UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E SUBSÍDIOS PARA O CONTROLE DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, AGENTE DO CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA (*Vitis vinifera* L.) NO BRASIL.

JOÃO SEBASTIÃO DE PAULA ARAUJO

Autor

Junho de 2001

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E SUBSÍDIOS PARA O CONTROLE DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, AGENTE DO CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA (*Vitis vinifera* L.) NO BRASIL.

João Sebastião de Paula Araujo

Autor

Tese aprovada em 29 de Junho de 2001.

Prof. Charles Frederick Robbs
Orientador
Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro

Prof.Raul de Lucena Duarte Ribeiro
Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro

Prof.Reginaldo da Silva Romeiro
Univ. Fed. de Viçosa-MG

Profa. Margarida Goréte F. do Carmo
Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro

Prof. Fábio Lopes Olivares
Univ. Est. do Norte Fluminense-RJ

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E SUBSÍDIOS PARA O CONTROLE DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, AGENTE DO CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA (*Vitis vinifera* L.) NO BRASIL.

JOÃO SEBASTIÃO DE PAULA ARAUJO, 1964 -

Autor

PROF. CHARLES FREDERICK ROBBS

Orientador

Tese submetida como requesito parcial para obtenção do grau de *Philosophiae Doctor* em Fitotecnia, área de concentração em Fitossanidade.

634.32
A663p
1

Seropédica, Rio de Janeiro

Junho de 2001

DOAÇÃO
Origem
EM. 29/01/002

U.F.R.R.J. - BIBLIOTECA CENTRAL
N.º REGISTRO
43
EM: 29/01/002
RM:

AC 12 1998
25914

RU-00012994-1

Araujo, João Sebastião de Paula, 1969 -.
Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera* L.) no Brasil / João Sebastião de Paula Araujo – Seropédica, 2001
XVII, 125f. il. (color.)
Inclui bibliografia

Orientador: Charles Frederick Robbs

1. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. 2. *Vitis vinifera*. 3. Grapevine bacterial canker. I. Robbs, Charles Frederick, II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. III. Título.

634.8232
A633p
T

*Aos meus pais **João & Terezinha**, por tanto amor recebido;*

*Ao prof. **Charles Robbs**, pelo legado e privilégio dos ensinamentos;*

*Ao eterno mestre **Osamu Kimura**;*

*Ao prof. **Fujio Akiba**, maior incentivador; e*

*Ao prof. **Raul Lucena**, meu ídolo,*

Dedico.

É paradoxal ser titulado "doutor",

justamente quando minha única certeza é a de que tenho muito...

mas muito mesmo... a aprender!

Agradecimentos

À Deus, pela vida feliz;

Aos meus irmãos Raimundo, Márcia, Cláudia e Tereza, com os quais partilho mais essa conquista para nossa família; aos cunhados Quinho, Cláudio, Rose e demais parentes, que tanto me ajudam e tornam a família mais forte e unida;

Aos sobrinhos-filhos Larissa, João Pedro, Monique – por me fazerem criança novamente;

À Adriane, pelo amor, apoio, compreensão e incentivo em momentos difíceis;

Ao Ângelo Márcio – meu irmão e meu companheiro mais freqüente - pela amizade, convivência prazerosa, compreensão, apoio e incentivos constantes;

À Mariângela Guajará – meu referencial de valores e minha professora, por tanta generosidade, amor, amizade, companheirismo e pelas muitas caminhadas que ainda faremos juntos. Obrigado irmã!;

Ao Raul Lucena – unânime expoente da Rural, mais que professor, é pai, companheiro e amigo. Quando crescer quero ser igual a você!;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, nos seus 90 anos de existência, pelo orgulho e privilégio de ser minha casa, ... meu lugar;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense, na pessoa do Prof. Fábio Olivares, pela fundamental colaboração e ensinamentos em microscopia ;

À Embrapa Agrobiologia pela colaboração nos ensaios imunológicos;

À Embrapa CTAA, especialmente Dra. Ana Bittencourt, por todo auxílio;

Ao povo brasileiro, que custeou parte dos meus estudos, do primário ao doutorado;

Ao amigo Fábio Bueno, por toda ajuda na caracterização dos antisoros, amizade e empenho na realização do trabalho;

Ao meu amigo Geraldo Baeta (Embrapa-Agrobiologia), técnico ambicionado por qualquer Centro de Pesquisa. Se todos fossem iguais a você...;

Ao Marcelo Castilho - companheiro e amigo de todas as horas, por vestir a camisa da Fitopatologia e ajudar-me na realização desse trabalho;

Ao Prof. Aldir – colega, companheiro e amigo, pelos ensinamentos e incentivos ao meu crescimento profissional;

Aos ilustres professores da Banca Examinadora, pelos ensinamentos;

Ao Naldo - feliz descoberta em momento tão difícil, pela presteza e fundamental colaboração para o sucesso na apresentação desse trabalho;

Aos meus alunos e estagiários Macagnan, Téo, Patrícia, Aninha, Verônica, Adriana, Marcus Vinícius; Débora, Rodrigo, Karin, Bira, Cláudio, Vander. Difícil tarefa essa de servir-lhes de exemplo;

À Terezinha, pelo excelente trabalho enquanto diretora da nossa biblioteca, pela ajuda nas minhas pesquisas, mas principalmente por ser uma grande amiga;

Ao prof.José Paulo, Sônia, Camila, Dilma e Dona Flôr (minha família da Zona Oeste), pelas orações, amizade e, é claro, pelas peixadas;

Thaís, Regina e Miriam, pela amizade incondicional, carinho e momentos felizes compartilhados;

À Marta, pelos incentivos no início dessa caminhada, pelos momentos de prazer e companhia, carinho e por cruzar meu caminho;

À minha querida tia Rita (*in memorian*) - exemplo de vida fraterna e dedicação à toda família Araújo e; aos demais tios e primos;

À Dona Haydêe Robbs, pelo carinho maternal, simpatia e incentivos;

À Tatiana, pelo apoio, respeito, admiração e pelos momentos felizes;

Ao Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, em especial ao Jairo, pela dedicação e todo auxílio aos pós-graduandos;

Aos funcionários da Fitopatologia, Ari, Silvandira, Tião (*in memorian*), Dina, Antônio e Marquinho, por zelarem pelo "nosso campus" ao longo dos anos;

Ao Luíz Aguiar, pelo auxílio e também por fazer parte da família Fitopatologia;

À Cláudia Mognato, minha gratidão pelo amor ofertado, amizade e por ter me dado força quando mais precisei;

Ao Clube de Regatas Flamengo, pela incomparável emoção de fazer parte da sua torcida nas tardes de domingo, como aquelas do Tri-estadual (1999/2000/2001). Certamente "...eu teria um desgosto profundo...";

Às plantas, que me revelam seus segredos e me aproximam do Criador;

Aos seres diminutos que chamamos de microrganismos, misteriosamente fascinantes;

À Zuleide, por suas orações, amor, confiança e incentivos constantes;

Aos grandes amigos João, Maurício, Leandra, Claúdio Márcio, Magno, Anderson, Alexandre Monteiro, Éllen, Alexandre Bastos, Karina, Júlio Garcia, Robson Amadeu, Deivison, Vairo e Jessé (meu irmão de Salvador), Dona Elvira, Madalena, Elô, Ângela Chaves;

A multidão que lotou a Agronomia naquele inesquecível dia 29, e a todos que, de alguma forma, possibilitaram a realização desse trabalho.

Biografia

Nascido no Rio de Janeiro em 18 de janeiro de 1969, filho de João Facundo de Araujo e Terezinha de Paula Araujo, ***João Sebastião de Paula Araujo*** chegou à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1987 para cursar Agronomia. Ao ser graduado, cinco anos após, portava o título e a experiência de ter sido estagiário e bolsista, em diversas categorias, na Área de Fitopatologia, sempre sob a orientação do Dr. Osamu Kimura, com o qual muito aprendeu sobre ciência e, mais ainda, sobre o amor à docência, à pesquisa e à UFRRJ, marca maior de seu saudoso tutor. Agrônomo por excelência, dedicou-se com afinco às atividades de consultoria e prestação de serviços em proteção de plantas. Acadêmico, por opção e aptidão, titulou-se *Master of Science* em Fitotecnia pela UFRRJ, em 1995, e no mesmo ano foi contratado como professor substituto de Fitopatologia. Ingressou no Doutorado em Fitotecnia, sob orientação do Prof. Charles Robbs, em 1998, ano em que deu realidade ao sonho que desde 1992 fizera parte de sua vida – pela brilhante atuação em todas as fases foi o primeiro colocado em concurso público de provas e títulos, o que lhe permitiu ser nomeado Professor Efetivo de Fitopatologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Mariângela Guajará

SUMÁRIO

	Página
1- INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1- O cultivo da videira no Brasil	2
1.2- A região do Vale do Rio São Francisco	5
1.2.1- Características geoambientais	6
1.2.2- Mercado de frutas na região	7
1.3- A viticultura tropical do nordeste	8
1.3.1- Cultivares e porta-enxertos	9
1.3.2- Práticas de cultivo	12
1.3.3- Principais doenças e pragas	13
1.3.4- Produtividade da viticultura nordestina	15
1.4- Histórico do cancro bacteriano da videira no Brasil	15
1.5- Objetivos	17
2- MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1- Caracterização da bactéria incitante do cancro da videira no Brasil	19
2.1.1- Coleta de material e local dos experimentos	19
2.1.2- Isolamento	20
2.1.3- Testes de patogenicidade	20
2.1.4- Características culturais, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas	22
2.1.4.1- Morfologia das colônias em diferentes meios de cultura	22
2.1.4.2- Reação de Gram.	22
2.1.4.3- Utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio	23
2.1.4.4- Relação com o oxigênio livre	23
2.1.4.5- Oxidase	23
2.1.4.6- Hidrólise de amido	24
2.1.4.7- Hidrólise de gelatina	24
2.1.4.8- Hidrólise de esculina	24
2.1.4.9- Crescimento em meio de tetrazólio	25

2.1.4.10- Temperatura de crescimento 25
2.1.4.11- Proteólise do leite 25
2.1.4.12- Catalase 25
2.1.4.13- Crescimento em diferentes fontes únicas de carbono 26
2.1.4.14- Produção de uréase 27
2.1.4.15- Tolerância a NaCl 27
2.1.4.16- Produção de H_2S. 27
2.1.4.17- Ação sobre nitratos 28
2.1.4.18- Visualização de flagelos ao microscópio eletrônico 28
2.1.5- Patogenicidade e faixa de hospedeiros 29

2.2- Uso de anticorpos policlonais na detecção do agente do cancro bacteriano em material propagativo de videira 30
2.2.1- Produção de antisoros 30
2.2.2- Purificação de anticorpos policlonais em coluna contendo proteína "A" 31
2.2.3- Procedimento para o método ELISA 32

2.3- Relações patógeno-hospedeiro e perfil epidemiológico 34
2.3.1- Microscopia ótica e eletrônica de transmissão 34
2.3.2- Microscopia eletrônica de varredura 36
2.3.3- Imunomarcação com partículas de ouro para exame ao microscópio eletrônico de transmissão 37
2.3.4- Imunomarcação com partículas de ouro para microscopia ótica 39

2.4- Tolerância de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* ao cobre 40

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO 43

3.1- Caracterização da bactéria incitante do cancro da videira no Brasil 44

3.2- Uso de anticorpos policlonais na detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* 58

3.3- Relações patógeno-hospedeiro e perfil epidemiológico 63

3.4- Tolerância de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* ao cobre 85

4- CONSIDERAÇÕES FINAIS 90

5- REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS 97

6- APÊNDICE 122

FIGURAS E TABELAS

		Página
Figura 1.	Mapa político destacando os estados e regiões maiores produtores de uva no Brasil.	3
Figura 2.	Região do Vale do Rio São Francisco.	5
Figura 3.	Cacho da cv. Red Globe	11
Figura 4.	Cacho da cv. Itália	11
Figura 5.	Cacho da cv. Piratininga	11
Figura 6.	Cacho da cv. Perlette (apirena)	11
Figura 7.	Fluxograma do método empregado para avaliação de resistência de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* ao cobre *in vitro*. Extraído de Aguiar (1997).	42
Figura 8.	Sintomas de manchas necróticas no limbo foliar de videira Red Globe, causados por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.	45
Figura 9.	Ramos de videira apresentando cancros causados por intensa exsudação bacteriana é obtida desses tecidos.	45
Figura 10.	Sintomas do cancro bacteriano sobre engaço de cacho de videira 'Itália'. Notar descoloração do engaço.	46
Figura 11.	Cancro extenso e profundo em ramo de videira 'Red Globe', provocado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.	46
Figura 12.	Colônias de Xanthomonas campestris pv. viticola desenvolvidas em meio de cultura Nutriente Ágar, após 72h de incubação a + 28 ºC.	49
Figura 13.	Sintomas desenvolvidos em videira, cv. 'Red Globe', inoculada com isolado de Xanthomonas campestris pv. viticola originário do Vale do São Francisco.	49

Figura 14. Fotomicrografia de células de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* magnificadas 30.000X, após coloração com acetato de uranila; destaque para o flagelo polar (bar=0,6mm). 50

Figura 15. Folhas de mangueira 'Tommy AtKins' inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A- necrose desenvolvida após infiltração com suspensão contendo aproximadamente 10^8 ufc/ml; B- necrose e anasarca de tecidos 12 dias após a infiltração. 54

Figura 16. Videira 'Red Globe' apresentando sintomas provocados por infiltração foliar de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com aproximadamente 10^8 ufc/ml. A- clorose correspondente à região infiltrada, após sete dias; B- necrose de tecidos, 13 dias após a infiltração. 55

Figura 17. Planta de umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) com sintomas foliares decorrentes de infiltração de suspensão de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com, aproximadamente, 10^8 ufc/ml. 55

Figura 18. Folhas de cajá-manga (*Spondias ducis*) exibindo sintomas foliares decorrentes de infiltração de suspensão de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com, aproximadamente, 10^8 ufc/ml. 56

Figura 19. Determinação do título dos anticorpos policlonais AC4558 e AC4560, produzidos contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Valores médios de três repetições. 59

Figura 20. Fotomicrografia eletrônica de varredura (FMVE) de limbo foliar assintomático de videira 'Red Globe', evidenciando população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, aderida em monocamadas. A- 3000X ; B-detalhe 5000X. 64

Figura 21. Superfície do limbo foliar assintomático de videira 'Red Globe', colonizada por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* na proximidade de um estômato. A=3000X. 66

Figura 22. Colonização de tricoma no limbo foliar assintomático de videira 'Red Globe' por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A-2100X ; B-detalhe 5000X. 67

Figura 23. Fotomicrografia ótica (FMO) de seção longitudinal de pecíolo de videira cv. Red Globe exibindo sintoma de cancro causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Notar extensiva perda de integridade tecidual (✯) associada à presença de matriz polissacarídica (➡). bar= 20μm. (✳) Células contendo tanino e deposição de polifenóis. 70

Figura 24. Massa de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio ao parênquima paliçádico de folhas de videira 'Red Globe'. A=2100X. 71

Figura 25. FMEV de região do xilema de videira 'Red Globe' infectada por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, mostrando colonização do parênquima. A=3000X. 72

Figura 26A. FMO de seção longitudinal de pecíolo de videira, cultivar Red Globe, exibindo sintoma de cancro causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Bactérias colonizando lúmen dos vasos de metaxilema (**x**). Notar exsudação de microcolônia para sítios de vaso adjacente, através de pontuações primárias (➡). bar= 5μm. 75

Figura 26B. FMO de detalhe da exsudação de vaso com colonização profusa por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (**x**), alcançando o xilema através de pontuações primárias (➡). bar= 10μm. 75

Figura 26C. FMO de seção longitudinal de pecíolo de videira, cultivar Red Globe, exibindo sintoma de cancro causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Região de transição entre área tecidual íntegra e necrosada. Notar perda de integridade celular e descoloração intensa da área doente (*). bar= 10μm. 75

Figura 26D. FMO de campo claro de seção longitudinal de pecíolo de videira, cultivar Red Globe, exibindo sintoma de cancro causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Amostras foram incubadas com anticorpo policlonal produzido contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (AC4558/AC4560), imunomarcadas com ouro e submetidas à revelação do sinal com prata (IGL.SE). Notar presença de células de *Xcvi* na região de tecido macerado (T) e confinadas ao xilema (➡). bar= 5μm. 75

Figura 26E. FMO de contraste interferencial e diferencial da figura 26D. Notar correspondência espacial entre ambas as fotomicrografias. Região de tecido macerado (T) e de xilema (➡), esta similar àquela da Figura 25. bar= 5μm. 75

Figura 26F. FMO de contraste interferencial e diferencial de seção similar à Figura 26E, controle da reação IGL.SE. Amostras foram incubadas apenas com anticorpo policlonal específico (AC4558/AC4560). Notar grande quantidade de células de *Xcvi* não reveladas pela ausência do amplificador do sinal na preparação da amostra (*). bar= 5μm. 75

Figura 27. FMEV de seção transversal do pecíolo foliar de videira 'Red Globe', revelando extensiva área de maceração celular, associada à presença de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A=5000X. 76

Figura 28A. Fotomicrografia eletrônica de transmissão (FMET) mostrando *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* colonizando região de extensiva necrose e colapso celular. Bactérias estão envolvidas por matriz fibrilar, formando halo eletrotransparente (➡). Notar degradação da parede celular (★).bar= 0,6μm. 78

Figura 28B. FMET mostrando *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* aderida em ataque apolar à parede de células de parênquima da região de tecido necrosado, em estádio avançado da doença. Notar detalhe da matriz fibrilar e formação de halo eletrotransparente ao redor da célula bacteriana (✻).bar= 0,15μm. 78

Figura 28C. FMET de células de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* imunomarcadas (IGL) com partículas de ouro (Ø=15nm) associadas a anticorpo policlonal específico (AC4558/AC4560). Notar prevalência de epítopos (•)na superfície da parede celular bacteriana e a não reação do anticorpo com fibrilas. bar= 0,15μm. 78

Figura 28D. FMET de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* imunomarcadas (IGL) com partículas de ouro (Ø=15nm) associadas a anticorpo policlonal específico (AC4558/AC4560). Notar extensiva desfibrilação da parede celular (➡) em presença de células de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (•). bar 0,25μm. 78

Figura 29. Ciclo biológico de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* na região do Vale do Rio São Francisco. 96

Tabela 1. Produção nacional de uva, segundo sua utilização, variedades plantadas e principais regiões produtoras (http://www.embrapa.gov.br). 4

Tabela 2. Características bioquímicas e fisiológicas comuns a isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) e procedentes do Vale do Rio São Francisco. 52

Tabela 3. Especificidade de anticorpos policlonais produzidos contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (valores de densidade ótica expressos em %). 62

Tabela 4. Níveis de tolerância de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* ao cobre *in vitro*. 85

Resumo

O cultivo de videira (*Vitis vinifera* L.) no nordeste tem impulsionado a produção brasileira de uva nos últimos anos, face às condições adequadas e prevalentes no perímetro irrigado do Vale do Rio São Francisco, proporcionando frutos de ótima qualidade e aceitação nos mercados nacional e internacional. Entretanto, no início de 1998, a viticultura daquela região foi aplacada por uma insidiosa enfermidade originalmente assinalada em Petrolina, estado de Pernambuco. O quadro sintomatológico caracteriza-se por lesões necróticas foliares e cancros nos ramos, ocorrendo principalmente em plantios de 'Red Globe', cultivar que vinha se destacando pela produtividade e rentabilidade. O cancro bacteriano da videira, doença nova para a viticultura brasileira, é causado pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978, um patovar não-pigmentado, anteriormente só registrado na Índia. Isolados da bactéria foram obtidos de amostras coletadas de videiras infectadas na região e sua identificação procedida através de características culturais, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Mediante inoculações artificiais a bactéria foi patogênica a outras espécies, a saber: mangueira (*Mangifera indica*), umbuzeiro (*Spondias tuberosa*), cajueiro-anão (*Anacardium occidentale*), cajá-manga (*Spondias dulcis*) e aroeira (*Schinus terebenthifolius*), todas da família *Anacardiaceae*, e nim (*Azadirachta indica*) da família *Meliaceae*. Anticorpos policlonais foram produzidos, mostrando-se altamente reativos contra *X. campestris* pv. *viticola*, podendo ser empregados no diagnóstico da doença e em programas de certificação de material propagativo. Estudos ao microscópio ótico, eletrônico de varredura e de transmissão, indicaram sobrevivência epifítica e colonização sistêmica de tecidos parenquimatosos e vasculares da videira. Testes realizados *in vitro* detectaram tolerância ao cobre de isolados nacionais de *X. campestris* pv. *viticola*, até 300μg/ml de Cu^{++}. Medidas de controle são propostas visando a restringir o progresso do cancro bacteriano da videira para outras regiões do país.

Abstract

Epidemiological profile and contribution for the control of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, the causal agent of bacterial canker of grapevine (*Vitis vinifera*) in Brazil.

At the beginning of 1998, a new bacterial disease was found on grapevine (*Vitis vinifera*) in the São Francisco river valley, Northeast Brazil, affecting the cultivar Red Globe and causing severe damage to local crops. The causal agent of the disease, here designated as grapevine bacterial canker, was isolated and identified as *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* - a non-pigmented pathovar of *Xanthomonas* – by cultural, biochemical, physiological and pathogenic characteristics. Infected plants showed necrotic, angular leaf spots and vein discoloration, along with extensive deep cankers on branches. The grapevine isolated bacterium was also pathogenic by artificial inoculation to members of the *Anacardiaceae*, named: mango (*Mangifera indicae*), cashew (*Anacardium occidentale*), ambarellas (*Spondias tuberosa* and *Spondias dulcis*), and pepper tree (*Schinus terebenthifolius*), as well as neem (*Azadirachta indica*), a member of *Meliaceae*. Policlonal antibodies produced were highly reactive against cells of *X. campestris* pv. *viticola* and thus may be used for diagnosis and certification purposes. Light and eletron microscopy studies indicated epiphytic survival of *X. campestris* pv. *viticola* and systemic colonization of grapevine parenchima and vascular tissues. *In vitro* tests showed that some Brazilian isolates of the bacterium were tolerant of up to 300μg/ml of copper (Cu^{++}). Control measures are recommended for grapevine bacterial canker, including proposed strategies to restrain it spreading over the country.

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- O cultivo da videira no Brasil

Existem cerca de 10 mil variedades de videira (*Vitis vinifera*), adaptadas a vários tipos de solo e de clima, o que possibilita o seu cultivo em quase todas as regiões do mundo. Sendo frutas bastante sensíveis às condições do solo e do clima em que se desenvolvem, as uvas variam muito de acordo com essas condições, apresentando características que as distinguem segundo o sabor, a acidez, a doçura, o formato, a coloração e a resistência da casca, o tamanho, a quantidade de sementes e o formato dos cachos.

