco, rot in potatoes, inoculation in host plant, Kelman culture medium, YDC and exudation tests being them put on files of bacterial laboratory collection, from the ICIAG UFU and preserves in pieces of papers and water, to available them to periodic studies. Between February 2009 to july 2010 were related, identified and preserved 52 bacterial isolates from different generous: *Dickeya*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* and *Xanthomonas*, by different hosts of relevance agricultural.

Keywords: cultivable plants, bacterial diseases, nutritional and biochemistry characterization.

INTRODUÇÃO

As bactérias constituem importantes patógenos de plantas, quer pela gravidade das enfermidades que incitam em culturas exploradas economicamente, quer pela facilidade com que se disseminam, quer pelas dificuldades encontradas no seu controle (Romeiro, 2005). Em regiões de ambiente favorável, a ocorrência de certas bacterioses de plantas pode condicionar ou inviabilizar a exploração econômica de determinadas culturas agrícolas. Nos Estados Unidos grandes prejuízos em bilhões de dólares foram causados por algumas bactérias fitopatogênicas (Romeiro, 2005).

O Brasil possui características de dimensões continentais com diversos tipos de clima e solo, com uma quantidade imensa de plantas cultivadas, tanto agrônomicas como olerícolas, frutíferas, ornamentais e essências florestais. Existem também milhares de espécies selvagens e ervas daninhas, todas são potenciais hospedeiros para bactérias fitopatogênicas. Muitas dessas doenças ocorrem sem serem identificadas e para afirmar que uma determinada bactéria infecta uma determinada planta, é necessário à existência de um registro escrito ou publicado, por isso a identificação e descrição das doenças incitadas pelas fitobactérias devem ser realizadas para ampliar o conhecimento da coleção de culturas de fitobactérias no Brasil (Romeiro, 2005).

As bactérias fitopatogênicas quando preservadas em coleções de cultura apresentam grande importância devido sua diversidade genética e a interação com plantas hospedeiras, tornando possível o intercâmbio nacional e internacional de material biológico de importância agrícola com fins de pesquisa científica e sua utilização a qualquer momento (Romeiro, 2001).

Coleções de culturas são centros de conservação que tem a função de coletar organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, tornando-os disponíveis para usuários interessados. A maneira mais eficiente de conservar microrganismos de importância econômica é a preservação em coleções. A preservação e manutenção das culturas devem ser feitas de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, conservando características genéticas e propriedades morfo/fisiológicas (Abreu & Tutunji, 2004).

Entre as várias formas de armazenar o patrimônio genético é possível descrever duas categorias: a preservação *in situ* (no local de origem) e a preservação *ex situ* (fora do local de origem).

A importância da conservação *ex-situ* de recursos genéticos microbianos, vegetais e animais já é reconhecida como sendo uma prática indispensável ao desenvolvimento da ciência e tecnologia em diversos setores de importância sócio-econômica. Assim como da necessidade de se poder dispor do microrganismo a qualquer momento, quer para fins experimentais, quer para trabalhos de rotina ou para atendimento a solicitações de outros pesquisadores, para fins didáticos, para estudos comparativos, etc. (Gerhardt, 1994).

Microrganismos e material biológico têm sido historicamente preservados e distribuídos por coleções de culturas de microrganismos. Os diferentes tipos de coleções sejam elas de trabalho, institucionais ou de serviço, têm uma importância destacada na conservação e exploração da diversidade genética e metabólica de microrganismos, com a finalidade de pesquisa e desenvolvimento (Canhos, 2003).

As coleções biológicas são essenciais para o suporte ao desenvolvimento da biotecnologia, provendo insumos, material biológico certificado e informações associadas, funcionando como centros de conservação da biodiversidade e de material genético. Os centros de recursos biológicos são responsáveis pela aquisição, caracterização, autenticação, preservação e distribuição de material biológico com conformidade assegurada (Abreu & Tutunji, 2004).

Países em desenvolvimento ainda não perceberam a importância de desenvolver *know-how* para bioprospecção, conservação e uso da diversidade microbiana. A compreensão do papel de microrganismos no meio ambiente fornece subsídios para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas, além de ser fundamental no estabelecimento de políticas de biossegurança, de projetos em agricultura sustentável e de programas de desenvolvimento industrial (Canhos, 1994).