Até nossos dias, a maior parte da produção da uva permanece destinada à industrialização do vinho. Calcula-se que cerca de 80% do total produzido anualmente é transformado em vinhos ou em outros tipos de bebidas alcoólicas, tais como brandy, cognac, armagnac, jerez etc., 5% destinam-se ao processamento de sucos, outros 5% viram uvas passas e 10% são consumidos *in natura*, como sobremesa ou por "puro prazer" (Ingles de Sousa, 1996). Contudo, costumam ser divididas em apenas dois grupos: as uvas de mesa e as uvas para vinhos e outros fins industriais.

No Brasil, desde o começo do século XX os vinhedos foram instalados no sul e no sudeste, principalmente por imigrantes alemães e italianos. Muitas cidades e 230 vilas foram criadas, numerosas parreiras plantadas, modificando, definitivamente, as paisagens serranas e frias do Rio Grande do Sul. Ali se destacam os municípios de Flores da Cunha, Bento Gonçalves, Garibaldi, Santana do Livramento e Caxias do Sul como grandes produtores de vinhos de qualidade. Atualmente, além do Rio Grande do Sul, os estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo (especialmente os municípios de Jales, São Miguel Arcanjo, Vinhedo e Porto Feliz), Bahia e Pernambuco também produzem boas castas (Fig. 1 e Tab. 1).



Figura 1. Mapa político destacando os estados e regiões maiores produtores de uva no Brasil.

Tabela 1. Produção nacional de uva, segundo sua utilização, variedades plantadas e principais regiões produtoras (http://www.embrapa.gov.br).

Finalidade	Uva	Região
Vinho fino Feito a partir de uvas de origem européia	chardonnay, riesling itálica, sémillon, as moscatos e as malvasias e a gewuztraminer (para os vinhos brancos). cabernet franc, cabernet sauvignon, merlot, tannat, pinot noir (para os tintos)	• Rio Grande do Sul: Serra Gaúcha; Campanha e Serra do Sudeste • Nordeste: região do Vale do Rio São Francisco
Vinho comum ou de mesa Produzido a partir de uvas americanas ou híbridas	isabel, bordô, niágara branca, niágara rosada	• Rio Grande do Sul: Serra Gaúcha e nas cidades de São José do Ouro, Jaguari e Rolante • Santa Catarina: Vale do Rio de Peixe e em Urussanga Paraná: Colombo • São Paulo: São Roque • Minas Gerais: Caldas e Andradas
Suco Produzido a partir de uvas americanas ou híbridas	concord, isabel, bordô	• Rio Grande do Sul: Serra Gaúcha • Santa Catarina: Vale do Rio do Peixe
Uva de mesa (*in natura*)	itália, niágara rosada e branca, rubi , benitaka, piratininga, red globe e christimas rose	• Rio Grande do Sul: Serra Gaúcha • Santa Catarina: Vale do Rio do Peixe • São Paulo: leste e noroeste do Estado • Norte do Paraná e região do Vale do Rio São Francisco

Consultor: Jorge Tonietto, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho.

De acordo com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), no ano de 2001 serão produzidas no país mais de 998 mil toneladas de uva (http://www.ibge.gov.br). Verifica-se que o mercado brasileiro de uva de mesa é um dos mercados hortifrutícolas que mais cresce, sendo que o consumo *per capita* deste produto subiu de 0,4kg/hab/ano no início da década de 80 para quase 2,5kg/hab/ano em 1999. Esta tendência deve se manter para os próximos anos e, segundo estudos de mercado (Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas – http://www.fipe.com.br), a produção nacional destinada ao mercado interno é hoje totalmente absorvida.

No Brasil, atualmente, o principal pólo produtor é o de Juazeiro-Petrolina, no Vale do São Francisco, que responde pela maior parte da produção de uva fina de mesa e que busca abastecer tanto o mercado interno quanto o externo.

1.2- A região do Vale do Rio São Francisco

Atravessando terras pertencentes a cinco estados das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil (Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia e Minas Gerais), o Vale do São Francisco (Fig. 2) representa, atualmente, o maior centro produtor e exportador de frutas do país, sendo capaz de abastecer, também, boa parte do grande mercado interno.



Figura 2. Região do Vale do Rio São Francisco.

A zona semi-árida, inserida no nordeste brasileiro, situa-se na parte mais ocidental do continente sul americano e é integrada por cerca de 900 municípios, com, aproximadamente, 17 milhões de habitantes. Ambiciona principalmente a produção integrada de manga e uva junto aos produtores já explorando para mercados internacionais, principalmente nos municípios de Juazeiro, Curaçá, Sento Sé e Casa Nova no estado da Bahia, e Petrolina no estado de Pernambuco. Cerca de 14 empresas exportadoras de frutas *in natura,* manga e uva fina de mesa, estão instaladas na região, o que tem acelerado o crescimento da produção agroindustrial irrigada. Atualmente há uma área de cerca de 100.000 ha irrigados, entre projetos públicos e privados, com potencial de alcançar cerca de 200.000 hectares (http://www.embrapa.br).

1.2.1- Características geoambientais

A região apresenta pluviosidade baixa e irregular, em torno de 750mm/ano, concentrada num período de 3 a 5 meses. Ocorrem períodos agudos de estiagem, quando a precipitação pluviométrica cai para cerca de 450-500 mm/ano. As temperaturas são altas, com média das mínimas em torno de 20^0C e das máximas ao redor de 31^0C, com taxas elevadas de evapotranspiração e balanço hídrico negativo durante parte do ano. A insolação é muito forte, 2800 horas/ano, e está aliada à baixa umidade relativa do ar. Os solos são oriundos de rochas cristalinas, predominantemente rasos, pouco permeáveis, sujeitos à erosão e de razoável fertilidade natural. Nas áreas potencialmente irrigáveis está presente uma ampla variedade de solos, que podem ser agrupados em seis categorias: ARGISSOLO

VERMELHO-AMARELO (podzólico vermelho-amarelo), LUVISSOLO (Bruno-não-cálcico), VERTISSOLO, CAMBISSOLO, NEOSSOLO QUARTZARÊNICO (Areia Quartzosa) e NEOSSOLO FLÚVICO (Aluvial). Predomina vegetação de caatinga, que abrange cerca de 1,0 milhão de km^2, com sucessão indicativa de processo de degradação ambiental. A zona definida como semi-árida, divide-se em áreas naturais chamadas de: caatinga, sertão, seridó, carrasco, cariris velhos, curimataú e a parte norte do estado de Minas Gerais (Alburquerque, 1996)

1.2.2- Mercado de frutas na região

No Pólo Agroindustrial de Petrolina-Juazeiro encontram-se os maiores produtores de manga e uva do país, tendo alguns deles já alcançado mercados externos. A área plantada com uva de mesa cresceu no período de 1991/1995 em 71,8% passando de 2.620 hectares para cerca de 4.500 hectares, enquanto a produção cresceu no mesmo período em cerca de 344%, vindo de 32 mil toneladas para 110 mil toneladas. Nesse mesmo período, o volume de exportação da região cresceu de 1.050 toneladas para cerca de 12.500 toneladas. Essas cifras geram em torno de 18.000 empregos diretos. A cultura da mangueira também é muito importante no Vale do São Francisco, com cerca de 22 mil hectares plantados, sendo a maior produtora brasileira. Desses, 62,8% encontram-se no estado da Bahia, 25,7% em Pernambuco e 10,0% em Minas Gerais. O pólo de agricultura de Petrolina-Juazeiro apresenta a maior densidade de plantio de mangueira, com 12,5 mil hectares, representando 57,3% dos plantios

dessa fruteira existentes em todo o Vale. A cultura é responsável por cerca de 16.000 empregos diretos na região (http://www.embrapa.br).

1.3- A viticultura tropical do nordeste

O Brasil viveu uma grande transformação em relação à produção de uvas a partir dos anos 70, quando grandes grupos nacionais e internacionais, através de incentivos governamentais, passaram a investir no desenvolvimento e na instalação de modernos projetos de irrigação ao longo de todo o vale fértil, quente e seco do Médio Rio São Francisco (estados de Pernambuco e Bahia).

Inúmeras agroindústrias produtoras de sucos, de vinhos e de doces foram atraídas para a região do Vale, ampliando ainda mais a oferta de trabalho e alterando profundamente as condições sócio-econômicas de toda uma população habituada, há séculos, às dificuldades da caatinga e da seca.

Em poucos anos, a terra do licuri e do mandacaru começou a produzir em abundância frutas de todo tipo, como abacaxi, mamão, abacate, figo, goiaba, maracujá, melão, melancia, carambola, manga, limão, laranja e uva.

Assim, dois aspectos bastante distintos são encontrados quando se analisa a atual viticultura nacional. De um lado está o que se poderia chamar de viticultura tradicional, onde predominam as variedades americanas, que têm no Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais, os maiores centros produtores; de outro, a nova viticultura, alicerçada em variedades européias de fina qualidade, localizada em regiões do nordeste. A viticultura vem se

expandindo de forma ágil no Submédio São Francisco, onde, por conta do clima tropical semi-árido, assume um comportamento muito diferente daquele das nas regiões tradicionais de cultivo.

1.3.1- Cultivares e porta-enxertos

Abaixo, são descritas características das principais cultivares e dos porta-enxertos plantados no nordeste do Brasil (Alburquerque,1996):

Cultivares com sementes:

Red Globe - plantas de vigor mediano, mas com boa produtividade. Cachos médios a grandes, soltos, dispensando desbaste. Os frutos são muito grandes, arredondados e rosados, com polpa de textura crocante (Fig.3).

Itália - produz cachos volumosos, com peso médio de 500g, coloração verde-amarelada, com frutos grandes quando bem raleados e de sabor moscado. Em sistema de latada a produtividade pode alcançar 40t/ha/ano (Fig.4).

Piratininga - produz cachos também volumosos com peso médio de 450g, não sendo necessário um desbaste muito rigoroso. Os frutos são grandes, de coloração rosa a vinho, e sabor levemente ácido. Em latadas, também pode atingir 40t/ha /ano (Fig.5).

Benitaka – casta paranaense, produtora de magnífica uva de mesa e originada de mutação de Rubi Okuyama. Bagas de coloração rosada intensa e notável aparência. Tem características de vegetação e sensibilidade a pragas e doenças idênticas às de Itália e Rubi.

Christmas Rose – cultivar em expansão, com plantas muito produtivas; seus cachos são grandes, alados e não compactos. Frutos grandes, rosados, de forma oval e sabor agradável.

Cultivares sem sementes:

Perlette – plantas de vigor mediano, cachos de tamanho médio (250g), compactos, cônicos e alados. Os frutos são pequenos, arredondados e de coloração verde-amarelada. A polpa é crocante e de sabor levemente moscado. Produtividade média de 20t/ha, em dois ciclos anuais. A precocidade é sua característica marcante (Fig.6).

Thompson Seedless – cultivar de maior procura no comércio mundial, exigente em clima temperado seco com dias longos de verão e, por isso, mais adaptada à Califórnia e à região central do Chile. Nas condições do nordeste brasileiro não tem boa produtividade.

Superior ("Festival") – cultivar apirena ainda sob avaliação nas condições do nordeste, não se dispondo de dados de produtividade, mas crescendo em área plantada.

Porta-enxertos:

Originalmente as cultivares de videira passaram a ser enxertadas visando ao controle da "filoxera", praga que chegou a dizimar os vinhedos europeus, tornando-se necessária a utilização de porta-enxertos resistentes à praga. Hoje, além da "filoxera", na seleção dos porta-enxertos são considerados os seguintes fatores: resistência aos nematóides, adaptação a diferentes solos, resistência à seca, resistência à umidade excessiva, às podridões e carências minerais.



Figura 3. Cacho da cv. Red Globe

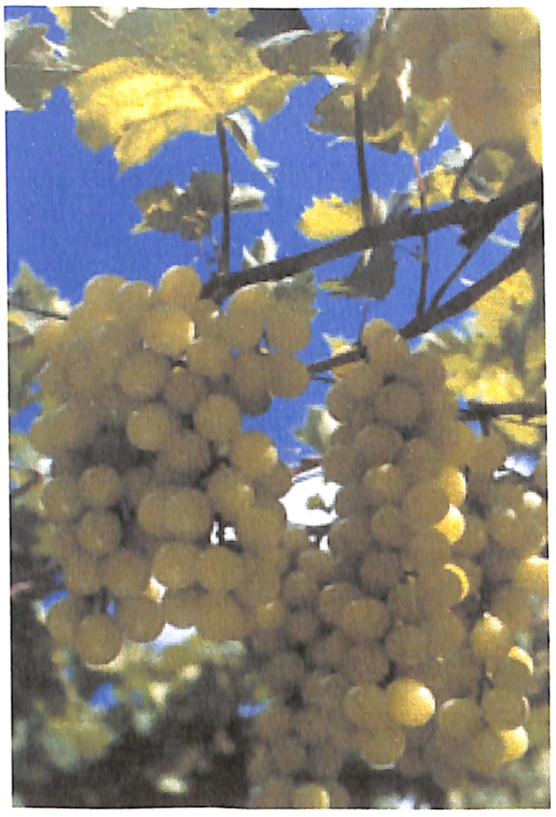


Figura 4. Cacho da cv. Itália

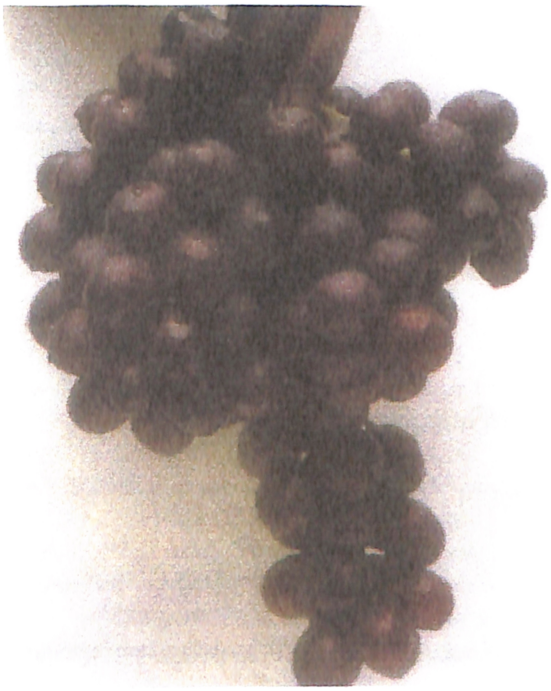


Figura 5. Cacho da cv. Piratininga



Figura 6. Cacho da cv. Perlette (apirena)

Com relação à cultivar enxertada, são avaliados a compatibilidade e, em segundo lugar, o vigor.

No Vale do São Francisco, a característica mais importante na escolha de um porta-enxerto é sua resistência aos nematóides. Os mais empregados na região são:

IAC-313 (Tropical) – muito vigoroso, com crescimento vegetativo contínuo, perfeita adaptação às condições climáticas tropicais, aos diferentes tipos de solos e com boa tolerância aos nematóides e às principais moléstias.

IAC-572 (Jales) – vigoroso, adapta-se tanto a solos argilosos como aos arenosos, apresentando folhagem resistente às principais doenças.

1.3.2- Práticas de cultivo

Na região do Submédio São Francisco o sistema de condução adotado para videira é a tradicional "latada", que consiste na formação de uma malha de fio suspensa por moirões. O espaçamento de plantio varia de 3,0 x 2,0m ; 3,0 x 2,5m; 3,0 x 3,0m e 4,0 x 2,0m, conforme o vigor do porta-enxerto.

Quebra-ventos formados com eucalipto, leucena, bananeira, capim Cameron, nim ou instalação vertical de telas de nylon com 70% de densidade, são necessários para evitar-se que os frutos sofram danos mecânicos, do tipo escoriações superficiais, que depreciam a uva para comercialização *in natura*.

A irrigação condiciona o desenvolvimento da fruticultura naquela região, tanto que mais de 100 mil hectares já são irrigados por gotejamento – técnica predominante por infiltração, microaspersão e, mais raramente, por aspersão.

Também indispensáveis ao cultivo são as podas. Assim, essas operações são constantes na condução da lavoura desde o plantio, iniciando-se pela poda de formação das pernadas, seguida da poda de frutificação e do raleamento dos cachos. Em adendo, devido ao crescimento contínuo da videira na região, vários eventos fisiológicos da planta, como senescência e abcissão foliar, são induzidos pela aplicação de reguladores de crescimento, como: cianamida hidrogenada, ethephon, calciocianamida e outros.

No que se refere às práticas de adubação, macro e micronutrientes são fornecidos durante as fases de crescimento e produção, mediante aplicações foliares e de cobertura (Alburquerque,1996).

1.3.3- Principais doenças e pragas

Oídio – afeta toda a parte aérea da videira, sendo causada pelo fungo *Uncinula necator* (De Bary) Shear, responsável, por vezes, por grandes prejuízos sob condições de baixa umidade relativa do ar na região do São Francisco. Os sintomas caracterizam-se por lesões grandes e esbranquiçadas, cuja ocorrência prematura prejudica a formação e o desenvolvimento dos frutos. O controle é iniciado ainda na brotação, utilizando-se fungicidas sistêmicos (Triadimenol e/ou Fenarimol) alternados com fungicida de contato a base de enxofre.

Míldio – doença causada pelo fungo *Plasmopara viticola*, pode resultar em perdas totais se não for realizado o controle preventivo, principalmente em períodos chuvosos. O patógeno infecta folhas, provocando manchas necróticas irregulares e de coloração castanha. Quando os sintomas tornam-se visíveis o controle da doença fica difícil, mesmo com fungicidas sistêmicos. Por isso, preconiza-se o controle desde o início da brotação com produtos sistêmicos como Folpet ou Metalaxyl, intercalados com cobre e Mancozeb

Mofocinzento – doença fúngica tipicamente de pós-colheita, causada por *Botrytis cinerea*, podendo ocasionar sérios prejuízos se não controlado durante o vegetativo. Sob condições de alta umidade, o fungo pode provocar aborto das flores, deixando os cachos muito raleados. Chlorothalonil, Tiofanato Metílico e Folpet são indicados para o controle preventivo.

Escoriose – doença que se caracteriza pela formação de rachaduras e escoriações em ramos, com consequente secamento e morte da gema basal. Infecções foliares do fungo *Phomopsis viticola* ocorrem sobre nervuras principais, evidenciando-se pontuações alongadas ou arredondadas, de coloração marrom escura, que provocam queda foliar. Seu controle é realizado de forma preventiva, mediante aplicações de fungicidas.

Pragas – à semelhança do cultivo em outras regiões, a videira do nordeste é suscetível ao ataque de vários insetos e ácaros. Entretanto, essas pragas não tem sido consideradas limitantes à produção no Vale do São Francisco. Entre aquelas de maior incidência registram-se os ácaros *Polyphagotarsonemus latus*,

Brevipalpus phoenicis e *Tetranychus* spp., algumas cochonilhas, tripes e broca-dos-ramos (*Paramadarus complexus*) (Alburquerque,1996).

1.3.4- Produtividade da viticultura nordestina

Como não ocorrem temperaturas abaixo de 13^0C, as quais detêm o crescimento da videira, as condições tropicais do nordeste brasileiro são propícias a que as plantas vegetem e produzam durante todo o ano, não havendo logos períodos de repouso. Por isto, o desenvolvimento do ciclo fenológico das cultivares é de 110 a 120 dias, com período de repouso de apenas 30 dias entre os ciclos, estando condicionado à época de poda e ao controle da irrigação; torna-se, assim, possível a obtenção de até 2,5 safras/ano, que, dependendo da cultivar, totalizam de 20 a 40t/ha. Não obstante, a viticultura do nordeste pode aproveitar as melhores oportunidades de preços, ocupando "janelas" deixadas pelas regiões produtoras concorrentes, principalmente entre os meses de abril e junho (Alburquerque, 1996).

1.4- Histórico do cancro bacteriano da videira no Brasil

Tendo mercado garantido e encontrando condições adequadas no semi-árido do nordeste brasileiro, o cultivo da uva de mesa no Vale do Rio São Francisco encontrava-se em franca expansão, até que no final de 1997 e início de 1998 foi registrada uma insidiosa enfermidade bacteriana em Petrolina, estado de Pernambuco, ocasionando necroses e cancros em partes aéreas (Fig.7),

principalmente em plantios de 'Red Globe', cultivar que vinha se destacando pela produtividade e ótima aceitação entre os importadores.

Logo no início da epidemia, a convite da VALEXPORT (Associação dos Produtores e Exportadores de Hortigranjeiros e Derivados do Vale do São Francisco), vários pesquisadores foram ao local para investigar o problema. A enfermidade, nova para a viticultura brasileira, foi atribuída inicialmente, a *Xylophilus ampelinus* (sin. *Xanthomonas ampelina*) (Panagopoulos 1969 Williems *et al.*,1987) agente do "crestamento bacteriano", que também induz sintomas de cancros. Posteriormente, bacteriologistas da Universidade de Brasília, do Instituto Biológico de São Paulo e da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, levantaram a possibilidade do envolvimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Young e*t al.*, 1996) - bactéria registrada na Índia, por Nayudu (1972), como *Pseudomonas viticola*, e redescrita por Dye (1978) - na etiologia da enfermidade presente no Vale do São Francisco. Tal suspeita foi confirmada, de forma unânime e simultânea (Boletim da VALEXPORT,1999), resultando no primeiro registro oficial da bactéria no Brasil (Malavolta *et al.*, 1998).

Hoje, sem dúvida, essa bacteriose é fator limitante da viticultura do nordeste; tanto que em Petrolina estimou-se um prejuízo inicial acima de três milhões de reais em 1999, envolvendo uma área contaminada de cerca de 120 hectares (Guilherme F. Maciel - Frutivita S.A, comunicação pessoal). Lima *et. al.* (1999) citam erradicação de 100ha de videiras em produção, daquela região, infectadas pela bactéria, sendo 85% dessa área referentes à cv. Red Globe e 15% à cv. Perlette. Por outro lado, os produtores de mudas da cv. Red Globe

encontram-se desestimulados, havendo, ainda, receio do surgimento de níveis de incidência mais elevados em outras cultivares, particularmente naquelas sem sementes, bem como a preocupação de orgãos oficiais que áreas vitícolas da Região Sudeste sejam atingidas, o que representaria problema muito mais sério para o país.

1.5- Objetivos

Diante dos fatos acima relatados, no presente trabalho objetivou-se:

1 - caracterizar a bactéria incitante do cancro bacteriano da videira no Brasil;

2 - elucidar aspectos relevantes da relação patógeno-planta e suas conseqüências epidemiológicas;

3 - avaliar a sensibilidade da bactéria ao cobre; e

4 – diagnosticar infecção em material propagativo de videira mediante serologia.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Caracterização do agente incitante do cancro bacteriano da videira no Brasil

2.1.1- Coleta de material e local dos experimentos

Amostras de folhas, ramos, gavinhas e ráquis de frutos de videira portadoras de sintomas da doença foram coletadas nas Fazendas Frutivita S.A, Frutimag S.A., La Brunier S.A., Nova Fronteira Agrícola S.A., Frutinor S.A., Timbaúba Agrícola S.A. e Frutifort S.A. integrantes do perímetro irrigado do Submédio São Francisco –estados de Pernambuco e Bahia. Essas amostras foram cadastradas na Área de Fitopatologia, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Instituto de Biologia, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foram desenvolvidos os estudos.

2.1.2- Isolamento

Constatada a presença de exsudação bacteriana ao microscópio ótico, as amostras foram submetidas à desinfestação em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5%, por um minuto, sendo então transferidas para tubos rosqueados, contendo 5ml de água destilada e esterilizada por cerca de cinco minutos. Em seguida, com auxílio de alça de Drigalski, procedeu-se à riscagem, a partir das suspensões bacterianas obtidas, em placas de Petri contendo o meio de cultura Nutriente Ágar (NA) (Apêndice), posteriormente incubadas a 28^0C por 72 horas.

Após esse período, colônias representativas foram selecionadas e, através de alça de platina, individualmente transferidas para tubos rosqueados contendo água destilada e esterilizada. Os isolados obtidos foram então registrados e armazenados sob condições naturais de ambiente.

2.1.3- Testes de patogenicidade

A partir de culturas puras da bactéria, procederam-se ensaios de patogenicidade e hipersensibilidade. Para isto, células bacterianas foram repicadas para meio NA, e após 24 a 48h de crescimento a 28^0C, transferidas para água destilada e esterilizada. A concentração de inóculo foi a seguir ajustada para, aproximadamente, 10^8 ufc/ml, através de espectrofotômetro digital SPECTRO 22RS (Labomed. Inc.), regulado a 560nm e 85% de transmitância.

Para os testes de patogenicidade, essas suspensões foram infiltradas em folhas sadias de videira, cv. Red Globe, empregando-se o método de injeção com

seringa hipodérmica sem agulha, substituindo esta por um disco de cortiça destinado a evitar ferimentos na cutícula (Hagborg,1970). Inoculações foram também procedidas em hastes de mudas de videira, mediante ferimento com agulha, seguido da deposição de chumaço de algodão embebido nas suspensões, sendo a região inoculada mantida coberta com Parafilm por dois dias.

Os testes de hipersensibilidade foram realizados em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*), infiltrando-se as suspensões dos isolados bacterianos, com auxílio de seringa hipodérmica com agulha fina, no mesófilo foliar, próximo às nervuras primárias.

Em ambos os casos, as plantas-teste foram cobertas com sacos de polietileno transparente por 48h, propiciando efeito de câmara úmida. Após esse período, as plantas seguiram mantidas em casa-de-vegetação. Para controle dos bioensaios, as plantas foram submetidas aos mesmos métodos ora descritos, usando-se água destilada e esterilizada em lugar do inóculo.

Bacelos de videira 'Red Globe', obtidos de plantas assintomáticas e, cedidos pela Frutivita S.A. para produção das mudas utilizadas nos ensaios, foram enraizados em areia autoclavada (120^0C/20min), na Área de Fitopatologia da UFRuralRJ. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até o final dos testes, crescendo em vasos com capacidade de 2 litros contendo substrato autoclavado, composto de proporções iguais de areia, argila e esterco bovino. Antes de qualquer descarte, plantas, vasos e substratos eram submetidos a autoclavagem.

Avaliações foram realizadas dentro de 48h, a contar da inoculação, para os testes de hipersensibilidade, considerando-se como resposta positiva o aparecimento de necrose confinada às áreas infiltradas. Com relação aos testes de patogenicidade, as avaliações prolongaram-se até o desenvolvimento completo dos sintomas típicos da doença.

2.1.4- Características culturais, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas

Culturas com 24-48h de idade, provenientes dos isolamentos efetuados de plantas de videira, foram submetidos a testes culturais, morfológicos , bioquímicos, fisiológicos, enzimáticos e de tolerância a produtos químicos, de acordo com os protocolos usuais para identificação de bactérias fitopatogênicas (Bradbury, 1986; Lelliott & Stead, 1987; Schaad, 1994).

2.1.4.1- Morfologia das colônias em diferentes meios de cultura

Placas de Petri contendo os meios B de King, NA e Dygs (Apêndice) foram riscadas com suspensões bacterianas de culturas após 48h de incubação a $\pm$ 28^{0}C. Colônias convexas, elevadas e brilhantes representaram aquelas designadas como de crescimento mucóide (Fahy e Hayward,1983).

2.1.4.2- Reação de Gram

Amostras retiradas asséticamente de colônias em cultura pura foram fixadas em lâmina, coloridas com cristal violeta/oxalato de amônio, descoloridas em solução de álcool etílico por 30 seg, novamente coloridas com safranina e,

após lavagem em água corrente e secagem, observadas ao microscópio ótico com objetiva de imersão. Células assumindo coloração violeta correspondiam ao padrão Gram positivo, ao passo que o vermelho-róseo caracterizava a reação negativa.

Complementarmente, utilizou-se o teste de solubilidade em KOH (Fahy e Hayward, 1983), no qual a suspensão de bactérias era misturada a uma lâmina contendo duas gotas de KOH 3%. O aumento de viscosidade caracterizava células Gram negativas.

2.1.4.3- Utilização de asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio

Culturas puras foram transferidas para tubos contendo solução aquosa de asparagina (0,1%) como única fonte de C e N. Turbidez desenvolvida no meio após 72h, indicando crescimento populacional, representou reação positiva para capacidade de utilização do composto pela bactéria.

2.1.4.4- Relação com o oxigênio livre

Culturas foram repicadas para pares de tubos de ensaio contendo o meio Hugh & Leifson, sendo que em um deles foram depositados 5ml de óleo mineral esterilizado, garantindo ambiente anaeróbico. A "virada" do meio de verde para amarelo, em cada tubo, indicou metabolismo fermentativo ou metabolismo oxidativo da bactéria isolada.

2.1.4.5- Oxidase

O teste foi realizado através de riscagem de amostras de culturas puras, com auxílio de alça de platina, sobre papel de filtro esterilizado e previamente

embebido em solução de dihidrocloreto de N,N,N`,N` tetrametil-1,4-fenilenodiamina. Reação positiva foi caracterizada pelo surgimento de coloração lilás, dentro de 60 seg.

2.1.4.6- Hidrólise do amido

Suspensões de culturas bacterianas foram riscadas em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA) a 0,2% (Apêndice), a seguir incubadas por 48h. Após esse período, adicionou-se solução de lugol até recobrir a superfície do meio. A formação de halo incolor ao redor das colônias desenvolvidas indicou capacidade de hidrolisar o amido.

2.1.4.7- Hidrólise da gelatina

Para o teste de liquefação, meio contendo gelatina foi distribuído em tubos de ensaio, a seguir inoculados com culturas puras através de perfuração vertical com alça de platina. Os tubos foram incubados a $\pm$ 28^{0}C e examinados por período de 14 dias. A hidrólise da gelatina foi caracterizada pela perda da capacidade de solidificação do meio de cultura após 30 minutos a 4^{0}C.

2.1.4.8- Hidrólise da esculina

Esculina é hidrolisada por todos os patovares da espécie *Xanthomonas campestris.* Para os testes, tubos de ensaio contendo meio de esculina (Schaad,1994) foram inoculados com culturas puras, incubados a $\pm$ 28^{0}C e observados durante 28 dias. A perda de fluorescência, sob luz ultravioleta, acompanhada de escurecimento do meio, indicou capacidade de hidrolisar esculina pela bactéria.

2.1.4.9- Crescimento em meio de tetrazólio

Nesse teste, os isolados foram transferidos para meio contendo 0,1 ou 0,02% de cloreto de trifenil tetrazólio. A avaliação foi realizada 48h após, sendo o resultado positivo caracterizado pela capacidade de desenvolvimento de colônias bacterianas típicas.

2.1.4.10- Temperatura de crescimento

Tubos de ensaio contendo o meio líquido "Nutrient Broth" foram pré-aquecidos a 35, 36, 37, 38, 39 ou 40^{0}C, em banho-maria, e subseqüentemente inoculados com culturas puras dos isolados a testar. Após a repicagem, os tubos retornaram ao banho-maria para incubação por sete dias. A turvação do meio indicou crescimento da população bacteriana em cada temperatura.

2.1.4.11- Proteólise do leite

Os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo leite em pó desnatado e reconstituído a 10%, em água esterilizada, incubados a $\pm$ 28^{0}C por sete dias. A hidrólise da caseína do leite foi demonstrada pela formação de fase translúcida na porção superior dos tubos, a partir do terceiro dia de incubação. Todos os patovares de *X. campestris* apresentam proteólise positiva, enquanto outras espécies comportam-se como negativas.

2.1.4.12- Catalase

Amostras provenientes de culturas puras foram depositadas sobre lâmina de microscopia contendo uma gota de água oxigenada. Borbulhamento imediato indicou resultado positivo para presença e atividade da enzima catalase.

2.1.4.13- Crescimento em diferentes fontes únicas de carbono

Os seguintes carboidratos e álcoois puros foram utilizados nas provas de fermentação:

Carboidratos

Monossacarídeos: pentoses: arabinose e ramnose; hexoses: glicose, frutose, manose e galactose;

Dissacarídeos: sacarose, maltose, lactose, trehalose, celobiose e melibiose;

Trissacarídeos: rafinose;

Polissacarídeos: amido;

Álcoois

Triálcool: glicerol;

Tetraálcool: eritritol;

Hexaálcool: sorbitol;

Glicosídeo: salicina.

A esterilização desses compostos foi feita, em geral, por filtração em Milipore, sendo os mesmos depois adicionados, na concentração de 0,5%, a tubos de ensaio com 5,0ml de meio básico (Dye, 1968). Em seguida, culturas bacterianas foram transferidas para os tubos através de alça de platina pré-flambada, sendo incubados a $\pm$ 28^{0}C e examinados após 2, 4, 7, 21 e 28 dias. A mudança de coloração azul para amarelo, indicou utilização da substância. Como controle, foram incluídos tubos sem qualquer fonte de carbono. Três repetições foram asseguradas para cada teste.

2.1.4.14- Produção de urease

Este teste foi realizado através da adição de vermelho de fenol a meio básico contendo uréia, seguindo-se incubação com a bactéria por sete dias. A liberação de amônia, devido à hidrólise da uréia, provoca passagem de amarelo para róseo. O meio básico tinha a seguinte composição: caseína ácida hidrolisada, 1g; NaCl 5g; K_2HPO_4 , 2g; glucose, 1g; uréia, 20g; vermelho de fenol (solução 0,2%), 6ml; ágar, 20g. Após autoclavagem esse meio básico foi resfriado até 55° C, quando então adicionou-se 20g de uréia esterilizados, na forma líquida.

2.1.4.15- Tolerância ao NaCl

Para a verificação do nível de tolerância ao sal, acrescentou-se 1, 2 ou 3 % de NaCl ao meio de cultura NA, distribuído em placas de Petri. Suspensões bacterianas foram riscadas nesse meio com alça de Drigalski, sendo as placas incubadas a $\pm$ 28°C e checadas, durante 14 dias, para desenvolvimento de colônias.

2.1.4.16- Produção de H_2S

Cistina e metionina são dois aminoácidos que contém enxofre. Certas bactérias são capazes de produzir H_2S a partir de cistina mas não de metionina. O gás sulfídrico é evidenciado por sua capacidade de reagir com metais pesados, formando sulfetos de cor enegrecida. Assim, a detecção de H_2S foi feita usando-se tiras de papel impregnadas com metal pesado. Tubos de ensaio com caldo nutritivo, o qual contém peptona, foram inoculados com os isolados, introduzindo-se, em seguida, uma tira de papel de filtro esterilizado, impregnada com acetato de chumbo a 5% e suspensa por fio de algodão, junto à tampa de cada tubo. A

avaliação foi realizada dentro de cinco dias, observando-se as tiras quanto à mudança de branco para negro. Como padrões positivos foram usados isolados de *Erwinia carotovora* var. *carotovora* e de *Xanthomonas campestris pv. campestris.*

2.1.4.17- Ação sobre nitratos

O teste objetivou a detecção da produção da enzima nitrato redutase pelos isolados bacterianos estudados, observando-se a redução de NO_3 a NO_2. Nesse sentido, preparou-se três tubos para cada isolado, contendo meio com a seguinte composição (g/l): glucose 10g; KNO_3 5g; extrato de levedura 1g; K_2HPO_4 2g; $MgSO_4$ $7H_2O$ 0,1g. Decorridas 72h de incubação, adicionou-se 1,0ml do reagente de Griess-Iloswa aos tubos de cultura; ocorrendo redução de nitrato a nitrito, desenvolvia-se coloração vermelha no meio. De forma contrária, considerou-se o teste negativo para nitrito ou, ainda, que a redução foi além, com produção de amônio até nitrogênio livre. Nesses casos procedeu-se à seguinte verificação: a) teste para nitrato- não tendo sido constatada a presença de NO_2 no meio, adicionou-se pó de zinco ao tubo de cultura, provocando-se a redução de NO_3 para NO_2, sendo a presença deste último detectada pela adição do reativo de Griess-Iloswa (Apêndice) e b) teste para amônio -não se tendo comprovado a presença de NO_3 ou de NO_2, a possibilidade de que tivesse havido redução para amônio foi checada com adição do reativo de Nessler (Apêndice).

2.1.4.18- Visualização de flagelos ao microscópio eletrônico

O preparo das amostras seguiu a metodologia utilizada por Olivares (1997), na qual colônias dos isolados, crescidas em placas contendo meio BDA, por

24/48h a 28^{0}C, foram, em seguida, confinadas por meio de bastões de vidro ôco, aos quais foram adicionados 100 microlitros de água destilada e esterilizada. Após 10 minutos, tomou-se uma gota de suspensão bacteriana, depositando-a sobre placa de cera. Nessa suspensão, fêz-se flutuar, por cerca de dois minutos, grade de cobre revestida de filme de formvar (solução de 0,5% em clorofórmio). Retirou-se, então, o excesso de água com papel de filtro, seguindo-se lavagem por dois minutos em gota de água destilada e esterilizada. Após nova secagem com papel de filtro, aplicou-se solução aquosa de acetato de uranila (5%) por mais dois minutos. Ao fim desse período, eliminou-se o excesso de solução com papel de filtro, deixando a grade secar por no mínimo, uma hora. As grades foram subseqüentemente examinadas em microscópio eletrônico de transmissão, modelo ZEISS EM900, com 80kv de voltagem de trabalho.

2.1.5- Patogenicidade e faixa de hospedeiros

Testes de patogenicidade foram realizados através de inoculações por infiltração no mesófilo foliar de suspensão veiculando cerca de 10^6 ufc/ml do isolado ENA-4525. Foram testadas as seguintes espécies: nim (*Azadirachta indica* A. Juss.); mangueira (*Mangifera indica* L., cv. Tommy Atkins), cajueiro-anão (*Anacardium ocidentale* L.); umbu (*Spondias tuberosa* Arruda); cajá-manga (*Spondias dulcis* Forst.); aroeira (*Schinus terebenthifolius* Radii); tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. Santa Clara); Pimentão (*Capsicum annuum* L., cv. Cascadura Ikeda) e videira (*Vitis vinifera* L., cv. Red Globe e porta-enxerto Traviú).

Em cada planta foram inoculadas três folhas com seringa + agulha e três outras sem agulha. Folhas foram também infiltradas com água destilada e esterilizada, representando as testemunhas. Foram inoculadas três plantas de cada espécie, a seguir mantidas em casa-de-vegetação, sob condições não controladas de ambiente, e avaliadas diariamente quanto à manifestação de sintomas. Ao final dos testes, todas as plantas-teste e o material utilizado foram autoclavados antes do descarte.

2.2- Uso de anticorpos policlonais na detecção do agente do cancro bacteriano em material propagativo de videira

2.2.1- Produção de antisoros

Para a produção dos antisoros seguiu-se o procedimento relatado por Reis *et al.*(1997), sendo utilizadas como antígenos células intactas dos isolados ENA-4558 e ENA-4560 crescidos em frascos de Erlemeyer contendo 50 ml de meio DYGS (Apêndice) (Rodrigues Neto *et al.*,1986). As células bacterianas foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 3 ml de água destilada e esterilizada. Seguiu-se mais uma centrifugação a 5000 rpm por 10 min, sendo esse procedimento de lavagem repetido três vezes. Após a última centrifugação, a massa de bactérias foi ressuspendida em 3ml de água destilada e esterilizada, e tratada termicamente a 90 ^{o}C por 30 min. para desnaturação e eliminação das proteínas flagelares. Tomou-se, então, 1 ml da suspensão de bactérias, adicionando-se 0,5 ml do

adjuvante completo de Freund + 0,5 ml de adjuvante incompleto. Um volume de 1ml dessa mistura foi usado para injeção subcutânea, em cinco pontos diferentes da linha dorsal, de coelhos da raça Nova Zelândia (primeira imunização). As imunizações subsequentes foram feitas utilizando 1 ml do antígeno aplicado, via intramuscular, na coxa, sem adjuvantes e a intervalos variando de 7 a 10 dias. Após a quarta imunização foram colhidas as primeiras amostras de sangue dos coelhos, correspondendo, em média, a 10 ml obtidos do terço superior da orelha, utilizando-se seringa hipodérmica descartável. O material coletado permaneceu no interior da seringa, sendo deixado a temperatura ambiente na bancada do laboratório por 24h. Decorrido esse período, observou-se uma clara separação das duas fases: uma volumosa massa sólida coagulada, contendo principalmente hemácias, e uma fase líquida, correspondendo ao plasma sanguíneo. Este último foi separado cuidadosamente, centrifugado por duas vezes a 2000 rpm por 10 min., para remoção do precipitado contendo partículas sólidas, e, posteriormente, colocado em banho-maria a 55 °C por 30 min., para inativação de proteínas que compõem o sistema complemento. Ao final deste processo, os soros foram identificados e estocados a 4°C, em frascos de vidro esterilizados, até sua utilização.

2.2.2- Purificação de anticorpos policlonais em coluna contendo proteína "A"

Antes dos ensaios imunológicos, os antisoros produzidos contra foram purificados por passagem em coluna contendo proteína "A", extraída de

Staphylococcus aureus, embebida em agarose. O método baseia-se na afinidade específica da proteína "A" pela fração IgG do antisoro, responsável pela resposta específica aos antígenos, eliminando-se imunoglobulinas inespecíficas (IgM, IgA, IgD e IgE). Desse modo, 5 ml de tampão de ligação (20 mM Na_2PO_3, pH 7,0) foram eluídos através da coluna "HiTrap Protein A" (Amershan Pharmacia), com o intuito de lavar e promover o equilíbrio da coluna para as condições reinantes no tampão. Em seguida, aplicaram-se 10 ml do soro diluído a 1:100 em tampão de ligação. As colunas foram lavadas novamente com 5 ml de tampão de ligação, sendo o material eluído continuamente descartado, lavando-se, assim, as imunoglobulinas não-específicas e outras proteínas. Na etapa final, foi adicionado 1ml de tampão de eluição (100mM ácido cítrico, pH 3,0), sendo as imunoglobulinas IgG eluídas da fase estacionária (proteína "A" em agarose) e recolhidas em frascos de vidro esterilizados. A esses frascos foram adicionados 200 µl de tampão tris-HCl - pH 9,0 e 100 µl de merthiolate incolor comercial, sendo os soros, identificados como AC4558 e AC4560, armazenados a 4°C até o momento dos testes.

2.2.3- Procedimento para o método ELISA

O procedimento para o método ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbant Assay") adotado foi o chamado indireto, conforme proposto por Levanony *et al.* (1987), com adaptações devidas a Reis *et al.*(1997). Esse método foi utilizado para verificar o título dos soros purificados AC4558 e AC4560, nas diluições de 1:1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:1000 e 1:2000, bem como o nível de reação

cruzada, testando-os contra isolados de *Xanthomonas campestris pv. viticola, X. c. pv. mangiferaeindicae, X. c. pv. campestris, Pseudomonas syringae pv. tomato, Ralstonia solanacearum, Agrobacterium tumefaciens, Erwinia sp. e Herbaspirillum seropedicae*. Consistiu do crescimento das cepas bacterianas em meio de DYGS, a 30 °C, por 24 h, sob agitação (150 rpm), seguido de centrifugação de alíquotas de 1ml a 2000g por 3 min. e ressuspensão em 1 ml de tampão carbonato-bicarbonato 50 µM - pH 9,6. Em seguida, foram feitos ajustes das concentrações dos antígenos para uma densidade ótica (D.O.) igual a 1,0 ± 0,1, lida em comprimento de onda λ = 436 nm. Os poços das placas de ELISA foram então impregnados com 50 µl dos antígenos calibrados , seguindo-se incubação a 4°C por 16 a 18h. Decorrido esse período, os poços foram lavados com solução tampão PBS [($g.l^{-1}$): NaCl - 8,0; KCl - 0,2; Na_2HPO_4 .$2H_2O$ - 1,4; KH_2PO_4 - 0,2 + 0,05% Tween 20 + 0,5% BSA], sendo as reações inespecíficas bloqueadas utilizando-se solução de soro albumina bovina (3% em PBS) por 30 min a 37°C. Foram adicionados 50 µl do anticorpo por poço, na diluição adequada ao tipo de ensaio, incubando-se as placas por mais 30 min a 37 °C. A seguir, repetiram-se três lavagens com 200 µl de solução por poço. Foram então aplicados 50 µl de anticorpo secundário (imunoglobulinas IgG de cabra, conjugadas com peroxidases produzidas contra imunoglobulinas de coelho) diluído na proporção de 1:1000 em PBS, seguido de incubação por 45 min a 37°C, tratando-se os poços com solução de lavagem por cinco vezes. Por fim, foram adicionados 100 µl de Signal ABTS, sendo as leituras de absorbância, após desenvolvimento da reação, realizadas

25914
U.F.R.R.J. BIBLIOTECA CENTRAL
N.° REGISTRO 43-002

em espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia), dotado de filtro de interferência de 405 nm. Os dados foram armazenados e processados pelo programa Labsystems Transmit Multskan Plus for Windows.

Os controles foram obtidos com poços preenchidos com soro pré-imune, sem o anticorpo primário, sem o anticorpo secundário, sem antígeno, somente com o substrato diretamente na placa. Diminuídos os valores de absorbância dos soros pré-imunes, foram consideradas todas as diluições cujos valores foram superiores ao obtido da subtração. Previamente à incubação, as placas foram agitadas a 300rpm por 3 min, em agitador IKA-Schuttler MTS 2 (Janke & Kunkel GmbH & Co KG IKA-Labortechnick Staufen, Alemanha). Durante o tempo de reação do substrato com a enzima, as placas foram agitadas a 100rpm.