Em uma coleção de culturas deve-se preservar, manter e distribuir linhagens de microrganismos com suas características originais, o que viabiliza sua utilização a curto, médio e longo prazo e o fornecimento deste material para o desenvolvimento de técnicas e métodos em biotecnologia. Para tanto, é necessário um estudo sobre a biologia dos microrganismos, bem como testes sobre os melhores métodos de preservação. Os resultados desse tipo de pesquisa podem ser catalogados juntamente com a coleção de culturas, podendo assim ser consultados para pesquisas posteriores sobre a aplicação biotecnológica dos microrganismos e permitir intercâmbio entre universidades e institutos de pesquisa, além de oferecer material para aulas práticas de diversas disciplinas (Rodrigues et al., 1999).

Além da aquisição, manutenção e distribuição de material biológico, as coleções de culturas microbianas podem oferecer uma variedade de serviços com o objetivo de atender as

necessidades das comunidades científicas e industriais, como por exemplo, identificação de microrganismos, depósito em diferentes categorias (público, confidencial, para fins legais e para fins de patentes), programas de pesquisa, consultoria, cursos e treinamentos. Várias coleções de culturas encontram-se estocadas em bacteriotecas distribuídas pelo mundo, com a função primordial de preservar as características genéticas e morfofisiológicas de coleções microbianas (Silva, 1990).

Culturas puras obtidas de coleções de referência são utilizadas em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos e testes de controle de qualidade de produtos e materiais (Canhos et al., 2000).

De acordo com Oliveira et al. (2006) as estratégias tradicionais de isolamento e seleção de microrganismos têm garantido o desenvolvimento de novos fármacos e aplicações nas áreas de saúde, agricultura, indústria e meio ambiente. Nos últimos anos, novas abordagens de trabalho, envolvendo metodologias de bioinformática e biologia molecular, vêm permitindo a prospecção de informações a partir de dados genômicos em bases de dados e a análise de microrganismos sem a necessidade de isolamento e cultivo, a partir da clonagem direta de DNA de amostras ambientais (metagenoma). A devida caracterização e preservação dos recursos microbianos são fatores fundamentais para o desenvolvimento da bioeconomia no século 21. Neste contexto, as coleções biológicas ou centros de recursos biológicos desempenham papel relevante como centros de conservação da biodiversidade e são responsáveis pela aquisição, caracterização, autenticação, preservação e distribuição de material biológico com conformidade assegurada.

A primeira coleção que se tem registro é a Coleção Kral, estabelecida em Praga, em 1890, com a finalidade de fornecer culturas puras para estudos comparativos e identificação de bactérias patogênicas. No início do século 20, outras coleções foram estabelecidas na Europa, Estados Unidos e Japão, com a finalidade básica de conservar e fornecer material de referência para estudos taxonômicos. Estas coleções passaram por um contínuo processo de evolução, visando atender demandas especializadas decorrentes dos avanços na microbiologia industrial (década de 1960), biotecnologia (década de 1980) e engenharia genética e genômica (década de 1990) (Canhos, 2003).

No setor da agricultura, o conhecimento sobre a diversidade de organismos diretamente relacionados à fertilização biológica de solos encontra-se em estágio avançado, em decorrência dos esforços da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). A Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas da Embrapa-Agrobiologia possui um acervo valioso que inclui linhagens relevantes para a elucidação dos mecanismos de fixação

biológica de nitrogênio e suas aplicações tecnológicas. A coleção registra informações taxonômicas, ecológicas e fisiológicas sobre as linhagens do acervo (Canhos, 2003).

A Coleção de Culturas de Fitobactérias, do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto Biológico de São Paulo (IBSBF), mantém um acervo de mais de 1600 linhagens de bactérias fitopatogênicas, incluindo cerca de 40 linhagens tipo e 50 linhagens de referência, acondicionada em ampolas de vidros e preservada através do método de liofilização. A maior parte do acervo está constituída por linhagens nacionais, isto é, isoladas a partir de material vegetal coletado em território nacional, principalmente em áreas do Estado de São Paulo, e identificadas pelos pesquisadores da equipe do Laboratório de Bacteriologia Vegetal. Em termos mundiais, esta coleção representa a maior fonte de linhagens bacterianas fitopatogênicas oriunda de áreas tropicais e é mantida a cerca de 30 anos (Sicol, 2009, Instituto Biológico, 2008).

O Programa de Biotecnologia e Recursos Genéticos do Ministério da Ciência e Tecnologia (Mct, 2002) visa à consolidação de uma rede de centros de serviços com coleções abrangentes e permanentes nas áreas de saúde, agricultura, meio ambiente e indústria e a certificação de material biológico usado na biotecnologia.

O Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (Sicol, 2009) surgiu devido ao Programa Nacional de Biotecnologia e Recursos Genéticos do Ministério da Ciência e Tecnologia e tem por objetivo, além de disseminar informações sobre os Centros de Recursos Biológicos do Brasil, servir de elemento integrador às diversas e diferenciadas coleções de interesse biotecnológico (Cria, 2009). O Sicol reúne informações de 17 coleções de culturas em um sistema de informação *on-line* através do qual o usuário pode localizar linhagens de microrganismos, e cruzar dados taxonômicos, dados de literatura científica (SciELO e PubMed) e informações de genomas (GenBank), agregando valor ao material biológico das coleções brasileiras. No Brasil, há ainda muito a ser desenvolvido e preservado, devido à ampla biodiversidade dos ecossistemas.

Um bom método de preservação de bactérias fitopatogênicas deve ser simples, não requerer equipamento sofisticado, apresentar baixo custo, rapidez de execução e, obviamente, elevado grau de eficiência (Romeiro, 2001).

Sendo assim, o objetivo do trabalho consiste na coleta de plantas infectadas por bactérias, o isolamento, a caracterização, a identificação, a preservação e a criação de uma coleção de fitobactérias com a aplicação da biotecnologia para fins agrônômicos e material didático, além de troca de informações entre centros de pesquisas e instituições de ensino.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolamento, identificação e preservação dos isolados bacterianos foi realizado no partir de plantas com sintomas de doenças bacterianas, no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da UFU, no período de fevereiro de 2009 a julho de 2010.

Coleta

As coletas foram realizadas em hortas, jardins, fazendas, campos de produção, de plantas com sintomas de doenças bacterianas, ou então recebidas pelo Laboratório de Bacteriologia Vegetal provenientes de produtores agrícolas com o propósito de análises e identificação de fitobactérias, ou mesmo de isolados bacterianos provenientes de outros laboratórios.

Isolamento

A partir do teste de exsudação em gota para a confirmação da presença da bactéria, foi feito o isolamento bacteriano de plantas que apresentavam sintomas de doenças bacterianas. Corte de tecidos vegetais (0,5 x 0,5) foram descontaminados em álcool 50% por 30 segundos e posteriormente com hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos, seguindo com uma lavagem de água estéril, macerados com bastão de vidro e plaqueados em meio de cultura usando o auxílio de uma alça de platina.

Cultivo do isolado

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio de cultura 523 (Kado & Heskett, 1970) contendo: 10 g de sacarose, 8 g de caseína hidrolisada, 4 g de extrato de levedura, 2 g de K_2HPO_4 , 0,3g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g de ágar e 1 L de água destilada.

Identificação e caracterização

Os isolados obtidos foram identificados e caracterizados pelos testes descritos abaixo.

Caracterização morfológica

Para o teste de Gram foi utilizada uma solução de KOH 3%. Em uma lâmina de microscópio foi colocada uma porção da colônia bacteriana com 24 horas de crescimento, que foi misturada com algumas gotas de KOH 3%, com o auxílio de alça de platina. Para bactérias

Gram-negativas ocorre um aumento da viscosidade da solução e para as Gram-positivas não há formação da viscosidade.

Caracterização cultural

Em placas de Petri foram observadas as características culturais das colônias quanto ao tamanho, forma, bordos, elevação, tamanho, textura e pigmentação.

Caracterização fisiológica, nutricional e bioquímica.