2.3- Relações patógeno-hospedeiro e perfil epidemiológico

2.3.1- Microscopia ótica e eletrônica de transmissão

Amostras de folhas e ramos de videira assintomáticos, foram levadas ao Setor de Microscopia do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos/RJ. Lá, foram seccionadas em segmentos de 0,5 a 1,0 cm de comprimento por 0,1 a 0,5 cm^2 . As seções foram obtidas utilizando lâmina de aço nova mediante cortes a mão livre sobre uma placa de parafina e com as amostras embebidas em tampão fosfato. Os segmentos foram lavados duas vezes em solução tampão fosfato 50

mM, pH 6,8 e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato por 24 horas a temperatura ambiente (fixação primária). As amostras foram preparadas para microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão (MET) de acordo com James *et al.*, (1994), com pequenas modificações. Após a fixação primária, as amostras foram lavadas por três vezes em tampão fosfato para remoção do glutaraldeído residual e desidratadas em série etanólica crescente (15, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % etanol em água v/v), permanecendo por 15 minutos em cada mistura. Amostras destinadas a MET foram pós-fixadas por 1 hora em solução de tetróxido de ósmio 1% em água, lavadas por três vezes em tampão fosfato e só então sofreram desidratação em séria etanólica crescente. Após a desidratação as amostras foram embebidas em resina acrílica "LR White medium grade" (London Resin Company, UK) durante um período de 7 dias, sendo mantidas em geladeira para infiltração da resina. Amostras pós-fixadas em ósmio, sofreram duas trocas de resina dentro do intervalo de 7 dias. Subseqüentemente, amostras individuais foram cuidadosamente transferidas com pinça fina para cápsulas transparentes de gelatina contendo resina, orientadas para obtenção de cortes transversais, longitudinais ou paradérmicos e postas a polimerizar em estufa a 60 °C por um período de 18 horas. As cápsulas polimerizadas foram selecionadas, levadas a lupa do ultramicrótomo e lapidadas a mão utilizando lâmina de aço para obtenção de blocos de forma trapezoidal contendo a amostra. A partir destes blocos foram obtidas seções semi-finas (0,7 - 1 µm) e seções ultra-finas (60 - 80 nm) utilizando um ultramicrótomo Reichert-Jung Ultracut E e facas de vidro preparadas em um Knife maker II Reichert-Jung. Seções semi-finas para observação ao microscópio

ótico foram coletadas em lâminas de vidro contendo uma gota de água, fixadas em placa metálica aquecida e imediatamente coradas com azul de toluidina solução 0,1% preparada a partir de uma solução contendo 1% de azul de toluidina e 1% de tetraborato de sódio (bórax) em água, sendo então examinadas em um microscópio ótico Olympus modelo BH2 (Micronal). Cortes seriadas foram preparados como descritos acima e o número e espessura total dos cortes registrada no aparelho de contagem serial (Counter Reichert-Jung). Seções ultra-finas para observação ao MET foram recolhidas em grades de cobre hexagonais de 200 ou 300 mesh, cobertas com uma fina camada de filme plástico de nitrocelulose, piroxilina (solução 2% em amil-acetato) ou de forma opcional em filme de polivinil formol, formvar 15/95 (Shawinigan Resins Corporation, Springfield, Massachusetts, USA) solução 0,3% em clorofórmio, postas para secar sobre papel de filtro e posteriormente contrastadas em acetato de uranila solução 5% em água por 10 minutos e citrato de chumbo solução 0,2% em NaOH 0,01N por 7 a 10 minutos, postos a secar em placas de petri com papel de filtro por 1 hora e então examinados em um microscópio eletrônico de transmissão (modelo EM 900 Carl Zeiss).

2.3.2- Microscopia eletrônica de varredura

Amostras também foram processadas e fixadas em glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato (50 µM. pH 7,0), lavadas no mesmo tampão por três vezes a intervalos de 10 min e, em seguida, pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio (1%). A seguir, as amostras foram lavadas novamente por três vezes em

tampão fosfato, de modo idêntico, e desidratadas em série acetônica crescente (30, 50, 70, 90, 100 % de acetona em água). Em seguida, amostras selecionadas foram transferidas para o equipamento "Critical Point Drying Apparatus" (Mod. CPD 030, Bal-tec), pelo qual se efetuou a secagem completa das amostras mediante substituição da acetona por gás carbônico líquido mantido a alta pressão. Em seguida, transformou-se o CO_2 líquido em CO_2 gasoso pela aplicação de uma temperatura de 36 °C e pressão de 70 atm (ponto crítico de secagem para o CO_2), no qual ocorre mudança de fase sem adição de calor no sistema e redução dos danos de tensão superficial associadas a evaporação, resultando em um espécime completamente seco. Após este procedimento, as amostras foram cobertas com uma película de ouro visando aumentar a condutividade eletrônica, aplicando-se uma corrente de 18 mA e tempo de deposição de ouro de 240 segundos, através do "Automatic Sputter Coater" (Mod. SCD 050, Bal-tec), o qual fornece, em teoria, uma cobertura em torno de 300 nm de espessura. Finalizado o procedimento, as amostras foram examinadas ao microscópio eletrônico de varredura (Zeiss) DSEM 962.

2.3.3- Imunomarcação com partículas de ouro para exame ao microscópio eletrônico de transmissão

Seções ultrafinas (70-80 nm) de tecidos de cancro, selecionadas em microscopia ótica, foram recolhidas em grades hexagonais de níquel (300 mesh), cobertas com filme de formvar e postas a secar em placas de Petri, sobre papel de filtro, para imunomarcação com ouro, conforme Vanderbosch (1986). Todas as

etapas seguintes foram conduzidas utilizando-se como suporte uma tira de Parafilm ("American Can Company") e uma pinça anti-magnética fina para manipulação das grades. A etapa inicial, para bloqueio das reações inespecíficas, consistiu em fazer flutuar a grade, com a face contendo o corte histológico voltada para a superfície de uma gota (50 µl) de solução IGL (soro albumina bovina BSA diluído em PBS1%) pelo período de 1h. Em seguida, as grades foram incubadas a 25 ^{0}C em uma gota (50 µl) de anticorpo primário (AC4558, AC4560, ambos não purificados) diluído a 1:500 em tampão PBS, permanecendo em câmara úmida de 1 a 2 h e lavadas, cuidadosamente, por 30 seg em água destilada e esterilizada. Após essa lavagem, as grades foram imersas em uma gota (40-50 µl) de anticorpo secundário, diluído a 1:100 em solução IGL, por mais 2h, a temperatura de 25 °C. Os anticorpos são produzidos em cabra, contra IgG de coelho, conjugados com partículas de ouro de 15 nm de diâmetro (Auto Probe LM, Amersham,UK). Ao fim desse roteiro, as grades foram lavadas em água destilada e esterilizada, com auxílio de pisseta e totalmente imersas em uma gota de IGL. Repetido este procedimento por três vezes, dentro de um período de 5 min, as grades foram postas a secar sobre papel de filtro e contrastadas com acetato de uranila (5%) por 10 min e citrato de chumbo (0,2%) por 2 min, achando-se prontas para observação ao microscópio eletrônico de transmissão (MET). A reação foi visualizada pela deposição de pontos negros (partículas de ouro de 15 nm) em regiões da seção que expõem os determinantes antigênicos para os quais o soro foi produzido. Foram utilizados dois tipos de controle para o ensaio de imunomarcação com ouro: o primeiro, com grades contendo seções similares às

do tratamento teste, às quais foi aplicada solução de bloqueio (controle IGL) em substituição ao anticorpo primário; o segundo controle consistiu da aplicação do soro de coelho não imunizado com a bactéria (controle pré-imune).

2.3.4- Imunomarcação com partículas de ouro para microscopia ótica

Seções semi-finas de tecido doente (0,7-1 µm), não osmificadas, obtidas no ultramicrótomo, foram colocadas em uma gota de água sobre lâminas de microscópio novas, cobertas com solução de gelatina 1% em água e fixadas a temperatura em torno de 40 ^{0}C . As lâminas contendo os cortes foram então colocadas em câmara úmida, sendo cobertas por solução de bloqueio IGL (composição citada acima) por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, após rápida lavagem em água, foi aplicado o antisoro primário (AC4558, AC4560 e os ambos não purificados), diluído a 1:500, e o material incubado em câmara úmida por 1 hora a 25°C. Utilizando boxes de vidro, as seções foram então lavadas em solução de lavagem (1% Tween 20 em PBS) e água destilada e esterilizada (5 minutos em cada) e secas com papel absorvente. Em seguida, foram aplicados 40-50 µl de anticorpo secundário conjugado com partículas de ouro de 1 nm de diâmetro, diluído a 1:100 em solução IGL por um período de 4 horas a temperatura variando de 20 a 25 ^{0}C, sob câmara úmida. Decorrido esse período as lâminas foram novamente lavadas em solução de lavagem e água destilada e esterilizada por mais 5 minutos e postas para secar, encerrando-se assim o processo de imunomarcação. Para visualização ao microscópio ótico, marcaram-se as partículas de ouro com prata, utilizando o kit Intense SE BL Silver

Enhancement (Laboratory Janssen Life Sciences Products), de acordo com o método descrito por VanderBosh *et al.*(1989). Resumidamente, o método consistiu na mistura (1:1) de inibidor e estimulador, colocando-se então 45 µl dessa mistura sobre as seções em lâmina. A reação de deposição de prata coloidal sobre as partículas de ouro foi monitorada ao microscópio ótico utilizando lente objetiva de 40 aumentos; o tempo ideal de deposição específica ficou em torno de 7 a 9 minutos, à temperatura de 22 a 25 °C. Decorrido esse período, as lâminas foram imediatamente lavadas como descrito anteriormente, secas e coradas com uma solução 0,01% de azul de toluidina, sendo então observadas ao microscópio ótico. A reação foi visualizada pela deposição de um precipitado preto opaco ao redor das partículas de ouro conjugadas ao anticorpo secundário. Foram utilizados dois tipos de controle para o ensaio de imunomarcação com ouro e revelação a base de prata: o primeiro controle com lâminas contendo seções similares ao tratamento teste, às quais foi aplicada solução de bloqueio (controle IGL) em substituição ao anticorpo primário; o segundo controle consistiu da aplicação de soro do coelho antes da imunização com estirpes da bactéria (controle pré-imune).

2.4- Tolerância de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* ao cobre

Os isolados bacterianos foram crescidos em meio Nutriente Ágar, por 48h a ± 28 °C, suspendidos em solução de NaCl 0,85%. A concentração das suspensões foi padronizada para cerca de 10^8ufc/ml, utilizando-se espectrofotômetro digital SPECTRO 22RS (Labomed. Inc.) regulado a 560nm de comprimento de onda e

85% de transmitância. A partir dessas suspensões, foram coletadas alíquotas de 50 µl, adicionadas a tubos rosqueados contendo 1ml de solução de íons de cobre nas concentrações de 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300 µg/ml de Cu^{++}, obtidas a partir de $CuSO_4.5H_2O$. Após período de uma hora, alíquotas de 0,1ml de cada tratamento foram retiradas e semeadas em placas de Petri, contendo meio NA, sem adição subsequente de cobre, conforme método preconizado por Marco & Stall (1983). A sensibilidade dos diferentes isolados foi avaliada após 72h de incubação a $\pm$ 28 ^{0}C, estipulando-se a concentração mínima do metal capaz de inibir a formação de colônias da bactéria. O procedimento descrito encontra-se esquematizado na Figura 7.

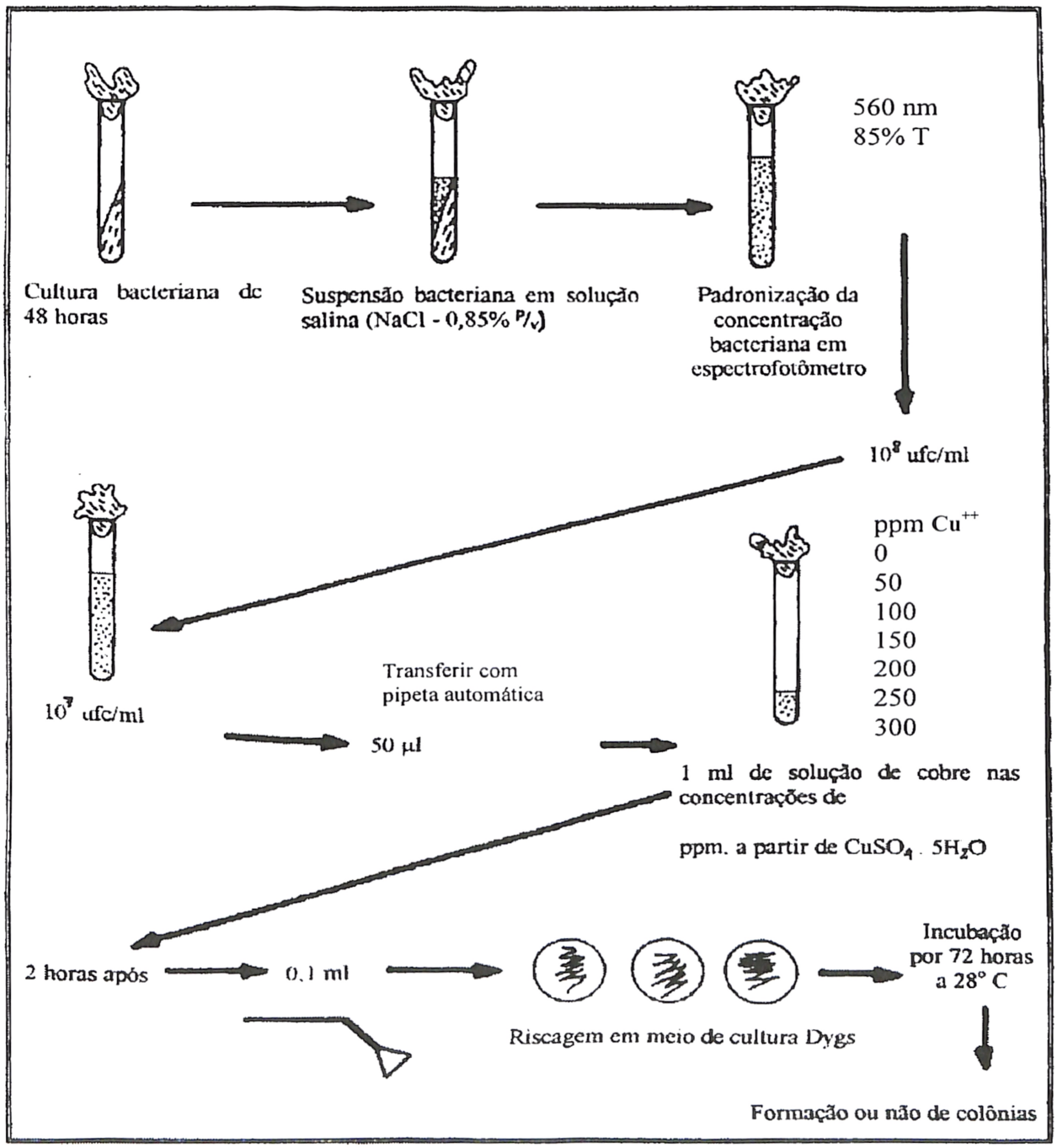


Figura 7. Fluxograma do método empregado para avaliação de resistência de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* ao cobre *in vitro*. Extraído de Aguiar (1997).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Caracterização da bactéria incitante do cancro da videira no Brasil

Sintomatologia da enfermidade

Os sintomas da doença manifestam-se primeiramente nas folhas, sob a forma de pequenas lesões tipo anasarcas, translúcidas, necróticas, angulares e de coloração castanha (Figura 8). A coalescência dessas lesões conduz ao crestamento do limbo foliar. Necroses de igual natureza são também observadas em ramos (Figura 9), gavinhas, engaços dos cachos e bagas (Figura 10). Ainda nas folhas, observam-se descolorações nos pecíolos e ao longo das nervuras. É nos ramos, contudo, que os sintomas são mais prejudiciais, representados pela descoloração dos tecidos vasculares e formação de cancros extensos (até 9cm) e profundos (Figura 11). O desenvolvimento dos cancros resulta na dilaceração de tecidos, obstrução parcial do fluxo de seiva, acarretando subdesenvolvimento, murcha e secamento dos ramos. Sobre os cancros, é freqüente a formação de exsudatos de massa bacteriana. Descrições do quadro sintomatológico do cancro,



Figura 8. Sintomas de manchas necróticas no limbo foliar de videira Red Globe, causados por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

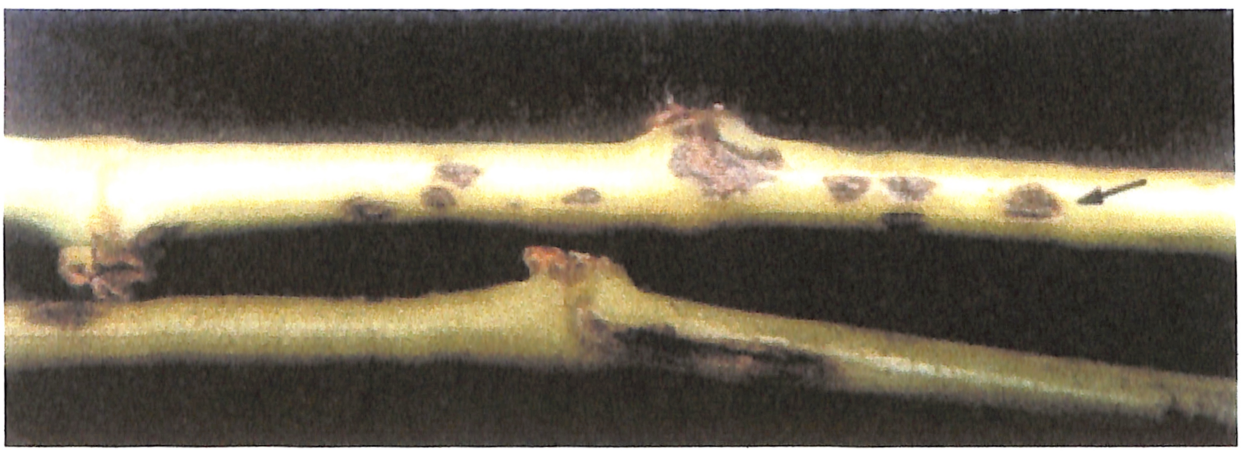


Figura 9. Ramos de videira apresentando cancros causados por intensa exsudação bacteriana é obtida desses tecidos.

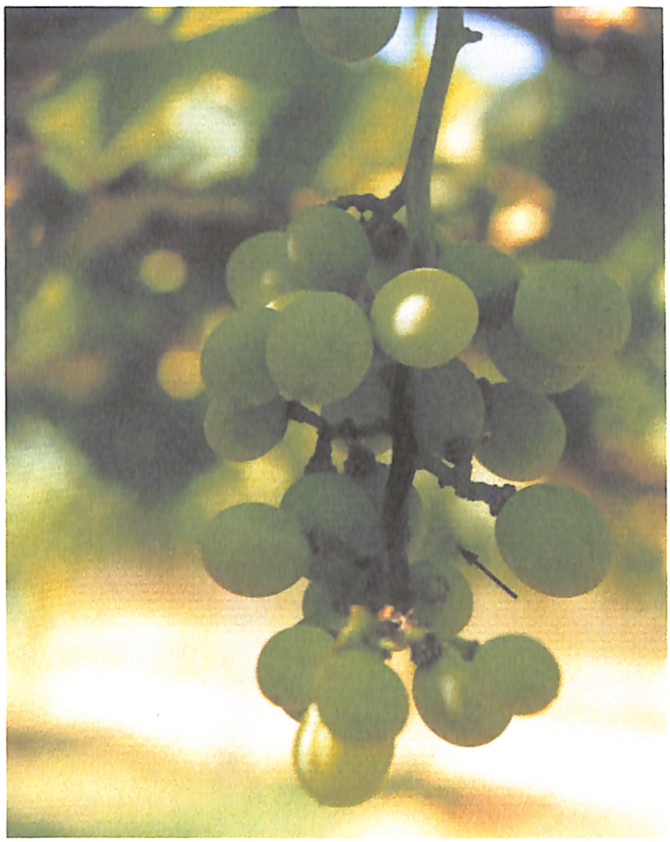


Figura 10. Sintomas do cancro bacteriano sobre engaço de cacho de videira 'Itália'. Notar descoloração do engaço.

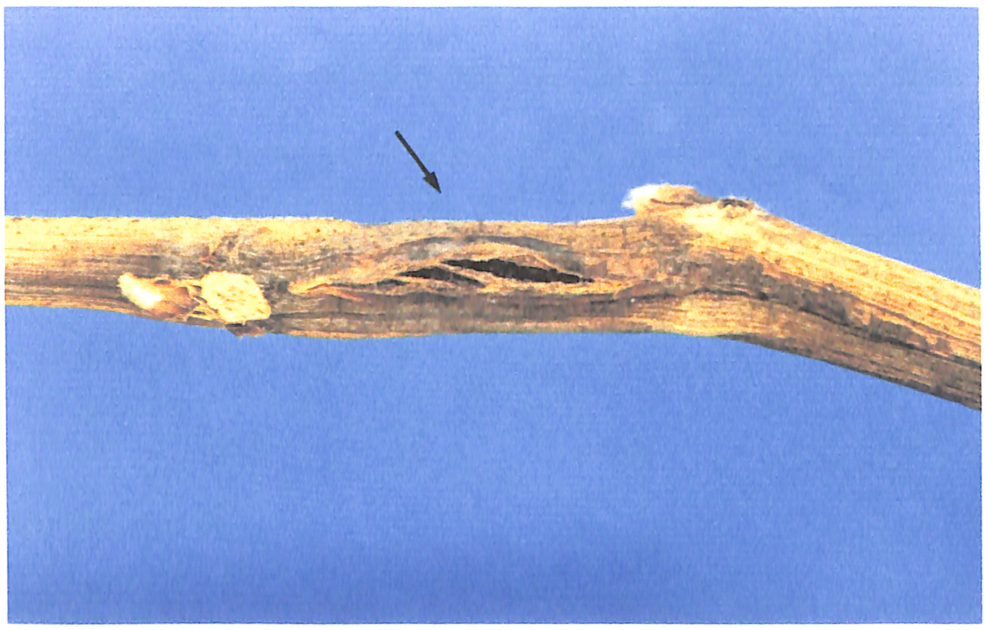


Figura 11. Cancro extenso e profundo em ramo de videira 'Red Globe', provocado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

menos completas, já foram divulgadas (Nayudu, 1972; Bradbury,1986; Chand & Kishum,1990a.; Malavolta Jr. *et al.*,1998; Robbs & Rodrigues Neto,1999).

Os sintomas sobre as bagas, não só depreciam a qualidade da uva como acarretam graves danos à produção. Além da cultivar Red Globe, a bacteriose já foi constatada, embora de forma menos agressiva, em outras cultivares de *Vitis vinifera*, tais como: Itália, Rubi, Benitaka, Festival, Piratininga, Catalunha, Christmas Rose, além das cultivares sem sementes: Perlette e Superior.

Isolamento da bactéria

De partes de videira apresentando a sintomatologia descrita, constatou-se intensa exsudação de bactérias ao microscópio ótico. Suspensões assepticamente obtidas a partir dos exsudatos foram transferidas para placas com os meios NA e DYGS, onde se desenvolveram colônias mucóides, de coloração branca, circulares, convexas e de margens inteiras, após 72h de incubação a $\pm$ 28^{0}C (Figura 12). O diâmetro dessas colônias variou de 3 a 7mm e de 1 a 3mm, nos meios NA e DYGS, respectivamente. Colônias com as mesmas características, porém menores (até 1mm de diâmetro), foram obtidas no meio B de King, sem produção de fluoresceína.