A partir das exigências nutricionais de cada isolado em relação aos reagentes disponíveis no laboratório, os isolados foram caracterizados pelos testes de: oxidação/fermentação (O/F), YDC, arginina, asparagina, King B, Kelman, produção de ácidos a partir de fontes de açúcares e utilização de carboidratos (Mariano & Silveira, 2005).

Teste de reação de hipersensibilidade (RH)

Suspensão bacteriana dos diferentes isolados foi inoculada em plantas de fumo para a detecção rápida de patogenicidade dos isolados.

Testes de patogenicidade

Para a identificação de bactérias fitopatogênicas a suspensão bacteriana dos isolados foram inoculados nas respectivas plantas hospedeiras.

Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas

A preservação dos isolados bacterianos foi feita de acordo com a metodologia descrita por Romeiro (2001).

Preservação em água

Para a preservação em água dos isolados bacterianos utilizou-se tubos do tipo “eppendorf”, identificados, contendo 1 mL de água destilada estéril, no qual foi colocado a massa bacteriana com auxílio de uma alça de repicagem flambada com álcool, seguido da homogeneização da suspensão. Os tubos foram vedados com parafilme e armazenados na geladeira a 4 °C.

Preservação por dessecação em tirinhas de papel de filtro

Em placas de Petri contendo abundante massa bacteriana adicionou-se, por placa, 0,5 mL de peptona 5% + gelatina 3% e 0,5 mL de dextrose 8%, raspando o conteúdo com alça de Drigawsky flambada com álcool, vertendo-o sobre tirinhas de papel de filtro de 5x30 mm previamente esterilizadas. As tirinhas, embebidas da suspensão foram colocadas sobre suporte de vidro (esterilizado) em placas de Petri, contendo sílica-gel e papel de filtro esterilizado. As placas foram colocadas em dessecador por aproximadamente 20 dias e após esse período, as tirinhas foram acondicionadas em tubos tipo “ependorf”, os quais foram vedados e armazenados na geladeira a 4 °C.

Manutenção da coleção

A coleção foi mantida constantemente através da repicagem dos isolados preservados.

Catálogo dos isolados

Todos os isolados foram identificados no livro de registro de amostra, no qual consta a data, o número e o ano do isolamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 52 isolados bacterianos, descritos na Tabela 1, na qual consta a identificação do isolado, o hospedeiro, parte da planta de onde foi feito o isolamento, o local de origem da amostra e a bactéria identificada. Na identificação dos isolados as letras A e B referem-se aos isolamentos realizados nos anos de 2009 e 2010, respectivamente. As bactérias dos gêneros: *Dickeya*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Xanthomonas*, foram identificadas em diferentes hospedeiros como: repolho, batata, alface, almeirão, milho, mandioca, tomate, couve, cenoura, maracujá, café, pimentão e couve-flor.

Devido à proposta taxonômica mais moderna houve uma reclassificação de alguns gêneros de fitobactérias

As bactérias do gênero *Erwinia* capazes de produzir enzimas pectolíticas passaram foram reclassificação e denominadas de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*E. carotovora* subsp. *carotovora*), *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (*E. carotovora* subsp. *atroseptica*), *Dickeya chrysanthemi* (*P. chrysanthemi*, *E. chrysanthemi*) (Hauben et al., 1998, Samson et al. 2005).

A mancha bacteriana do tomateiro causada por *Xanthomonas* spp., devido sua grande variabilidade genética foi reclassificada em grupos geneticamente distintos: *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardineri* e *Xanthomonas perforans* (Jones et al., 2000, Jones et al., 2004). Mergaert et al., 1993 propuseram a transferência do nome de *Erwinia ananas* para o *Pantoea ananas* e Truper e Clari, 1997 sugeriram o nome *Pantoea ananatis*.

Os isolados de *Pectobacterium* não foram classificados em nível de espécie e subespécie, devido à ausência de reagentes no laboratório para a realização de testes bioquímicos.

Na Tabela 2 está descrito a caracterização cultural, morfológica, fisiológica e bioquímica (Gram, O/F, King B, meio Kelman, asparagina, arginina e YDC), assim como teste de exsudação, reação de hipersensibilidade (RH) em fumo, podridão em batata e os resultados da inoculação em plantas hospedeiras, para a identificação dos diferentes isolados bacterianos.

Tabela1. Bactérias identificadas no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, provenientes de diferentes hospedeiros e origem, no período de fevereiro de 2009 a julho de 2010. Uberlândia, MG, 2010.

Isolado	Hospedeiro	Parte da planta	Origem da amostra	Bactéria
UFU A4	Repolho	Folha	Uberlândia, MG	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
UFU A5	Batata	Caule, Tubérculo	Araxá, MG	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU A6	Batata	Tubérculo	Uberlândia, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A7	Alface	Folha	Uberlândia, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A9	Batata	Caule	Santa Juliana, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A10	Almeirão	Folha	Uberlândia, MG	<i>Pseudomonas cichorii</i>
UFU A11	Batata	Tubérculo	Uberlândia, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.

UFU A12	Batata	Tubérculo	Santa Juliana, MG	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU A13	Milho	Folha	Indianópolis, MG	<i>Pantoea ananatis</i>
UFU A14	Batata	Tubérculo	Uberlândia, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A16	Milho	Colmo	MG	<i>Dickeya zea</i>
UFU A18	Milho	Folha	Morrinhos, GO	<i>Pantoea ananatis</i>
UFU A20	Batata	Tubérculo	Santa Juliana, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A21	Batata	Tubérculo	Uberlândia, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A22	Batata	Tubérculo	Uberlândia, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A26	Milho	Colmo	Morrinhos, GO	<i>Dickeya zea</i>
UFU A27	Mandioca	Raiz	Ipiaçu, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A28	Batata	Caule	Uberlândia, MG	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU A29	Couve	Folha	Uberlândia, MG	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
UFU A33	Alface	Folha	Uberlândia, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A35	Tomate	Fruto, Folha	Araguari, MG	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU A37	Tomate	Caule, Folha	Uberlândia, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A39	Batata	Tubérculo	Tapira, MG	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU A40	Batata	Tubérculo	Araxá, MG	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU A45	Maracujá	Folha	Tupaciguara, MG	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>
UFU A46	Couve	Talo	Uberlândia, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A47	Batata	Tubérculo	Santa Juliana, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A48	Batata	Tubérculo	Araxá, MG	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU A52	Milho	Colo	Uberaba, MG	<i>Dickeya. zea</i>
UFU B1	Tomate	Folha	ES	<i>Xanthomonas</i> spp.

UFU B3	Tomate	Folha	ES	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B4	Tomate	Folha	ES	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B5	Tomate	Folha	ES	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B6	Batata	Tubérculo	Araxá, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU B7	Repolho	Folha	Uberlândia, MG	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
UFU B8	Tomate	Folha	Uberlândia, MG	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B9	Tomate	Folha	Uberlândia, MG	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B13	Milho	Folha	Planaltina de Goiás, GO	<i>Pantoea ananatis</i>
UFU B19	Maracujá	Folha	Tiros, MG	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>
UFU B22	Repolho	Folha	São Gotardo, MG	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
UFU B24	Café	Folha	São Gotardo, MG	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFU B25	Cenoura	Folha	São Gotardo, MG	<i>Xanthomonas hortarum</i> pv. <i>carotae</i>
UFU B26	Maracujá	Folha	São Gotardo, MG	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>
UFU B27	Tomate	Folha	São Gotardo, MG	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B28	Batata	Caule, Tubérculo	Araxá, MG	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU B29	Batata	Tubérculo	São Gotardo, MG	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU B33	Tomate	Folha	Onça do Pitangui, MG	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
UFU B34	Pepino	Cultura bacteriana	Mateus Leme, MG	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lacrymans</i>
UFU B36	Pimentão	Cultura bacteriana	Bragança Paulista, SP	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B38	Tomate	Cultura	Bragança	<i>Pseudomonas syringae</i> pv.

		bacteriana	Paulista-SP	<i>tomato</i>
UFU B39	Tomate	Cultura bacteriana	Santa Cruz do Rio Pardo, SP	<i>Pseudomonas corrugata</i>
UFU B40	Couve-flor	Cultura bacteriana	Piracicaba, SP	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>

Tabela 2. Caracterização cultural, morfológica, fisiológica, bioquímica e identificação de bactérias fitopatogênicas. Uberlândia, MG, 2010.