Patogenicidade

Não se verificou reação típica de hipersensibilidade em fumo com nenhum dos isolados dentro de 48h da infiltração. Por outro lado, todos os isolados foram patogênicos à cv. Red Globe, reproduzindo lesões necróticas foliares nas áreas

infiltradas, de coloração castanha e circundadas por um halo clorótico, a partir do sétimo dia pós-inoculação. Após período de 15 dias a contar da inoculação, formaram-se cancros nos ramos, além de crestamento foliar provocado pela coalescência das lesões (Figura 13). Esse crestamento pareceu intensificado por possíveis toxinas produzidas *in situ* pelo patógeno. Reisolamentos a partir dos sintomas manifestados nas plantas inoculadas foram sempre positivos, enquanto que as testemunhas não inoculadas permaneceram sadias até o descarte final.

Características culturais,morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da bactéria isolada

Todos os isolados de videira estudados são caracterizados por células em bastonete, gram-negativas, medindo, aproximadamente, 1,9 – 2,3μm x 0,6 – 0,8μm e apresentando flagelo polar único (Figura 14).

A bactéria mostrou capacidade de hidrolisar esculina, amido e gelatina, foi positiva para proteólise do leite, atividade da catalase e produção de H_2S. Apresentou metabolismo oxidativo e não foi capaz de utilizar asparagina como fonte única de carbono e nitrogênio. Não revelou atividade de urease e não utilizou rhamnose, lactose, glicerol, sorbitol ou ácido tartárico para crescimento. Todas essas características são partilhadas pelos isolados indianos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu,1972; Bradbury,1986; Swings *et al.*, 1993) e outros brasileiros descritos em Malavolta *et al.* (1998) e Ferreira *et al.* (2000). Outras características dos isolados originários do Vale do São Francisco constam da Tabela 2.

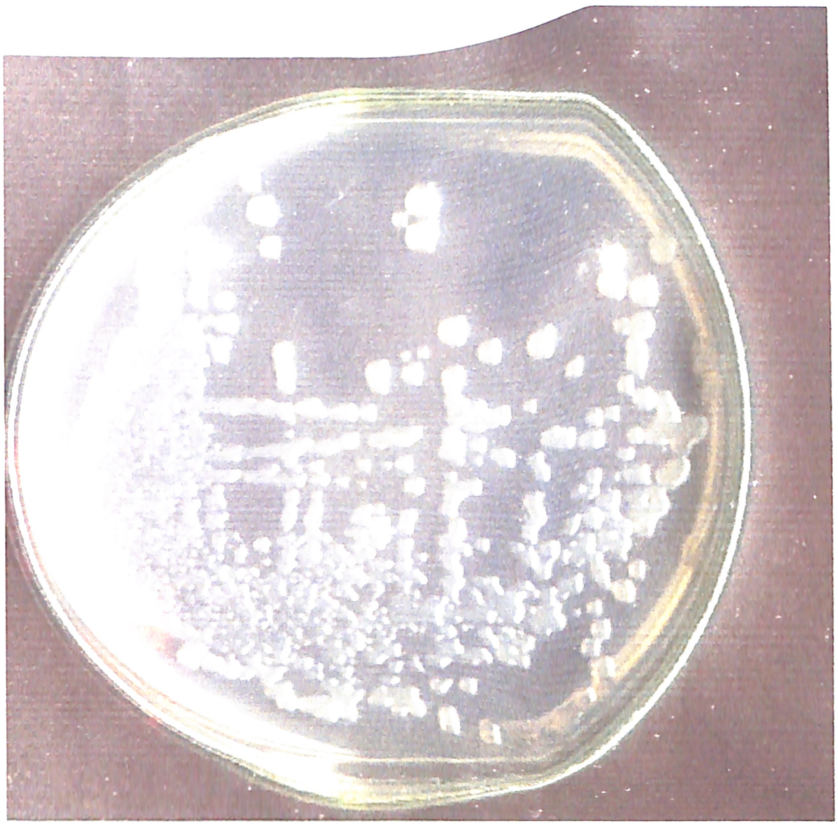


Figura 12. Colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* desenvolvidas em meio de cultura Nutriente Ágar, após 72h de incubação a ± 28 °C.



Figura 13. Sintomas desenvolvidos em videira, cv. 'Red Globe', inoculada com isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* originário do Vale do São Francisco.

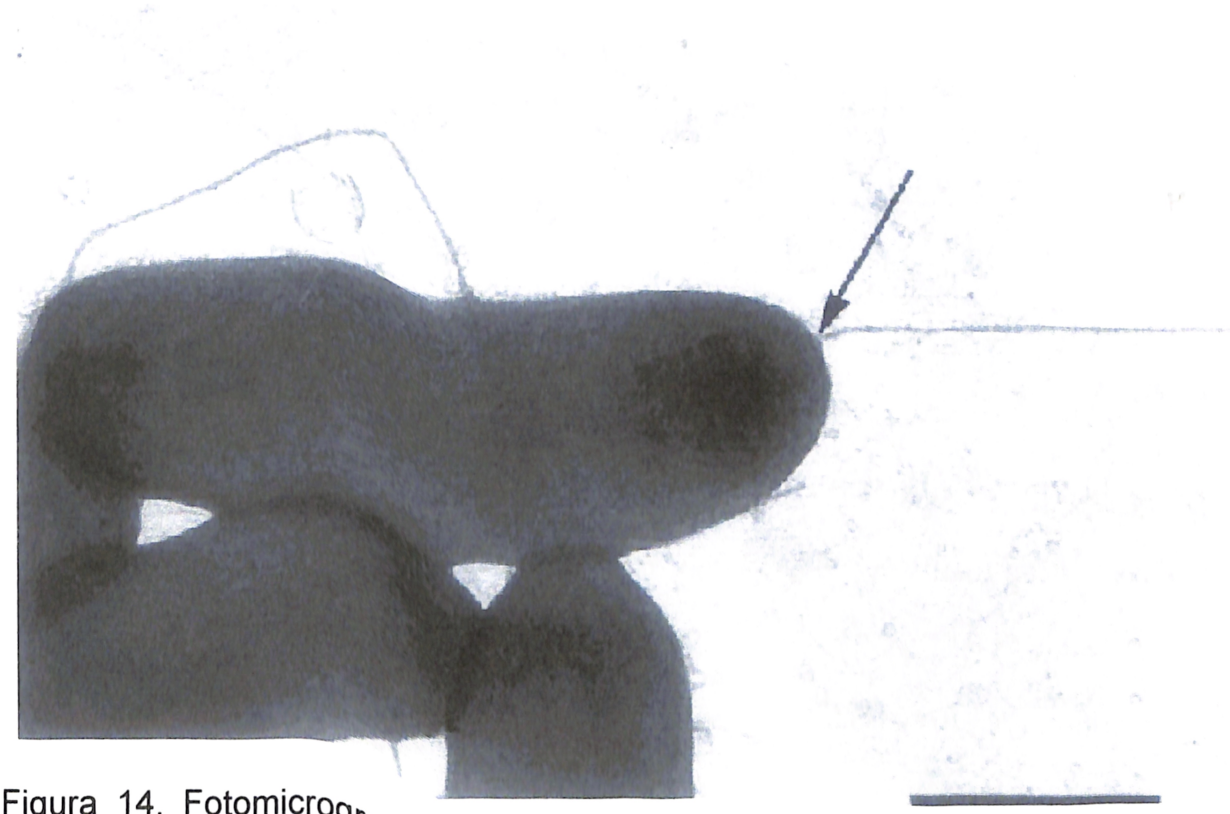


Figura 14. Fotomicrografia de células de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* magnificadas 30.000X, após coloração com acetato de uranila; destaque para o flagelo polar (bar=0,6mm).

O conjunto dos resultados obtidos apontou para o enquadramento da bactéria no gênero *Xanthomonas*, espécie *X. campestris*. Inclui-se, assim, no grupo de patovares dessa espécie que produzem colônias desprovidas de pigmentação amarela (xantomonadina), tais como: *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, *X. campestris* pv. *manihotis* e *X. campestris* pv. *ricinicola* que ocorrem no Brasil (Bondar,1915; Robbs, 1953; Robbs *et al.*,1974).

Espécies de *Xanthomonas* patogênicas à família *Vitaceae*, incluem: *X. c.* pv. *vitiscarnosae* (Moniz & Patel, 1958); *X. c.* pv. *vitistrifoliae* (Padhya *et al.*, 1965); *X. c.* pv. *viticola* (Nayudu 1972) e *X.c.* pv. *vitiswoodrowii* (Patel & Kulkarni, 1951) (Dye ,1978). Dessas, apenas *X. c.* pv. *viticola* e *X.c.* pv. *vitiswoodrowii* são destituídas da capacidade de produzir de xantomonadina, sendo este último patovar específico de *Vitis woodrowii*. Assim, de acordo com os dados da literatura e com as características morfológicas e fisiológicas dos isolados estudados, confirma-se *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* como agente causal do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) no Brasil. A identificação original cabe, portanto, a Malavolta *et al.* (1998), tratando-se da mesma bactéria antes registrada na Índia por Nayudu (1972).

O agente do cancro bacteriano da videira no Brasil, originalmente confundido com *Xylophilus ampelinus* (sin. *Xanthomonas ampelina*) , responsável pelo "crestamento bacteriano da videira" ("Tsilik marasi") e prevalente em países de clima frio, difere marcantemente dessa última espécie. Assim, as duas bactérias são distintas quanto à produção de urease, desenvolvimento das colônias em meio NA, bem como na taxa de crescimento (até 15 dias de idade).

Ainda, *X. ampelinus* caracteriza-se pela pigmentação amarela das colônias, não hidrolisa gelatina ou esculina e difere na utilização de fontes de carbono e de ácidos orgânicos.

Tabela 2. Características bioquímicas e fisiológicas comuns a isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) e procedentes do Vale do Rio São Francisco.

Reação de Gram	-
Tipo de colônia em meio NA	Mucóide
Tamanho da colônia em meio NA (72h , 28^0C)	3 a 7mm
Asparagina como única fonte de C e N	-
Relação com o oxigênio livre	Oxidativa
Oxidase	-
Hidrólise do amido	+
Hidrólise da gelatina	+
Hidrólise da esculina	+
Crescimento em meio de tetrazólio 0,1%	-
Crescimento em meio de tetrazólio 0,02%	-
Temperatura máxima de crescimento	36 ^{0}C
Proteólise do leite	+
Catalase	+
Urease	-
Tolerância a NaCl (3%)	-
Produção de H_2S	+
Ação sobre nitrato	-
Produção de ácido a partir de :	
➢ amido, arabinose, glicose, frutose, manose, galactose, sacarose, manitol , trehalose, melibiose.	+
➢ rhamnose, celobiose, maltose, lactose, rafinose, glicerol, sorbitol, acido tartárico.	-

Dentre as bactérias, apenas *Agrobacterium vitis* e *Agrobacterium* sp., já foram constatadas em cultivos de videira no Brasil, mais precisamente nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Norte e São Paulo (Berian *et al.*, 1991; Lacerda *et al.*, 1991; Berian *et al.*,1992; Oliveira *et al.*,1994), sem no entanto, acarretarem prejuízos significativos. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, pelo que tudo indica, é a primeira espécie bacteriana assinalada sobre videira na região produtora do Submédio do Vale do Rio São Francisco. Alguns dos isolados nacionais da bactéria aqui estudados estão depositados na bacterioteca do Instituto Biológico de São Paulo, Seção de Bactérias Fitopatogênicas, sob os seguintes números de registro: IBSBF 1502, 1505, 1506, 1507, 1510 e 1514.

Espécies hospedeiras de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

Os isolados brasileiros de *Xcvi*, mediante inoculação artificial, mostraram-se patogênicos a diferentes famílias, gêneros e espécies vegetais. Com ambos os métodos de inoculação empregados, infiltração foliar com ou sem perfuração por agulha, a bactéria provocou lesões típicas após sete dias nas seguintes espécies: videira (*Vitis vinifera* L., cv. Red Globe) e porta-enxerto Traviú (IAC106-8); família *Anacardiaceae*: mangueira (*Mangifera indica* L., cv. Tommy Atkins), umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), cajueiro-anão (*Anacardium ocidentale* L.), cajá-manga (*Spondias dulcis* Forst.); e aroeira (*Schinus terebenthifolius* Radii) (Figuras 15, 16, 17 e 18). Em adendo, plantas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss. - Meliaceae), espécie originária da Índia, também foram suscetíveis aos isolados nacionais de *Xcvi*, confirmando o registro de Nayudu (1972). No Brasil, Malavolta

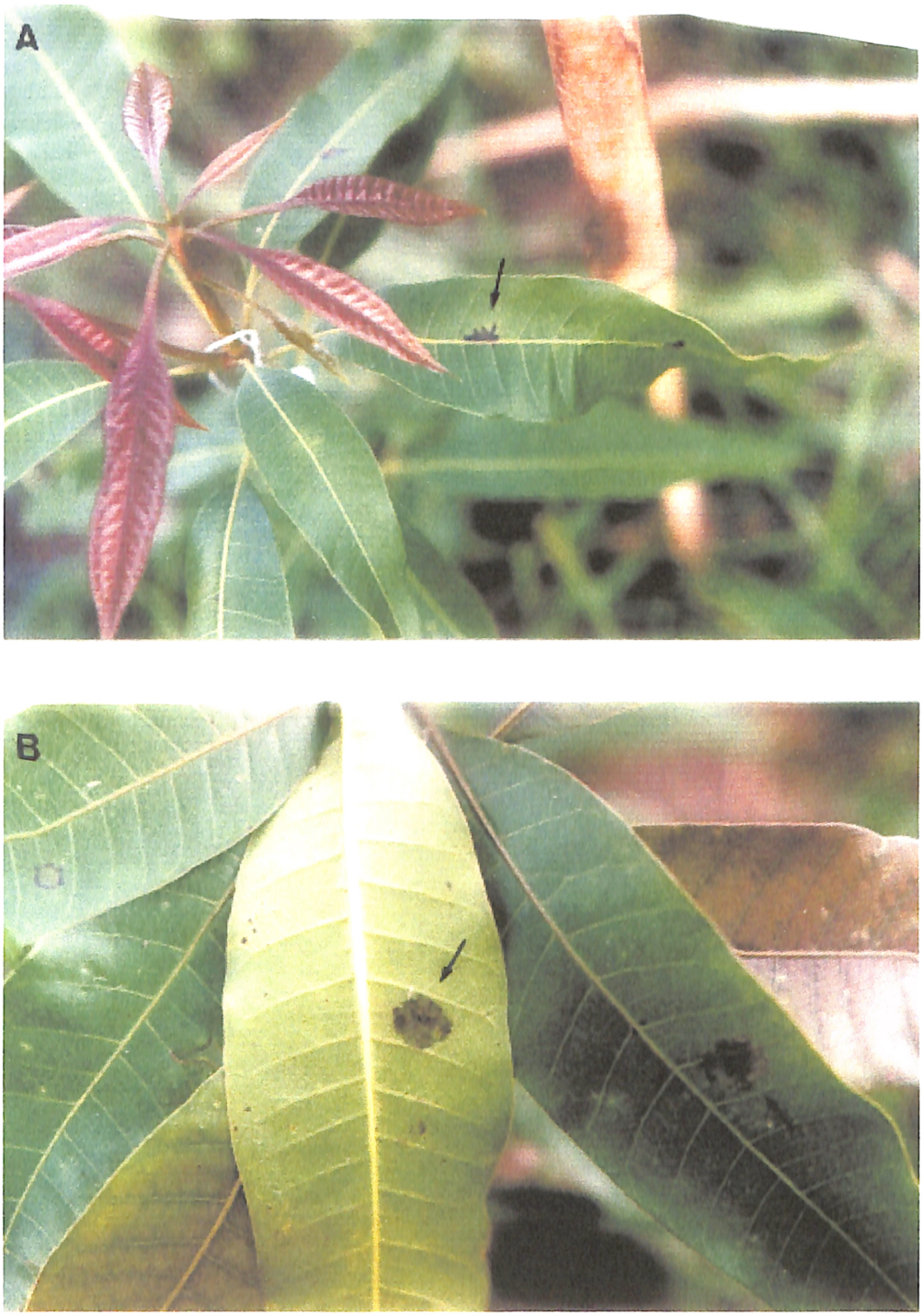


Figura 15. Folhas de mangueira 'Tommy Atkins' inoculadas com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A- necrose desenvolvida após infiltração com suspensão contendo aproximadamente 10^8 ufc/ml; B- necrose e anasarca de tecidos 12 dias após a infiltração.

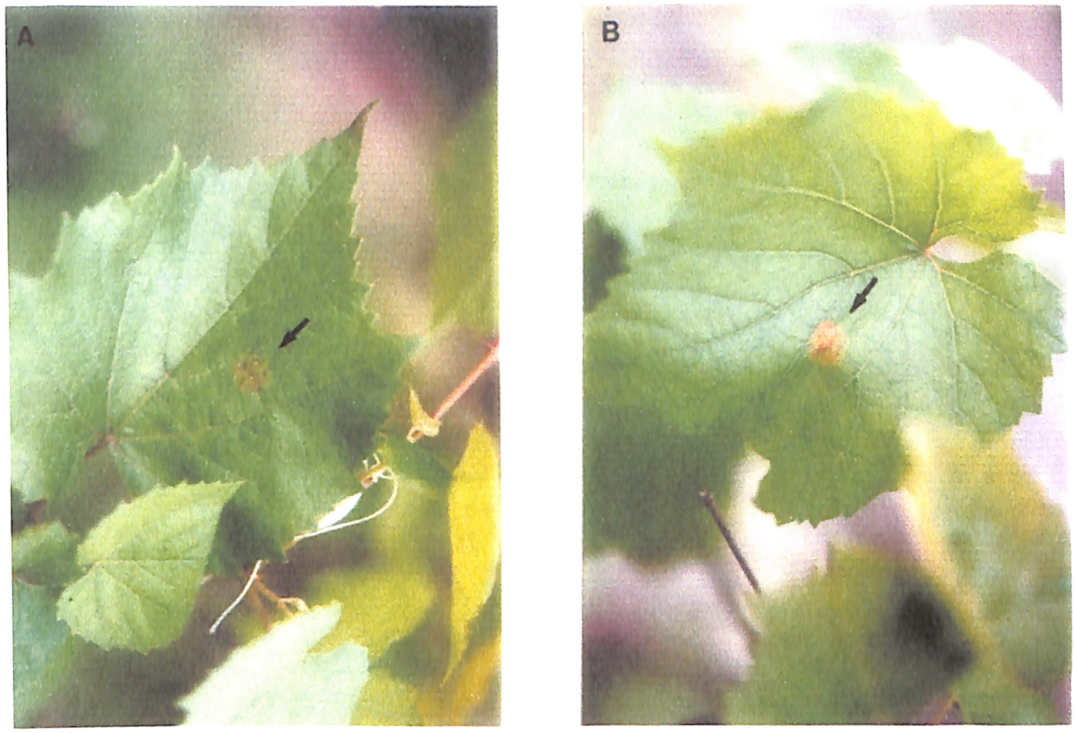


Figura 16. Videira 'Red Globe' apresentando sintomas provocados por infiltração foliar de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com aproximadamente 10^8 ufc/ml. A- clorose correspondente à região infiltrada, após sete dias; B- necrose de tecidos, 13 dias após a infiltração.

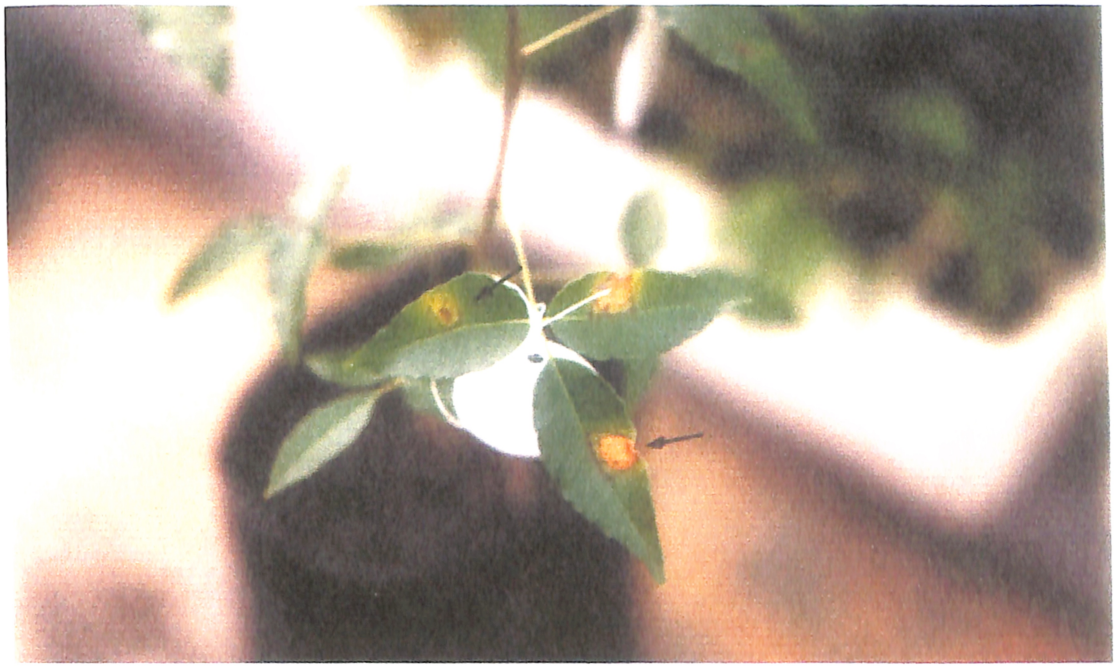


Figura 17. Planta de umbuzeiro (*Spondias tuberosa*) com sintomas foliares decorrentes de infiltração de suspensão de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com, aproximadamente, 10^8 ufc/ml.



Figura 18. Folhas de cajá-manga (*Spondias ducis*) exibindo sintomas foliares decorrentes de infiltração de suspensão de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com, aproximadamente, 10^8 ufc/ml.

& Almeida (2000) , ao inocularem plantas de nim, concluíram, em concordância com resultados preliminares antes publicados por Araujo *et al.* (1999), pela patogenicidade de isolados de *Xcvi* do Vale do São Francisco para aquela espécie. O fato é significativo, uma vez que o nim estaria sendo recomendado aos viticultores do nordeste brasileiro para composição de "quebra-ventos" - já que apresenta resistência a longos períodos secos e tolerância a altas temperaturas - indicando a urgente necessidade de investigações de campo, quanto à possibilidade do nim servir como hospedeiro alternativo natural de *Xcvi*. Da mesma forma, a constatação da patogenicidade da bactéria para mangueira, também cultivada no Submédio São Francisco, confirmou o registro de Chand & Kishum (1991), apontando, mais uma vez, para o provável potencial de espécies presentes em áreas de cultivo da videira como fontes locais de inóculo.