Isolado	Características culturais	Cor	Gram	O/F	KB	RH (Fumo)	Batata	Planta Hospedeira	Outros	Bactéria
UFU A4	Convexa, borda lisa, circular.	Amarela	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
UFU A5	Brilhante, convexa.	Branca	-	O	NR	+	NR	NR	Exsudação + e Kelman +	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU A6	Circular, convexa, borda lisa.	Branca	-	F	NR	+	+	NR	NR	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A7	Circular, convexa, borda lisa.	Branca	-	F	NR	+	+	NR	NR	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A9	Circular, convexa, borda lisa.	Branca	-	F	NR	+	+	NR	Exsudação +	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A10	2 mm de diâmetro, circular	Palha	-	NR	NR	+	-	NR	NR	<i>Pseudomonas cichorii</i>
UFU A11	Circular, convexa, borda lisa.	Branca	-	F	NR	+	+	NR	NR	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A12	Circular, convexa, borda lisa.	Branca	-	F	NR	+	+	NR	NR	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU A13	Circular, convexa,	Palha	-	F	NR	+	NR	NR	NR	<i>Pantoea ananatis</i>

	borda lisa.									
UFU A14	Circular, convexa, borda lisa, 4 mm de diâmetro.	Palha	-	F	-	+	+	+	YDC -	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A16	Circular, convexa, borda lisa, brilhante.	Palha	-	F	NR	-	+	NR	NR	<i>Dickeya zea</i>
UFU A18	Circular, liso, elevada, 5 mm de diâmetro.	Amarela	-	F	-	-	NR	+	YDC amarelo	<i>Pantoea ananatis</i>
UFU A20	Circular, convexa, borda lisa.	Branca	-	F	NR	+	+	NR	NR	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A21	Circular, convexa, borda lisa.	Branca	-	F	NR	+	+	NR	NR	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A22	Circular, convexa, borda lisa.	Branca	-	F	NR	+	+	NR	NR	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A26	Circular, convexa, borda lisa e opaca.	NR	-	F	-	+	+	+	YDC -	<i>Dickeya zea</i>
UFU A27	Circular, convexa, borda lisa.	Creme	NR	F	-	+	+	+	YDC -	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A28	Circular, convexa, borda ondulado.	Creme	-	O	-	+	-	+	YDC -	<i>Ralstonia solanacearum</i>

UFU A29	Circular, textura lisa.	Amarela	-	O	-	+	-	+	YDC amarelo	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
UFU A33	Circular, convexa, borda lisa.	Creme	-	F	-	+	+	+	YDC -	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A35	Circular, convexa, borda lisa, opaca.	Amarelo	-	O	-	+	-	+	YDC -	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU A37	Circular, convexa, borda lisa.	Creme	-	F	-	+	+	+	YDC -	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A39	Circular e borda lisa.	Palha	-	O	NR	NR	NR	NR	HR girassol+ Kelman+ asparagina+ arginina -	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU A40	Circular e borda lisa.	Palha	-	O	NR	NR	NR	NR	HR girassol+ Kelman+ asparagina+ arginina -	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU A45	Circular, convexa, borda lisa.	Amarela	-	NR	NR	NR	NR	NR	YDC amarelo	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>
UFU A46	Circular, convexa, borda lisa.	Branca	-	NR	NR	NR	+	NR	NR	<i>Pectobacterium</i> sp.

UFU A47	Circular, convexa, borda lisa.	Creme	-	F	NR	-	+	NR	NR	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU A48	Circular, elevada, borda lisa.	Branca	NR	O	NR	NR	-	NR	NR	<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i> .
UFU A52	Circular, convexa, borda lisa.	Creme	-	F	NR	+	+	NR	NR	<i>Dickeya zea</i>
UFU B1	Circular, convexa, borda lisa.	Amarela	-	O	NR	-	NR	NR	Amarelo	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B3	Circular, convexa, borda lisa.	Amarela	-	O	NR	-	NR	NR	Amarelo	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B4	Circular, convexa, borda lisa.	Amarela	-	O	NR	-	NR	NR	Amarelo	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B5	Circular, convexa, borda lisa.	Amarela	-	O	NR	-	NR	NR	Amarelo	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B6	Circular, convexa, borda lisa.	Palha	-	F	NR	-	+	NR	NR	<i>Pectobacterium</i> sp.
UFU B7	Circular, convexa, borda lisa.	Amarela	-	O	NR	-	NR	NR	Amarelo	<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>campestris</i>
UFU B8	Circular, convexa, borda lisa.	Palha	-	O	NR	+	NR	NR	Amarelo	<i>Xanthomonas</i> spp.