A ocorrência de *Xcvi* sobre as espécies vegetais acima citadas não foi ainda observada na natureza, mas sua capacidade de infectar essas plantas, sob condições artificiais de inoculação, pode representar um dado importante do ponto de vista epidemiológico.

A hipótese levantada deveria ser, assim, pesquisada, principalmente levando em consideração a expansão da fruticultura na região do Submédio São Francisco, não sendo raros os plantios de videira, mangueira e outras espécies em uma mesma propriedade rural.

O exercício comparativo entre *X. c.* pv. *mangiferaeindicae*, agente da mancha bacteriana da mangueira, e *X. c.* pv. *viticola* reveste-se de interesse pelo fato de que ambas são originárias da Índia e, ainda, por se tratarem de patovares

tipicamente apigmentados, embora isolados pigmentados (colônias amarelas) de *X. c.* pv. *mangiferaeindicae* já tenham sidos isolados, inclusive no Brasil. (Robbs *et al.*, 1978; Pruvost & Luisetti, 1989). Constatam-se, também, semelhanças na natureza dos sintomas ocasionados, em características fisiológicas e bioquímicas, e na patogenicidade (alguns hospedeiros comuns). Assim, *X. c.* pv. *mangiferaeindicae* além de patogênica à mangueira, infecta outras espécies da família Anacardiaceae, como por exemplo: cajueiro-anão (*Anacardium occidentale* L.) (Patel *et al.*, 1948a,b) e aroeira (*Schinus terebenthifolius* Radii; Pruvost *et al.*, 1992). Por outro lado, desconhecem-se registros de que *X. c.* pv. *mangiferaeindicae* seja patogênica à videira.

3.2- Uso de anticorpos policlonais na detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

Determinação do título

Através do método de ELISA foi construída a curva de diluição, de maneira a indicar a concentração ideal (título) dos anticorpos purificados. Analisando o gráfico (Figura 19), observa-se que os soros apresentaram reatividade acima da diluição de 1:500, com valores de absorbância superiores aos controles (ensaio em branco), representados pelos poços das reações com soros pré-imunes. Os maiores valores encontrados nesses controles foram tomados como pontos de referência, abaixo dos quais as reações foram consideradas negligenciáveis.

O critério adotado para definição do título de antisoros geralmente baseia-se na diluição máxima de maior reatividade. Entretanto, é importante observar que diluições crescentes de IgG tendem a promover um aumento de especificidade associado à queda de sensibilidade. Tal efeito paradoxal deve ser sempre considerado na definição do título do antisoro, sendo fortemente dependente do objetivo da pesquisa. Por exemplo, em ensaios de detecção *in situ,* onde a concentração do antígeno é variável e onde uma série de sítios antigênicos podem aumentar consideravelmente as reações inespecíficas, recomendar-se-ia o emprego de diluições do IgG menores do que aquelas utilizadas em ensaios com culturas puras da respectiva bactéria. Analisando o gráfico da Figura 19, conclui-se que diluições até 1:500 devam ser aquelas empregadas para os antisoros purificados (anticorpos AC4558 e AC4560).

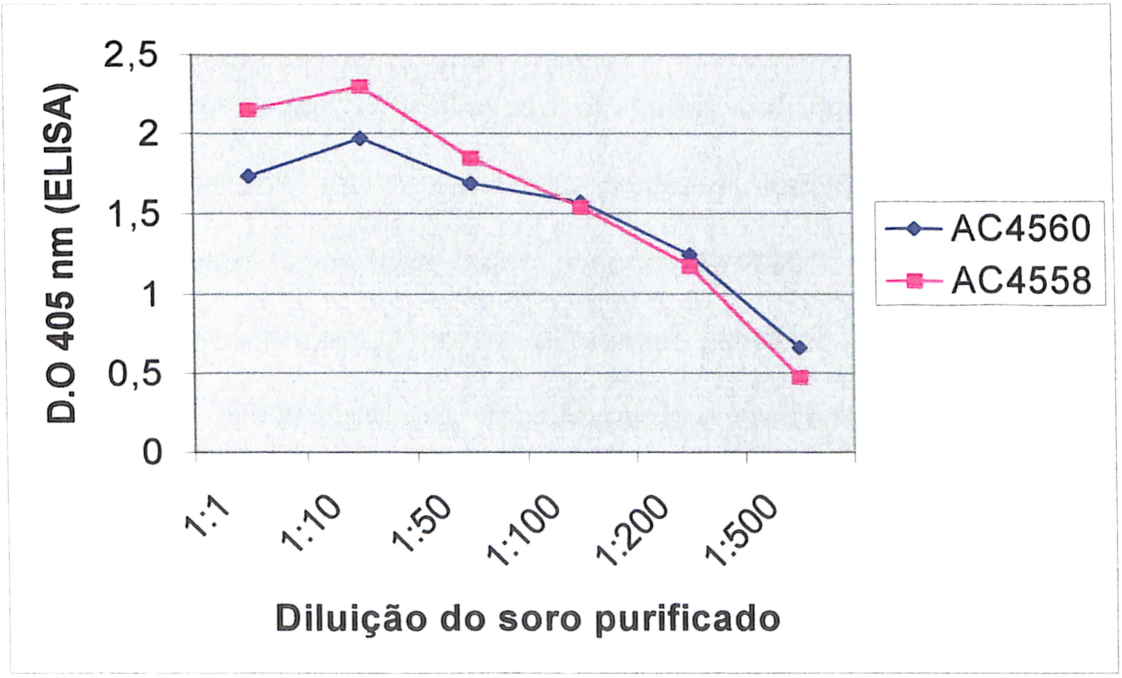


Figura 19. Determinação do título dos anticorpos policlonais AC4558 e AC4560, produzidos contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Valores médios de três repetições.

Com relação a determinantes antigênicos, a associação desses anticorpos policlonais com partículas de ouro (IGL) em reação com *Xcvi*, acusou prevalência de epítopos na superfície bacteriana (Figura 28C).

Testes de reação cruzada

Também importante para subsidiar estudos subsequentes de imuno-detecção é a determinação da especificidade dos antisoros purificados. Essa determinação foi derivada de testes de reação cruzada com os anticorpos AC4558 e AC4560 na diluição de 1:10, contra um número de espécies de bactérias fitopatogênicas. Os resultados desses testes encontram-se na Tabela 3, sendo os valores obtidos expressos em percentuais de reação cruzada, adotando-se como 100% os padrões de densidade ótica (D.O) referentes aos isolados de *Xcvi* que deram origem ao antisoro. Analisando os dados da Tabela 3, verifica-se que ambos os anticorpos foram sensíveis contra isolados da espécie original, alcançando-se, para a maioria deles, valores de 100%. Embora tenham sido verificadas reações cruzadas contra diferentes espécies de fitobactérias, estas ocorreram em baixos percentuais, não chegando a invalidar o imunoensaio. Cabe, ainda, ressaltar que as reações cruzadas mais elevadas (respectivamente 30% e 29%) relacionaram-se a *X. c.* pv. *campestris* e *X. c.* pv. *mangiferaeindicae,* as quais diferem de *Xcvi* apenas em nível subespecífico, o que poderia justificar as afinidades serológicas constatadas.

Reações cruzadas entre patovares de *Xanthomonas* com antisoros policlonais têm sido registradas, mas são de pouca importância prática, uma vez que esses patovares possuem hospedeiros específicos (Alvarez e Lou, 1985). Mesmo anticorpos monoclonais podem desenvolver reações cruzadas, conforme se verificou em estudo com *X. c.* pv. *mangiferaeindicae* (Sanders *et al.*, 1994). Comparados entre si, os anticorpos AC4558 e AC4560 revelaram padrão homogêneo de reatividade. Exemplos disto são os valores de 100% obtidos contra os isolados ENA-4558 e ENA-4560 de *Xcvi* para ambos os anticorpos. Instâncias em que para um mesmo isolado de Xcvi, valores diferentes de D.O. foram registrados, podem ter tido origem em afinidades por determinantes antigênicos (epítopos) ou, mesmo, em decorrência de falhas de manipulação.

Contudo, os resultados deste estudo demonstraram a qualidade dos anticorpos AC4558 e AC4560, ambos com especificidade em nível de patovar. Anticorpos policlonais com esse grau de afinidade poderão servir à identificação de *Xcvi* e à sua detecção em material doente de videira, principalmente em elementos de propagação vegetativa, apoiando programas de certificação com o objetivo precípuo de restringir a disseminação do agente do cancro bacteriana da videira para outras regiões produtoras, dentro e fora do país.

Tabela 3. Especificidade de anticorpos policlonais produzidos contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (valores de densidade ótica expressos em %).

Espécie e isolado	Anticorpos	
	AC4560	AC4558
Xanthomonas campestris pv. viticola		
ENA-4558	100	100
ENA-4560	100	100
ENA-4557	95	100
ENA-4561	92	97
ENA-4562	100	92
X. campestris* pv. *mangiferaeindicae		
ENA-4577	29	27
***X. campestris* pv. campestris**		
ENA-4556	30	25
Pseudomonas syringae* pv. *tomato		
ENA-4545	15	25
Ralstonia solanacearum		
ENA-4460	18	20
Clavibacter michiganensis.* subsp. *michiganensis		
ENA-4547	0	0
Herbaspirillum seropedicae		
Z67 *	8	6
***Erwinia* sp.**		
ENA-4551	11	16
Agrobacterium tumefaciens		
ENA-4580	13	9

(*) Cepa fornecida pela Embrapa Agrobiologia.

3.3- Relações patógeno-hospedeiro e perfil epidemiológico

Superfícies de hastes e folhas com sintomas do cancro bacteriano da videira e também de folhas assintomáticas, provenientes de áreas afetadas, revelaram intensa colonização de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. As observações feitas ao MEV permitiram afirmar-se que as células bacterianas aderem randômicamente às superfícies vegetais por meio de fixação apolar em monocamada (Figuras 20 e 28A), raramente formando agregados, e que maior freqüência dessa adesão ocorre em regiões do limbo foliar, sobre nervuras e tricomas.

O papel da adesão superficial em interações envolvendo plantas e bactérias não é completamente conhecido. Porém, é lícito pressupor que uma vez as bactérias atingindo um sítio favorável, sua habilidade de resistir à remoção constitui-se em vantagem seletiva. Nesse sentido, De Cleene (1989) considerou a adesão de *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* e de *X. c.* pv. *oryzicola* a tricomas de folhas de arroz como mecanismo responsável por aumentar e estabilizar a população residente. Adicionalmente, a adesão de bactérias fitopatogênicas a plantas suscetíveis, tem sido considerada, em muitos casos, como um evento essencial no processo de infecção. Além disso, para que exerça um efeito significativo sobre a fisiologia da planta hospedeira, a bactéria precisaria antes colonizar efetivamente a superfície (Romantschuk,1992).

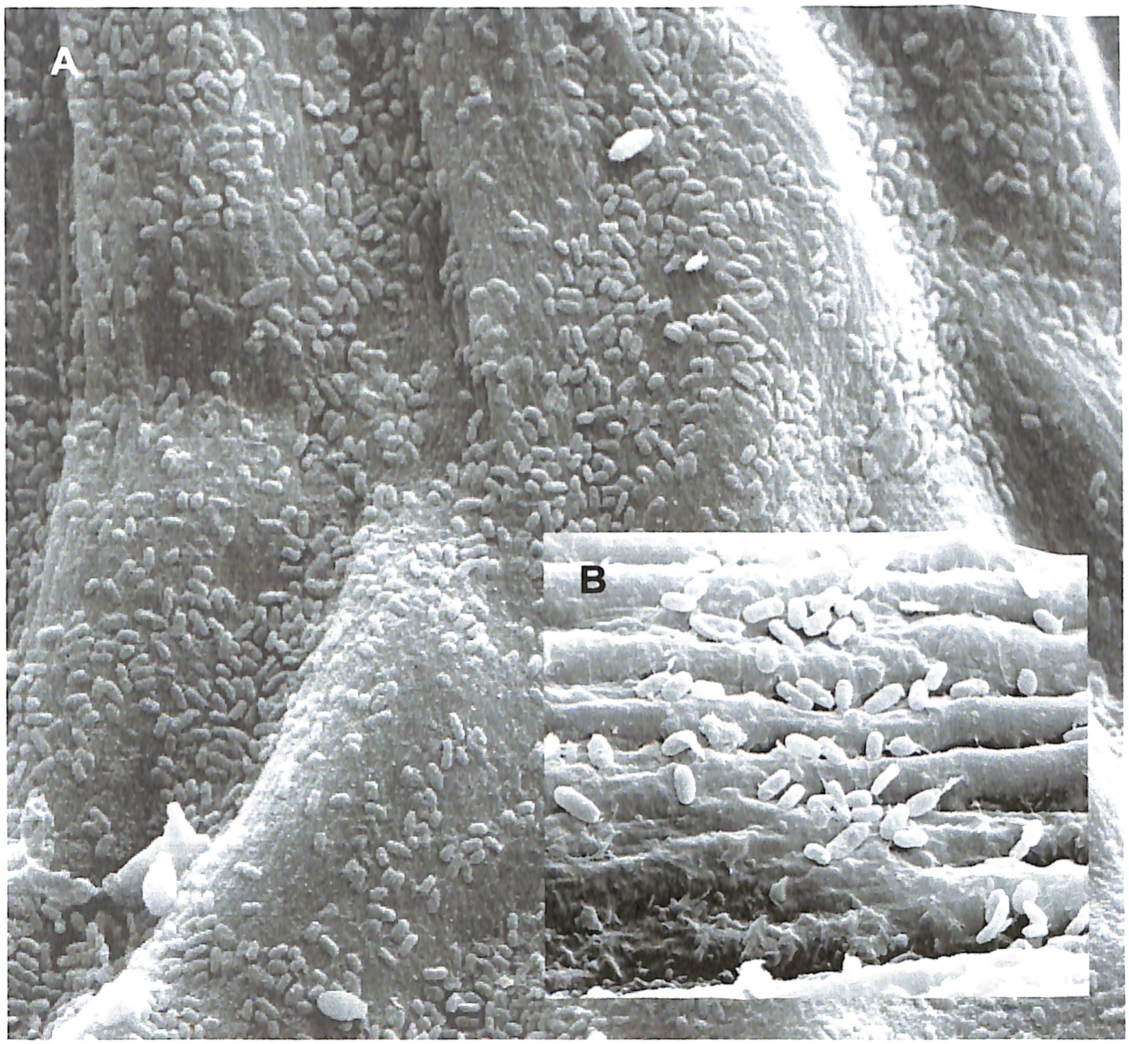


Figura 20. Fotomicrografia eletrônica de varredura (FMVE) de limbo foliar assintomático de videira 'Red Globe', evidenciando população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, aderida em monocamadas. A- 3000X ; B-detalhe 5000X.

Continuando o estudo da interação bactéria-planta, ainda sobre o filoplano de videira, reuniram-se evidências sobre as principais vias de infecção. Foi observada a deposição de grande número de bactérias sobre células-guarda e cavidades das aberturas estomáticas nos tecidos foliares doentes, e mesmo naquelas assintomáticas (Figura 21). De forma surpreendente, exames de amostras foliares assintomáticas, apontaram os tricomas como principais sítios de colonização do filoplano, com densas populações da bactéria aderidas à sua superfície (Figura 22), indicando possível participação na infecção por *Xcvi*. A penetração da bactéria por estômatos e tricomas, concorreria para o desenvolvimento dos primeiros sintomas da enfermidade, que se manifestam através de anasarcas no limbo foliar, seguidas de pequenas lesões necróticas e profusas (Figura 8).

Os estômatos, por ocorrerem em grande número, são tidos como as aberturas naturais mais importantes para penetração de fitobactérias que incitam enfermidades de parte aérea (Goodman ,1982). Assim, vários estudos usando microscopia ótica e eletrônica de varredura confirmaram o papel relevante dos estômatos como sítios de infecção. Como exemplos, podem ser relacionados *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (Miles *et al.*,1977), *X. c.* pv. *cajani* (Shekhawat & Patel, 1979), *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Yamanaka *et al.*,1980), *P.syringae* pv. *avenae* (Matsuda & Sato, 1983) e *X. c.* pv. *manihotis* (Verdier *et al.*, 1990). Próximas ou sobre os estômatos, essas bactérias podem multiplicar-se rapidamente, invadir a câmara sub-estomática e, em seguida, os espaços intercelulares do mesófilo. A câmara sub-estomática funcionaria como via de

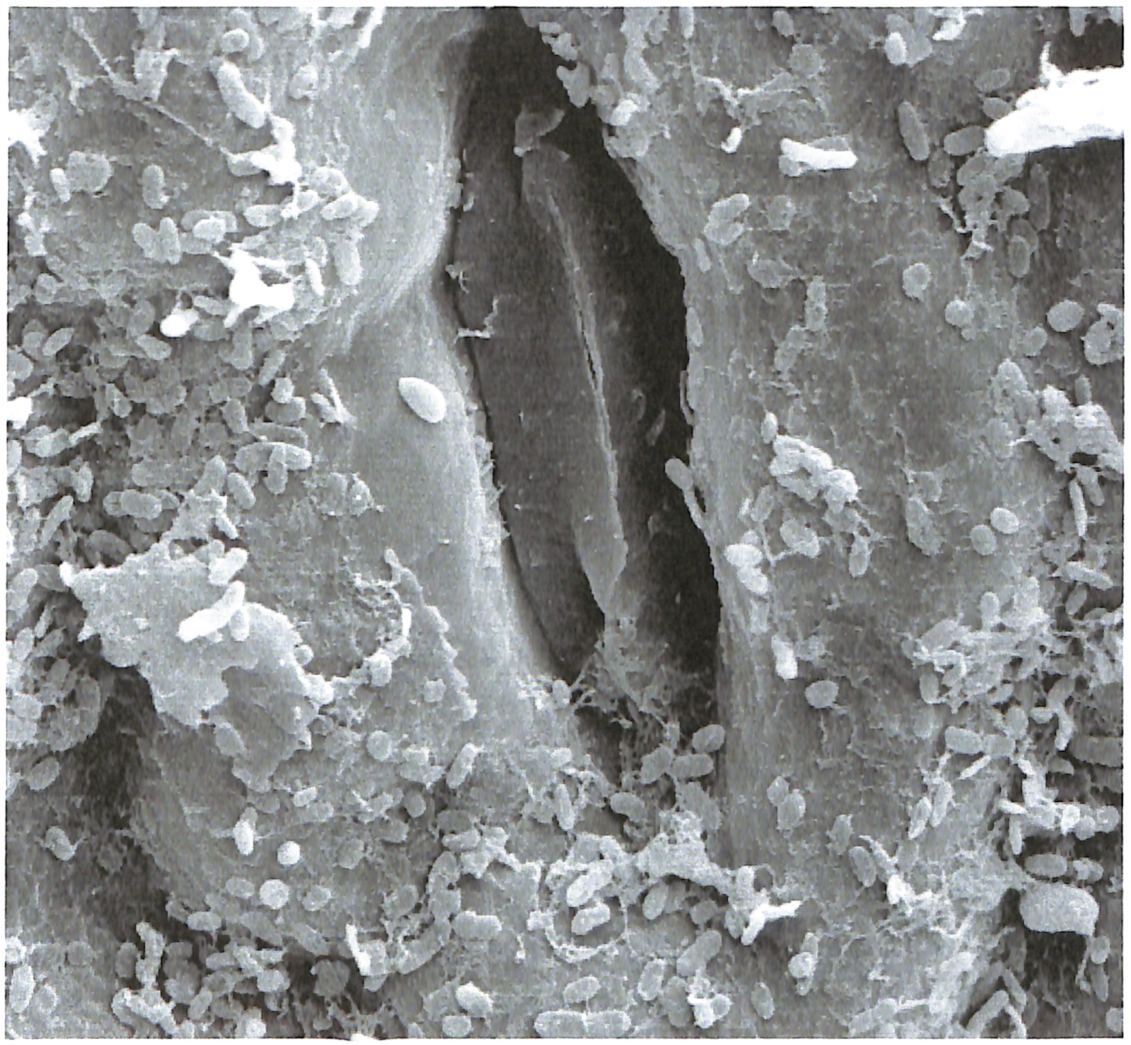


Figura 21. Superfície do limbo foliar assintomático de videira 'Red Globe', colonizada por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* na proximidade de um estômato. A=3000X.

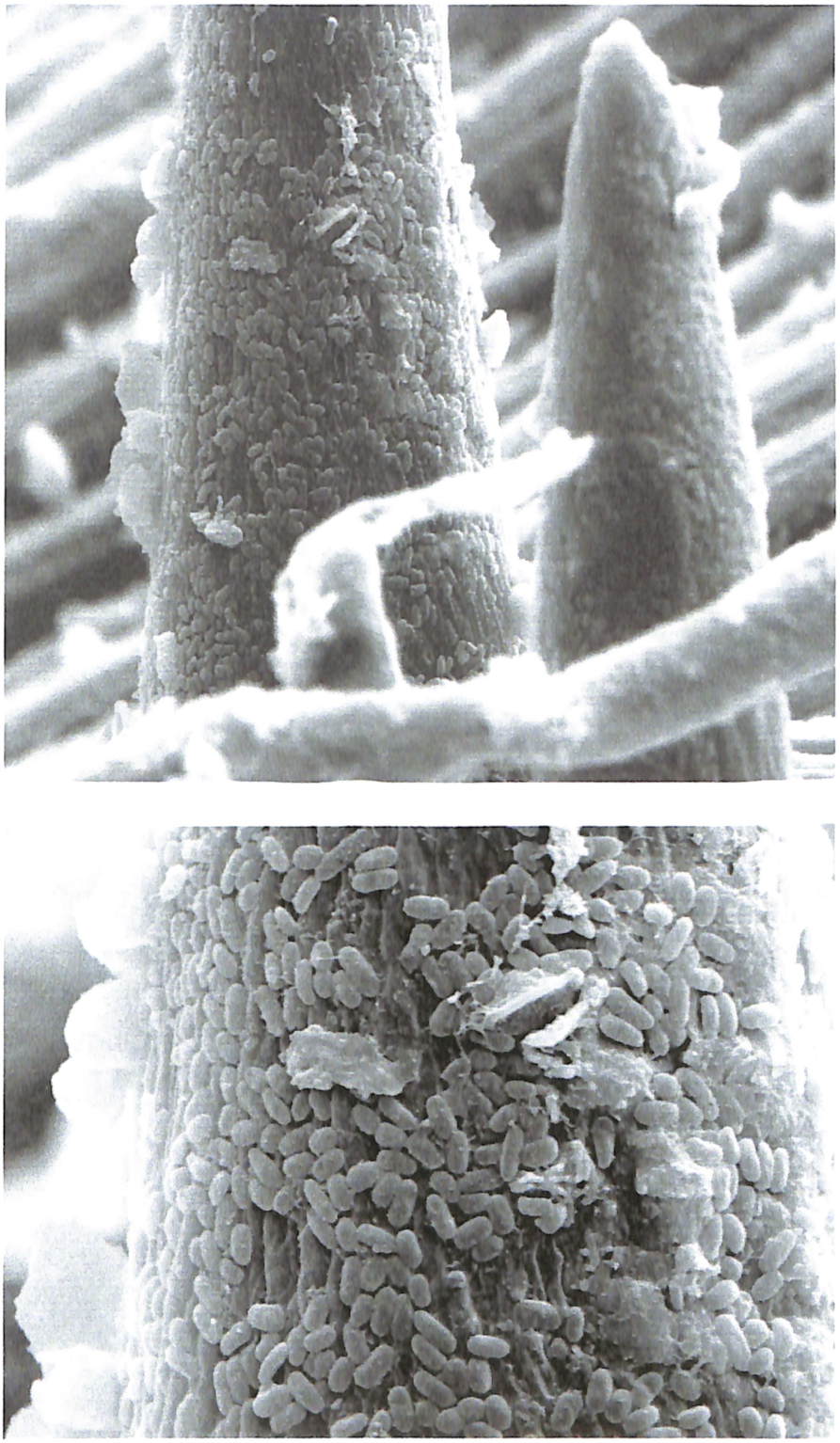


Figura 22. Colonização de tricoma no limbo foliar assintomático de videira 'Red Globe' por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A-2100X ; B-detalhe 5000X.

ingresso e saída para as bactérias, que delas emergem na forma de exsudatos de massa bacteriana, constituindo inóculo secundário para disseminação (Miles *et al.*,1977).

No que se refere aos tricomas, sua freqüência na superfície foliar, analogamente aos estômatos, varia com a espécie e com a idade da planta, sendo maior em folhas mais jovens e na face abaxial. Sabe-se que essas estruturas são extremamente frágeis, rompendo-se facilmente sob ligeira pressão. Schneider & Grogan (1977), trabalhando com genótipos de tomateiro contrastantes quanto à densidade de tricomas foliares e infectados com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, concluíram que os mesmos servem como habitat para sobrevivência de populações epífitas da bactéria durante períodos de seca. Ademais, a base dos tricomas freqüentemente se rompe como resultado da proliferação da bactéria, permitindo infecção da planta (Bashan *et al.*,1981). No patossistema *Erwinia amylovora* – macieira, tricomas de folhas servem não somente como portas de infecção, mas também como rota potencial para ingresso da bactéria no floema (Goto,1992).

A presença de tricomas, mesmo não sendo essencial para a infecção de *Xcvi* em videira, já que esta também ocorreria através de estômatos e ferimentos, pode contribuir significativamente para a incidência da doença e crescer de importância em orgãos da planta hospedeira em que as aberturas estão ausentes ou em número reduzido. Isto possivelmente explicaria situações interessantes em Petrolina, quando não se observam sintomas do cancro bacteriano nas folhas, mas sim diretamente nos cachos e frutos, inviabilizando a colheita.

Ainda com relação à penetração, a interpretação das fotomicrografias 20, 21 e 22 sugere que injúrias ou ferimentos na parte aérea da videira atuem também como sítios de infecção para *Xcvi*, tanto quanto ou mais do que as próprias aberturas naturais, principalmente se considerarmos as práticas culturais da viticultura moderna, que incluem constantes operações de poda, desbaste e raleio de cachos, expondo os tecidos internos e possibilitando seu contato direto com a bactéria. Nesse sentido, Chand *et al.* (1991a) registraram que epidemia do cancro da videira foram propiciadas quando podas foram executadas em períodos chuvosos.

Investigando tecidos internos de folhas, ramos e pecíolos lesionados, constatou-se perda de integridade, associada à presença de matriz polisacarídica (Figura 23). Massas densas constituídas de células bacterianas foram detectadas ao MEV, preenchendo espaços intercelulares dos tecidos de parênquimas paliçádico (Figura 24) e vascular, e de lúmem do xilema (Figura 25). Adicionalmente, através da imunomarcação com partículas de ouro associadas aos anticorpos AC4558 e AC4560 e precipitação com prata dessas amostras, confirmou-se, de fato, a identidade de *Xcvi* na colonização de células do parênquima xilemático e de vasos condutores (Figuras 26D, E;F e 28C, D).

Em estádios avançados da doença, acentuada maceração celular foi verificada (Figuras 23; 26C; 27 e 28A,D), com colônias bacterianas distribuídas aleatoriamente nas regiões já degeneradas (Figuras 26D, E e 28D, C). Imunomarcação desses tecidos doentes revelou invariável presença de *Xcvi* em meio a uma matriz fibrilar, constituindo halo eletrotransparente ao redor das



Figura 23. Fotomicrografia ótica (FMO) de seção longitudinal de pecíolo de videira cv. Red Globe exibindo sintoma de cancro causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Notar extensiva perda de integridade tecidual (✯) associada à presença de matriz polisacarídica (➡). bar= 20μm. (✳) Células contendo tanino e deposição de polifenóis.



Figura 24. Massa de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio ao parênquima paliçádico de folhas de videira 'Red Globe'. A=2100X.

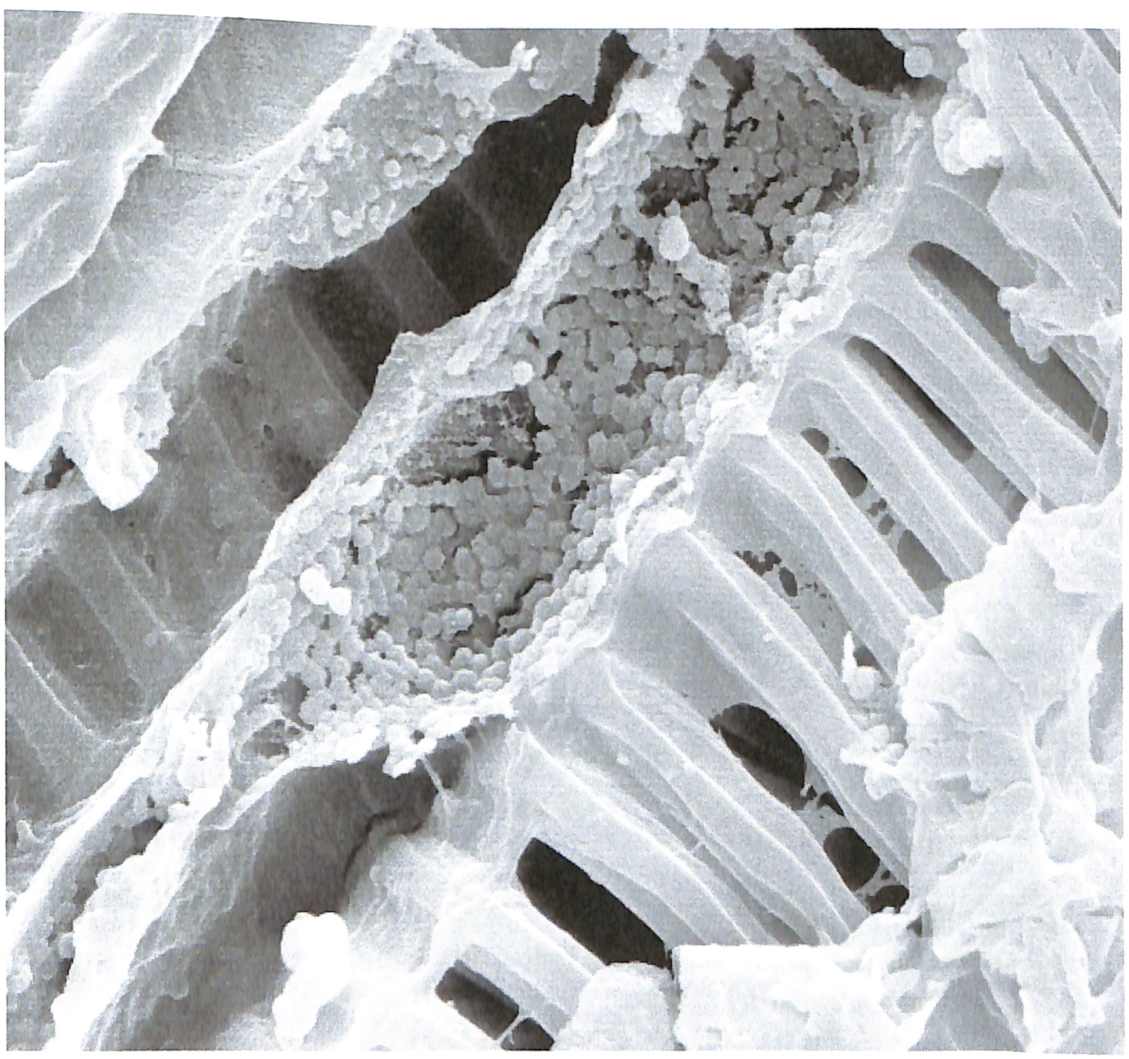


Figura 25. FMEV de região do xilema de videira 'Red Globe' infectada por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, mostrando colonização do parênquima. A=3000X.

células bacterianas e sugerindo seu envolvimento na desfibrilação da parede celular vegetal (Figura 28A, B, C, D). Acredita-se que, devido à degeneração detectada, ocorra congestionamento de água nos tecidos infectados e conseqüente exsudação da bactéria. As imagens revelam, ainda, o progresso da invasão do tecidos pela bactéria que, após multiplicar-se nos espaços intercelulares, invadiria células de parênquima e, a partir daí, os feixes de vasos de xilema e floema adjacentes (Figuras 26A;B). Nesse contexto, após alcançados os vasos, ocorreria colonização sistêmica da videira por *Xcvi* (Figura 26D, E, F). Essa colonização seria responsável pelas descolorações dos tecidos internos de ramos, de nervuras foliares e engaços, de onde sempre se verifica intensa exsudação bacteriana.

A análise das fotomicrografias obtidas de órgãos aéreos de videira, permitiram, assim, estabelecer que *Xcvi* reside sobre folhas doentes com ou sem sintomas, em áreas de produção de uva do Submédio São Francisco, onde o cancro é registrado. Essas populações epífitas, em parte, seriam responsáveis pela sobrevivência local da bactéria e pela manutenção de inóculo na ausência de condições predisponentes à infecção.

A habilidade de bactérias fitopatogênicas sobreviverem e se multiplicarem sobre superfícies de plantas sem desenvolver doença é bem conhecida (Leben,1965). Muitos patovares de *Xanthomonas campestris* sobrevivem como epífitas durante os ciclos das respectivas doenças. Isto, tem sido documentado para os patovares *corylina* (Gardan & Devaux,1983), *juglandis* (Luisetti *et al.*,1975; Mulrean & Schroth, 1982), *malvacearum* (Moffett & Wood, 1985; Wrather *et*

Figura 26A. FMO de seção longitudinal de pecíolo de videira, cultivar Red Globe, exibindo sintoma de cancro causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Bactérias colonizando lúmen dos vasos de metaxilema (**x**). Notar exsudação de microcolônia para sítios de vaso adjacente, através de pontuações primárias (➡). bar= 5μm.

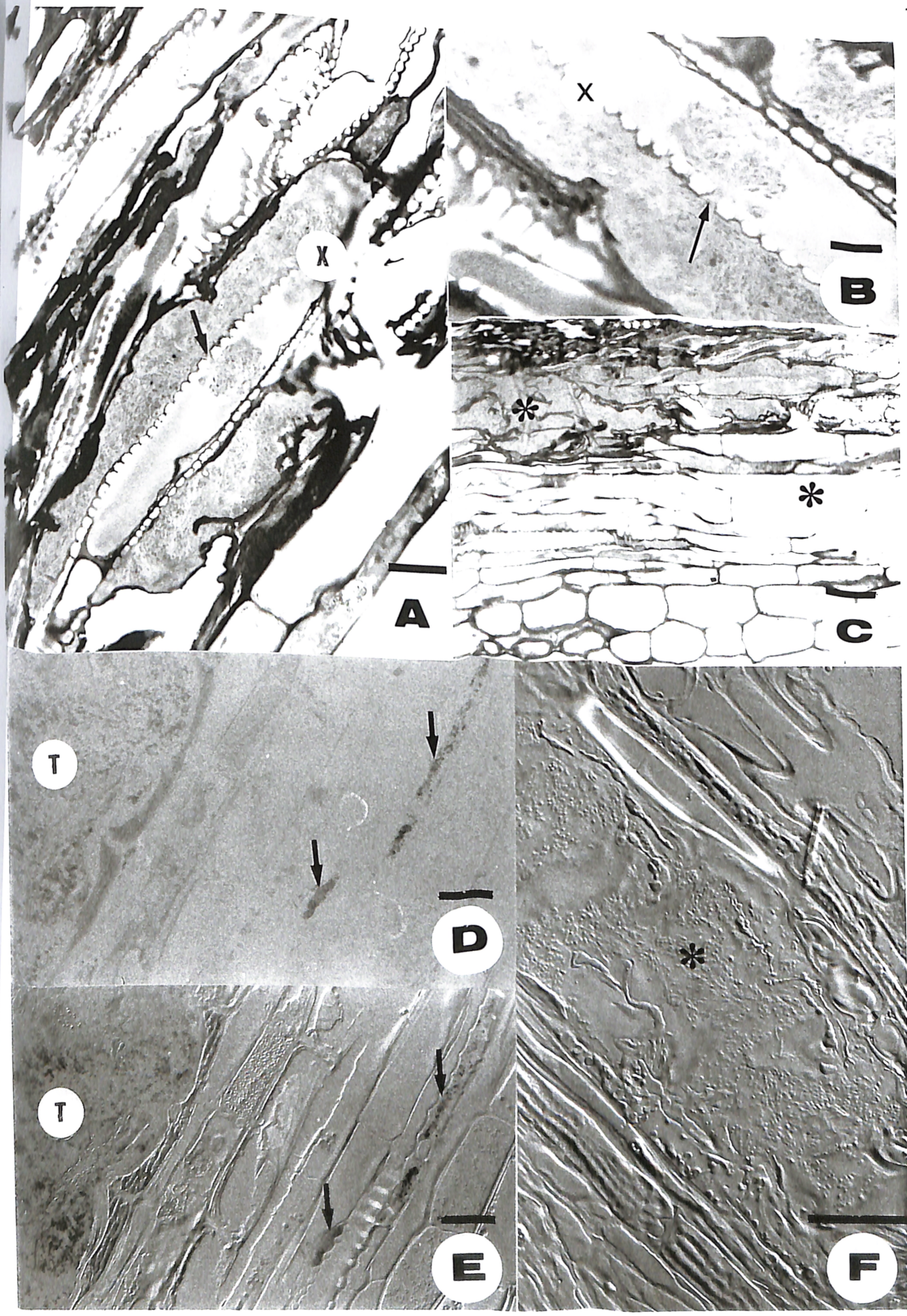
Figura 26B. FMO de detalhe da exsudação de vaso com colonização profusa por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (**x**), alcançando o xilema através de pontuações primárias (➡). bar= 10μm.

Figura 26C. FMO de seção longitudinal de pecíolo de videira, cultivar Red Globe, exibindo sintoma de cancro causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Região de transição entre área tecidual íntegra e necrosada. Notar perda de integridade celular e descoloração intensa da área doente (✻). bar= 10μm.

Figura 26D. FMO de campo claro de seção longitudinal de pecíolo de videira, cultivar Red Globe, exibindo sintoma de cancro causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. Amostras foram incubadas com anticorpo policlonal produzido contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (AC4558/AC4560), imunomarcadas com ouro e submetidas à revelação do sinal com prata (IGL.SE). Notar presença de células de *Xcvi* na região de tecido macerado (**T**) e confinadas ao xilema (➡). bar= 5μm.

Figura 26E. FMO de contraste interferencial e diferencial da figura 26D. Notar correspondência espacial entre ambas as fotomicrografias. Região de tecido macerado (**T**) e de xilema (➡), esta similar àquela da Figura 25. bar= 5μm.

Figura 26F. FMO de contraste interferencial e diferencial de seção similar à Figura 26E, controle da reação IGL.SE. Amostras foram incubadas apenas com anticorpo policlonal específico (AC4558/AC4560). Notar grande quantidade de células de *Xcvi* não reveladas pela ausência do amplificador do sinal na preparação da amostra (✻). bar= 5μm.


X
A
X
B
*
*
C
T
D
T
E
*
F

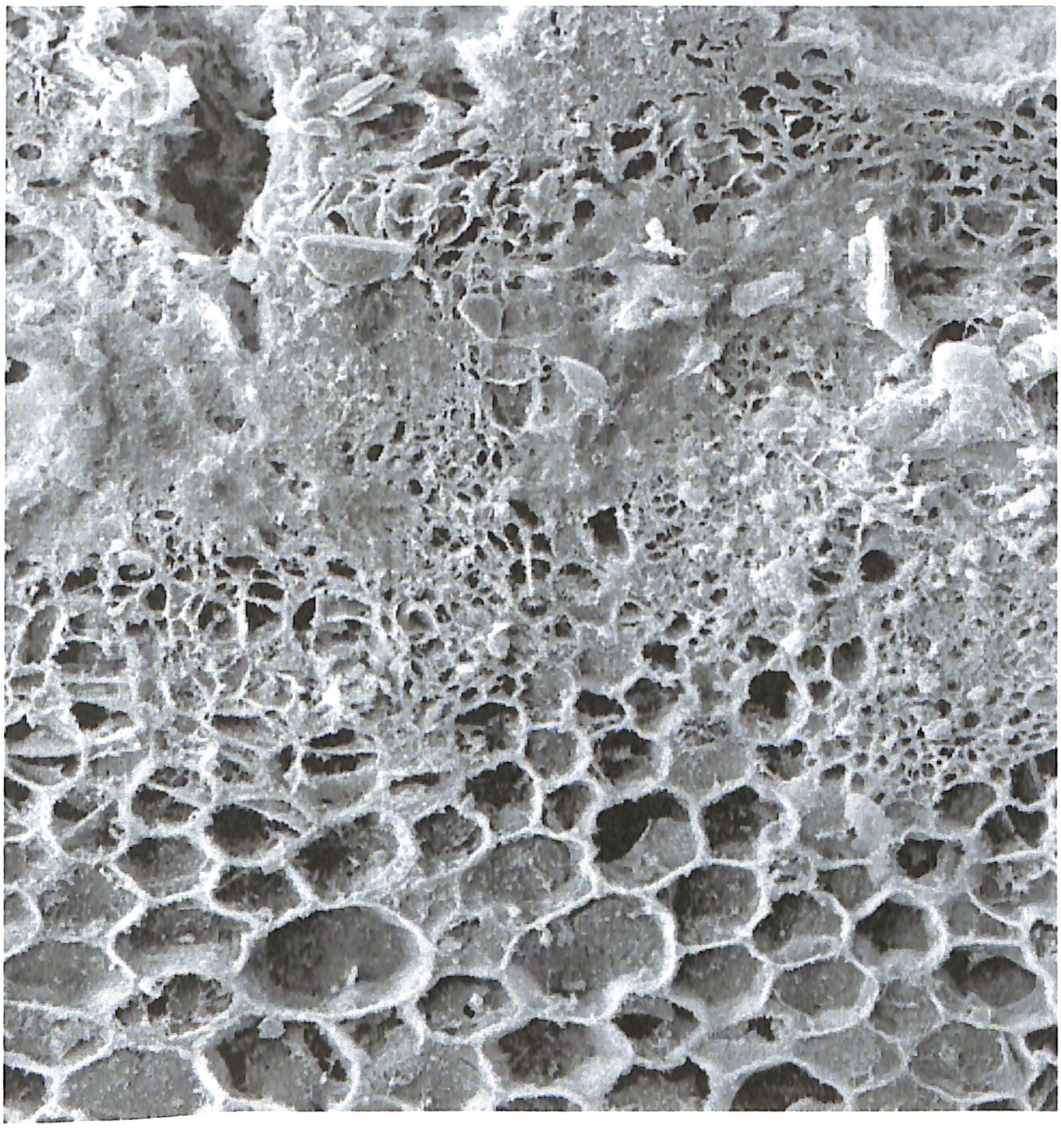


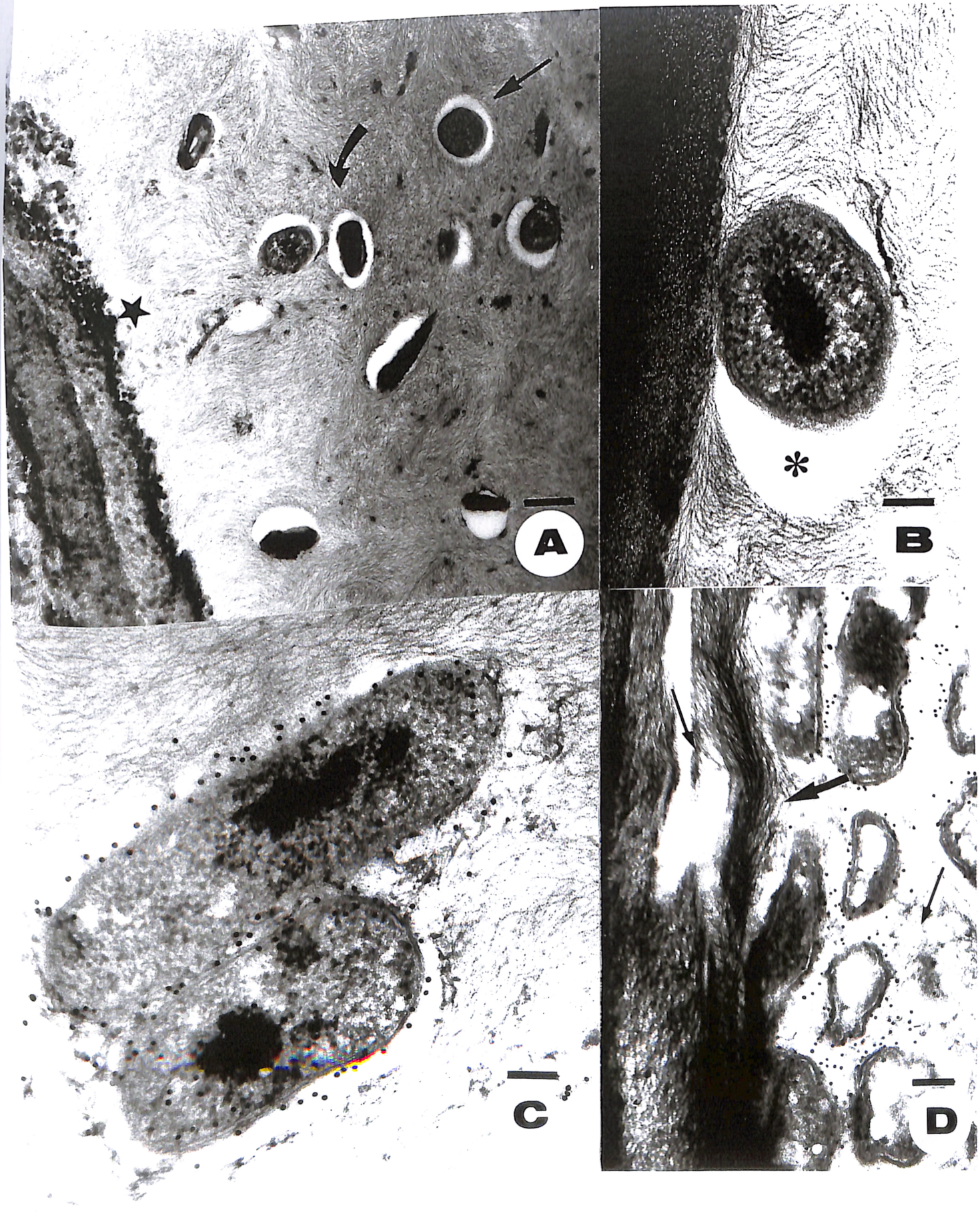
Figura 27. FMEV de seção transversal do pecíolo foliar de videira 'Red Globe', revelando extensiva área de maceração celular, associada à presença de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. A=5000X.