UFU B9	Circular, convexa, borda lisa.	Palha	-	O	NR	-	NR	NR	Amarelo	<i>Xanthomonas</i> spp..
UFU B13	Circular, convexa, borda lisa.	Amarela	-	F	NR	NR	NR	NR	Laranja	<i>Pantoea ananatis</i>
UFU B19	Circular, convexa, borda lisa.	Amarela	-	NR	NR	NR	NR	NR	Amarelo	<i>Xanthomonas</i> <i>axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>
UFU B22	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>campestris</i>
UFU B24	Circular, convexa, borda lisa.	Branca	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFU B25	Circular, convexa, borda lisa.	Amarela	-	NR	NR	NR	NR	NR	Amarelo	<i>Xanthomonas</i> <i>hortarum</i> pv. <i>carotae</i>
UFU B26	Circular, convexa, borda lisa.	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Xanthomonas</i> <i>axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>
UFU B27	Circular, convexa, borda lisa.	Amarela	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Xanthomonas</i> sp.
UFU B28	Circular, convexa, borda lisa.	Palha	-	F	NR	NR	+	NR	NR	<i>Pectobacterium</i> sp.

UFU B29	Circular, convexa, borda lisa e brilhante.	Branca	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Ralstonia solanacearum</i>
UFU B33	Circular, convexa, borda lisa e opaca.	Amarela	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>
UFU B34	NR	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lacrymans</i>
UFU B36	Circular, convexa, borda lisa e translúcida.	Amarela	-	NR	NR	NR	NR	NR	Amarelo	<i>Xanthomonas</i> spp.
UFU B38	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
UFU B39	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Pseudomonas corrugata</i>
UFU B40	NR	Amarela	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>

NR: Não Realizado o teste; - Negativo; +Positivo.

Os isolados bacterianos foram preservados e mantidos em coleção, de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, através de métodos de preservação. A coleção poderá manter o acervo de linhagens associadas a estudos de campo e em interações com pesquisadores.

As atividades de rotina e pesquisa com linhagens do acervo resultarão em uma quantidade significativa de informações de cunho científico e tecnológico. A disponibilização de dados de caracterização taxonômica e tecnológica de linhagens da coleção favorecerá e facilitará a busca de organismos para aplicações específicas, bem como contribuir para o melhor conhecimento dos organismos em si próprios.

A disponibilização de um acervo microbiológico significativo permite expandir o uso de recursos microbianos, para um melhor entendimento das interações patógenos-hospedeiros, fornecendo ferramentas para o controle de doenças bacterianas de plantas.

CONCLUSÃO

Foram caracterizados, identificados e preservados 52 isolados bacterianos de diferentes gêneros: *Dickeya*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Xanthomonas*, de diferentes hospedeiros como: repolho, batata, alface, almeirão, milho, mandioca, tomate, couve, cenoura, maracujá, café, pimentão e couve-flor, e mantidos em coleção no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia, para acesso de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.M.V., TUTUNJI, V.L. Implantação e manutenção da coleção de cultura de microrganismos do UniCEUB. *Universitas Ciência da Saúde*, v.2, n.2, p. 236-251, 2004. Disponível em: <http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/viewFile/535/356>. Acesso em 20 out. 2008.

CABRI, Common Access to Biological Resources Information. Disponível em: <<http://www.cabri.org>>. Acesso em 12 jul. 2010.

CANHOS, V.P., MANFIO, G. P. Microbial resource centres and ex-situ conservation. In: PRIEST, F.G., GOODFELLOW M (Ed.). Applied Microbial Systematics. Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 421-446.

CANHOS, V. P. Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica. Ciência e Cultura, v. 55, n. 3, p. 27-29, 2003. Disponível em: <http://www.cria.org.br/cgee/documentos/centros_de_recursos_biologicos.doc>. Acesso em: 16 out. 2008.

CANHOS, V.P. Views of a developing country. In: KIRSOP, B., HAWKSWORTH, D.L. (Eds.). The biodiversity of microorganisms and the role of microbial resource centers. World Federation for Culture Collections, 1994. p. 45-52.

CRIA. Centro de Referência em Informação Ambiental. Disponível em: <<http://www.cria.org.br/projetos>>. Acesso em: 09 abr. 2009.

GERHARDT, P.E. Methods for general and molecular bacteriology. Washington: American Society for Microbiology, 1994. 791p.

HAUBEN, L., MOORE, E.R.B., VAUTERIN, L., STEENACKERS, M., MERGAERT, J., VERDONCK, L., SWINGS, J. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. Systematic of Applied Microbiology, v.21, p.384-397, 1998.

INSTITUTO BIOLÓGICO. Coleção de culturas do laboratório de bacteriologia vegetal IBSBF. Disponível em: <<http://www.cria.org.br/ibsf>>. Acesso em 17 out. 2008.

JONES, J.B., BOUZAR, H., STALL, R.E., ALMIRA, E.C., ROBERTS, P.D., BOWEN, B.W., SUDBERRY, J., STRICKLER, P.M., CHUN, J. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v.50, p.1211-1219, 2000.

JONES, J.B., LACY, G.H; BOUZAR, H., STALL, R.E., SCHAAD, N.W. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic of Applied Microbiology*, v.27, p.755-762, 2004.

KADO C.I., HESKETT M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, v.60, p.969-976, 1970.

MARIANO, L.R., SILVEIRA, E.B. Manual de práticas de fitobacteriologia. 2 ed. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2005. 184p.

MCT. Ministério da Ciência e Tecnologia. Programa de Biotecnologia e Recursos Genéticos – Definição de Metas. Ministério da Ciência e Tecnologia. Brasília, DF. MCT, SEPCT, CGBI, 2002. 47 p.

MERGAERT, J., VERDONCK, L., KERSTERS, K. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb, nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.43, n.1, p. 162-173, 1993.

OCDE, Biological Resource Centers: underpinning the future of life sciences and biotechnology. Paris: 2001. 66 p. Disponível em: <http://puck.sourceoecd.org/vl=32085351/cl=14/nw=1/rpsv/~6681/v2001n7/s1/p11>. Acesso em 12 jul. 2010.

OLIVEIRA, V.M., SETTE, L.D., GARBOGGINI, F.F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. Revista Multicientífica, 2006. Disponível em: <<http://www.multiciencia.unicam.br/artigos>>. Acesso em 27 jun. 2009.

RODRIGUES, E., SERRA, A.L., FONSECA, M.P., COSTA, E., SILVA, A.R., DOMINGUES, A., CRUZ, A., BEDOLO, E.C., TOMÉ, R.R., PEREIRA, R.L. Coleção de cultura de microorganismos de interesse biotecnológico e didático. EccoS Revista Científica, UNINOVE, São Paulo: v.1, p.109-114, 1999.

ROMEIRO, R.S. Bactérias fitopatogênicas. Viçosa: Imprensa Universitária/UFV, 2005. 417p.

ROMEIRO, R.S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, 2001. 279p.

SAMSON, R., LEGENDRE, J.B., CRISTEN, R., SAUX, M. F., ACHOUAK, W., GARDAN, L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiacal* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 5, p.1415-1427, 2005.

SICOL – Sistema de Informação sobre Coleções de Interesse Biotecnológico. Coleção de Culturas de Fitobactérias do Laboratório de Bacteriologia Vegetal. Disponível em: <<http://sicol.cria.org.br/crb?IBSBF>>. Acesso em: 09 abr. 2009.

SILVA, L. F. Comparação de métodos de preservação de leveduras de interesse industrial. São Paulo. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 1990. 151p.

TRUPER, H., CLARI, L. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (Nouns) “in apposition”. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, n.3, p. 908-909, 1997.