Figura 28A. Fotomicrografia eletrônica de transmissão (FMET) mostrando *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* colonizando região de extensiva necrose e colapso celular. Bactérias estão envolvidas por matriz fibrilar, formando halo eletrotransparente (➡). Notar degradação da parede celular (★).bar= 0,6μm.

Figura 28B. FMET mostrando *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* aderida em ataque apolar à parede de células de parênquima da região de tecido necrosado, em estádio avançado da doença. Notar detalhe da matriz fibrilar e formação de halo eletrotransparente ao redor da célula bacteriana (✻).bar= 0,15μm.

Figura 28C. FMET de células de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* imunomarcadas (IGL) com partículas de ouro (Ø=15nm) associadas a anticorpo policlonal específico (AC4558/AC4560). Notar prevalência de epítopos (•)na superfície da parede celular bacteriana e a não reação do anticorpo com fibrilas. bar= 0,15μm.

Figura 28D. FMET de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* imunomarcadas (IGL) com partículas de ouro (Ø=15nm) associadas a anticorpo policlonal específico (AC4558/AC4560). Notar extensiva desfibrilação da parede celular (➡) em presença de células de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (•). bar 0,25μm.


A
B
C
D

al.,1986), *manihotis* (Daniel & Boher,1978; Persley,1978), *pruni* (Dhanvantari,1973; Young,1978) e *mangiferaeindicae* (Manicom,1986; Pruvost *et al.*,1990).

O papel de populações residentes na epidemiologia de doenças causadas por espécies de *Xanthomonas* tem sido pouco estudado. Observou-se, por exemplo, que o crestamento comum do feijoeiro, devido a *X. c.* pv. *phaseoli* var. *fuscans,* somente ocorria quando as populações residentes excediam o nível de 5 x 10^6 ufc/folíolo (Hirano & Upper, 1983). Da mesma forma, a sobrevivência de inóculo de *X. c.* pv. *mangiferaeindicae* como epífita sobre folhas e frutos verdes, em associação com ventos e chuvas, tem sido responsabilizado pela severidade da mancha bacteriana em cultivos de mangueira na França (Pruvost & Luisetti,1993).

Populações epífitas de *Xanthomonas* são afetadas por diversos fatores do ambiente, tais como: precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar, temperatura e insolação. Dentre esses, a umidade merece destaque, sendo absolutamente necessária para que populações residentes multipliquem-se rapidamente (Goto, 1992). Um dos estudos mais extensos sobre sobrevivência epífitica de uma espécie de *Xanthomonas* é o de Timmer *et al.* (1987). Constataram eles a sobrevivência de *X. c.* pv. *vesicatoria* sobre folhas de tomateiro mantidas em alta umidade (90%), enquanto que isto não ocorria quando a umidade decrescia a 25%. Em outro ensaio, usando microscópio eletrônico de varredura, Timmer *et al.* (1987) observaram que células da bactéria formavam pequenos agregados na superfície de plantas hospedeiras e não-hospedeiras;

porém, quando prevaleciam condições secas, essas microcolônias eram embebidas por uma matriz de exopolissacarídeos, ficando firmemente aderidas à superfície. Com o retorno da umidade, essas microcolônias eram rehidratadas e a população epífita intensificava-se. Tais resultados explicariam porque a mancha bacteriana do tomateiro é comum na região tropical-úmida da Flórida, mas não no clima árido do oeste dos EUA As chuvas também exercem efeito expressivo, provocando redução inicial na população residente, devido à lavagem, mas provocando um rápido incremento dentro de períodos de 12 a 24 horas. O encharcamento dos tecidos parece não ser o único fator envolvido nessa rápida multiplicação; o impacto das gotas de chuva é, possivelmente, o fator-chave, embora os mecanismos não tenham sido elucidados (Goto,1992). Nesse contexto, Peltier & Frederich (1926) afirmaram que a ocorrência do cancro cítrico, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, está diretamente relacionado a estações chuvosas. Ainda, segundo Alcaraz (1978), a incidência do cancro cítrico na América do Sul aumenta quando a temperatura média ultrapassa 20^0C e a precipitação mensal é maior que 100mm.

Os primeiros registros do cancro bacteriano da videira no Brasil aconteceram entre dezembro de 1998 e janeiro de 1999, período que se caracterizou por intensa precipitação e por temperaturas elevadas (média de 26^0C) na região de Petrolina (Apêndice). Na Fazenda Frutivita, por exemplo, registrou-se chuva de 100mm em um único dia (16/01/98). Essa correlação foi novamente observada na estação chuvosa ocorrida entre novembro de 1999 e março de 2000, com notório ressurgimento do cancro bacteriano no pólo

Petrolina-Juazeiro. Chand & Kishum (1990b) reportaram que temperaturas entre 25 e 30 ^{0} C , associadas à ocorrência de ventos e períodos chuvosos, foram propícios à epidemia do cancro em cultivos de videira na Índia. Aliás, observações anteriores feitas por Nayudu (1972), durante a ocorrência de períodos também chuvosos, indicaram o aparecimento de infecções subsequentes sobre videira, 14 a 16 dias após, sugerindo que as chuvas representam papel fundamental na disseminação do patógeno. Os indícios de relação entre variáveis climáticas e incidência do cancro da videira no Vale do São Francisco, apontaram para a necessidade de estudos mais aprofundados a respeito.

Diante da limitada distribuição geográfica de *Xcvi* (Índia e Brasil) a hipótese mais plausível é de que a introdução da bactéria se tenha dado em associação com material genético de *Vitis vinifera* importado da Índia. Robbs & Rodrigues Neto (1999) sustentaram que a doença estabeleceu-se através de bacelos contaminados da cultivar Red Globe trazidos daquele país e inadvertidamente utilizados em Pernambuco; a ampla e rápida distribuição desses elementos de propagação vegetativa teria resultado na epidemia primeiramente assinalada (Malavolta *et al.*, 1998; Nascimento *et al.*,1998). Hoje, já existem registros de ocorrência da bactéria em vinhedos nos estados da Bahia e do Piauí (Malavolta *et al.*, 1999a; Robbs & Rodrigues Neto,1999; Lima *et al.*,2000). Por sinal, a disseminação de *Xylophilus ampelinus* , agente do crestamento bacteriano, a longas distâncias, também foi atribuído a estacas assintomáticas, citando-se que em até 50% dos bacelos, aparentemente sadios, infecção positiva tem sido diagnosticada (Panagopoulos,1988). Mais recentemente, Pruvost & Luisetti

(1993) detectaram sobrevivência epifítica de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* sobre brotações de cultivares suscetíveis de mangueira alertando para o risco de trocas de material genético infectado proveniente de áreas contaminadas.

A partir de ramos revelando cancros, por um ano armazenados em ambiente natural do laboratório da Área de Fitopatologia da UFRuralRJ, foi possível isolar e recuperar *Xcvi*, o que somou evidências para a importância desses órgãos da videira como nichos de sobrevivência e disseminação da bactéria.

Órgãos vegetais infectados são, indiscutivelmente, locais onde fitobactérias mais eficientemente sobrevivem. Assume-se, que em órgãos volumosos e lenhosos as células bacterianas possam sobreviver em condição de hipobiose por tempo mais longo do que em folhas e galhos mais finos (Schuster & Coyne, 1974; Leben,1981). Em países do hemisfério norte, de inverno rigoroso, lesões e cancros formados antes dessa estação servem como fonte de inóculo de bactérias fitopatogênicas, para folhas e outras partes aéreas de plantas perenes, que se multiplicam a chegada da primavera (Schroth *et al.*,1974). Exemplos disso são *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e *P. s.* pv. *mors-pronorum*, detectadas em botão floral e tecido de caule, aparentemente sadios, de seus respectivos hospedeiros (Balduin & Goodman,1963; Dowler & Petersen, 1967; Dowler & Weaver, 1975; Keil & Zwet,1972; Waissbluth & Latorre, 1978).

A sobrevivência de bactérias fitopatogênicas em órgãos vegetais infectados é fenômeno complexo e parece ter grande dependência das condições climáticas

(Romeiro, 1995). Cita-se, por exemplo, que *P. syringae* pv. *glycinea* sobreviveu com bastante eficiência de uma estação de plantio para outra associada a restos culturais infectados e deixados no campo, em regiões de clima temperado (Graham, 1953; Daft & Leben, 1973; Kennedy, 1969). Todavia, o mesmo não aconteceu nas condições tropicais do Brasil (Fett, 1979).

Em áreas infestadas do Vale do São Francisco, sob condições climáticas favoráveis a *Xcvi*, representadas por chuvas intermitentes e alta umidade relativa do ar, verificou-se abundante exsudato bacteriano sobre cancros formados em ramos lenhosos. Permanecendo aderidos às plantas, esses ramos possibilitam sobrevivência de populações da bactéria, protegidas no interior dos tecidos vegetais colonizados, durante períodos mais secos.

É comum, no caso de enfermidades incitadas por bactérias, os órgãos infectados exibiram rachaduras das quais exsudam células bacterianas em mistura com gomas e resinas da própria planta, formando gotícolas Schaad (1971), trabalhando com *Erwinia rubrifaciens* em nogueira, observou que células do patógeno estavam presentes em grande quantidade nos exsudatos que se formavam nos galhos de plantas infectadas; amostras desses exsudatos, mantidas sob condições de ambiente, ainda continham células viáveis do patógeno após 62 dias.

Em síntese, inóculos secundários de *Xcvi* podem ter origem em órgãos infectados, exsudatos e a partir da colonização da filosfera.

Dada à facilidade de exteriorização do patógeno, por meio de exsudatos de lesões foliares e cancros nos ramos, é provável que sua disseminação se dê em

aerossóis formados pela ação de ventos, constantemente presentes na viticultura nordestina, em associação com a água de condensação e/ou de chuvas. Essas partículas em suspensão, levadas por correntes aéreas, promoveriam a redistribuição da bactéria a curta distância, à semelhança do que foi registrado na cultura do arroz, onde se detectou disseminação do inóculo de *X. c.* pv. *oryzae,* por cerca de 64m, após ocorrência de chuvas fortes (Goto, 1992). Epidemias de crestamentos bacterianos do algodoeiro (*X. campestris* .pv. *malvacearum*), feijoeiro (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) e soja (*P. s.* pv. *glycinea*), têm sido atribuídas a esse mecanismo de dispersão (Faulwetter, 1917a, b; Walker & Patel, 1964; Daft & Leben,1972). Inóculos de espécies de *Xanthomonas,* encontrados em aerossóis, incluem *X. c.* pv. *phaseoli* (Venette, 1979) e *X. c.* pv. *campestris* (Kuan *et al.*, 1982), o que, ilustra o significado desse tipo de disseminação em epidemias de fitobactérias.

Não menos importante, seria a participação do homem como agente disseminador, através de ferramentas e mesmo do manuseio, uma vez que, conforme já mencionado, podas, desbastes e raleios de cachos são práticas culturais indispensáveis à produção de uva. Após essas operações, a seiva que escorre das feridas produzidas numa videira infectada certamente representaria fonte de inóculo. O sistema de produção adotado no nordeste brasileiro, a par do manejo de podas, submete os vinhedos a controle hídrico, agrotóxicos, fertilizantes e agentes químicos reguladores de eventos fisiológicos, a fim de garantir alta produtividade, decorrente de 2,5 safras/ano. É presumível que sistemas de produção como esse induzam condições de estresse, tornando as

plantas mais suscetíveis a doenças, de naturezas biótica ou abiótica, afetando seus mecanismos naturais de defesa.

3.4- Tolerância de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* ao cobre

Testes *in vitro* com isolados de *Xcvi,* indicaram a ocorrência de tolerância ao cobre, variando de 50μg/ml a 300μg/ml de Cu^{++} (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis de tolerância de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* ao cobre *in vitro*.

Isolado	Origem/cultivar	Procedência	Tolerância (μg/ml de Cu^{++})
ENA-4559	Red Globe	Frutimag – Petrolina/PE	50
ENA-4560	Red Globe	Frutimag – Petrolina/PE	100
ENA-4558	Red Globe	Frutivita – Petrolina/PE	250
ENA-4561	Christmas Rose	La Brunier- Petrolina/PE	300
ENA-4562	Red Globe	Frutimag – Petrolina/PE	300

A presente detecção de tolerância ao cobre em isolados nacionais de *Xcvi* abre possibilidade de sua ocorrência natural nas regiões de produção, principalmente pelo fato de que compostos cúpricos são freqüentemente utilizados para o controle de doenças fúngicas que incidem sobre a videira. Nesse contexto, exposições contínuas de populações bacterianas ao cobre exerceriam pressão de seleção, resultando na proliferação de estirpes tolerantes ao metal. Essas estirpes

portadoras de tolerância ao cobre poderiam ter sido introduzidas no país através de material propagativo contaminado. Esse fato foi apontado por Chand *et al.* (1994) para explicar a ampla distribuição de resistência ao cobre e à estreptomicina constatada em isolados indianos de *Xcvi*.

Isolados nacionais como ENA-4561, ENA-4562 e ENA-4558, que apresentaram resistência a altas concentrações de cobre, justificariam, em parte, a ineficiência do controle químico do cancro bacteriano com compostos cúpricos, o que vem sendo tentado pelos viticultores desde a primeira epidemia da doença, em 1998. A ocorrência dessas estirpes tolerantes torna, desse modo, pouco promissor o uso exclusivo dos cúpricos no controle das populações de *Xcvi* no nordeste brasileiro.

Contrariamente, no entanto, Malavolta *et al.* (1999b), Lima *et al.* (1999) e Silva *et al.* (2000), a partir de estudos com *Xcvi in vitro*, sugeriram além dos antibióticos, o hidróxido e o oxicloreto de cobre como potenciais bactericidas contra o agente do cancro bacteriano da videira naquela região.

Por seu turno, Chand *et al.* (1991b) avaliaram diversos produtos bactericidas (compostos de cobre e antibióticos) para o controle da doença na Índia, concluindo que a aplicação dos mesmos não resultava em redução significativa da incidência do cancro. Anos mais tarde, o mesmo autor e seus colaboradores (Chand *et al.*,1994) verificaram que *Xcvi* já havia desenvolvido resistência ao cobre e à estreptomicina, com níveis da ordem de 600 a 1800μg/ml de Cu^{++} e de 30 a 120μg/ml do antibiótico.

Reforçando essas evidências, Lima & Mashima (2000) reportaram que tratamentos químicos de bacelos de videira infectados por *Xcvi*, com oxitetraciclina, sulfato de cobre, amônia quaternária ou cloranfenicol não foram eficazes como curativos.

Compostos cúpricos ou cuprorgânicos vêm sendo empregados no controle de doenças bacterianas devido à sua alta toxicidade aos fitopatógenos, baixo custo e baixo efeito tóxico em mamíferos, o que os tornou econômica e ecologicamente adequados (Cha & Cooksey, 1991). Por isso, há mais de 100 anos a calda bordalesa é empregada nas lavouras em todo o mundo; não obstante, a ocorrência de resistência ao cobre era rara em bactérias fitopatogênicas (Coplin, 1989).

Hoje, no entanto, resistência ao cobre é fato comum. De acordo com Stall *et al.* (1986), por exemplo, já a partir de 1980 quase todos os isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* provenientes de cultivos de pimentão na Flórida manifestavam resistência ao metal.

Posteriormente, Sudin *et al.* (1989) assinalaram resistência ao cobre em *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, proveniente de inflorescências de cerejeira em Michigan (EUA), encontrando níveis de resistência entre 40 e 320 μg/ml de sulfato de cobre. Também em pereiras, constatou-se resistência de 138 isolados de *Erwinia amylovora*, espécie ainda não assinalada no Brasil, à concentração de 25 μg/ml de sulfato de cobre. No país, ocorrência natural de populações de

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* com resistência a até 1800 μg/ml de cobre vem de ser registrada em cultivos de pimentão (Aguiar *et al.*, 2000).

Com relação aos antibióticos, seu uso na agricultura é cada vez mais limitado. Segundo Romeiro (1995), não existem estudos sobre persistência de antibióticos em órgãos vegetais utilizados para consumo, o que poderia acarretar problemas de saúde pública.

A estreptomicina vem sendo utilizada na agricultura dos EUA desde os idos de 1950. Resistência a esse antibiótico tem sido detectada em diversos fitopatógenos, tais como: *Erwinia amylovora* (Coyier & Cover, 1975; Schroth *et al.*,1979; Chiou & Jones,1991; Loper *et al.*,1991; Burr *et al.*,1993), *E. carotovora* (Fukusawa *et al.*,1980), *Pseudomonas lachrymans* (Yano *et al.*,1978), *P. syringae* (Young,1977; DeBoer,1980; Sudin & Bender,1993), *P. syringae* pv. *populans* (Burr *et al.*,1988; Jones *et al.*,1991), *P.s.* pv. *tomato* (Silva & Lopes,1995) e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Stall & Thayer,1962; Minsavage *et al.*,1990).

Ainda nos Estados Unidos, mais precisamente na Califórnia, o uso frequente de sulfato de estreptomicina no controle de *Erwinia amylovora* em fruteiras rosáceas, resultou no surgimento de estirpes resistentes a esse antibiótico, devida a mutações no cromossoma bacteriano (Moller *et al.*,1981). Levantamentos realizados por Loper & Henkels (1991) em pomares de pereira, constataram que 98 dos 138 isolados de *E. amylovora* eram resistentes a 1.000μg/ml de estreptomicina. Estirpes da mesma bactéria, identificadas por Burr

et al. (1993) como resistentes a 50μg/ml de estreptomicina, foram provenientes de pomares de pereira e macieira atacadas pelo "fire bligth" no estado de Nova Iorque (EUA). Esses últimos autores afirmaram que o uso desse antibiótico não era frequente na região, sugerindo que o surgimento de estirpes resistentes teria sido devido à disseminação da bactéria a partir de outras regiões, como a Califórnia, onde seu emprego é intensivo.

Pesquisando espécies bacterianas fitopatogênicas, provenientes de diferentes regiões do Brasil e de outros países, Romeiro *et al.* (1993) verificaram que dentro de uma mesma espécie, há tendência ao estabelecimento de um padrão típico de sensibilidade a determinado grupo de antibióticos. Posteriormente, (Romeiro,1995) informou que mesmo isolados nunca antes expostos a antibióticos, podem apresentar resistência, revelando sua ocorrência natural.

Contudo, seria oportuno que bactericidas fossem investigados quanto à sua utilização nos parreirais da videira, especialmente atuando na proteção de sítios de infecção, sobretudo aquelas decorrentes de ferimentos provocados pelas podas.

4- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Subsídios para o controle

Ficou indubitavelmente demonstrado que o cancro bacteriano da videira no Submédio do Vale do Rio São Francisco é causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (*Xcvi*). A bactéria foi caracterizada no presente estudo, a partir de isolados daquela região, mediante testes culturais, morfológicos, bioquímicos, de patogenicidade e imunológicos.

Doença nova no país, provavelmente introduzida da Índia (Robbs & Rodrigues Neto,1999), está hoje presente nos estados de Pernambuco, Bahia e Piauí, tendo sido assinalada sobre as cultivares Red Globe, Rubi, Christmas Rose, Benitaka, Itália, Perlette e Superior (Festival).

Quanto ao ciclo biológico, fica proposto que a fase parasítica de *Xcvi* concentra-se no período chuvoso do semi-árido do São Francisco (novembro a março), quando surgem sintomas foliares permanentes, fornecendo inóculo para

disseminação local. Em contrapartida, na estação seca (maior parte do ano), não se detectam sintomas visíveis, devendo o patógeno sobreviver protegido no interior dos tecidos vegetais e/ou como epífita (residente) sobre a folhagem da videira (Figura 29).

A constatação de sobrevivência epífitica de populações de *Xcvi* aponta para a necessidade de adoção de práticas culturais específicas pelos viticultores. No geral, qualquer modificação do microclima do filoplano da videira, induzindo condições menos favoráveis ao crescimento populacional, poderia ter efeito benéfico. Nesse sentido, maior aeração reduziria a umidade ou, pelo menos, o tempo de "molhamento" dos tecidos. Insere-se nesse contexto a opção pelo método de irrigação a ser empregado. O uso de aspersão, microaspersão ou sulcos de irrigação distribui grande volume de água, com expectativa de elevação da umidade relativa do ar, em comparação ao sistema de gotejamento.

Considerando-se importante a participação dos ventos na disseminação da bactéria, a formação de "cercas vivas" seria prática cultural indispensável ao seu controle. Porém, até o momento, parece não existir consenso entre técnicos e produtores com respeito ao assunto. O registro indiano de que *Xcvi* foi encontrada naturalmente infectando nim, em adendo à presente constatação da patogenicidade de isolados nacionais da bactéria para esta espécie, descredencia seu uso em "quebra-ventos", ao mesmo tempo em que sugere a necessidade de estudar-se o potencial de outras espécies, como grevilha, capim Cameron, sansão do campo e casuarina, já amplamente empregadas na viticultura do nordeste para proteção dos cachos contra intempéries.

Práticas de poda em épocas de chuva, ou muito próximas ao período chuvoso, ofereceriam riscos de maior incidência do cancro, hipótese que precisaria ser considerada no planejamento geral da produção de uva no nordeste.

A formação de exsudados da bactéria sobre cancros ativos, bem como a sobrevivência latente sobre ramos podados ou outras partes vegetais infectadas e deixadas no pomar, tais como gavinhas aderidas ao aramado da latada, contribuiriam com nichos de preservação do inóculo. Dessa maneira, seria recomendável o treinamento do pessoal de campo no exame criterioso e frequente das videiras, a fim de detectar os primeiros sintomas a cada estação e providenciar imediata remoção do material, seguida de incineração.

Uma vez demonstrado que plantas de mangueira (*Mangifera indica*), umbuzeiro (*Spondias tuberosa*), cajueiro (*Anarcadium occidentale*), cajá-manga (*Spondias dulcis*), aroeira (*Schinus terenbenthifolius*), além do nim (*Azadirachta indica*), são suscetíveis a isolados nacionais de *Xcvi*, embora infecções naturais ainda não tenham sido registradas, dever-se-ia dar atenção para o potencial dessas espécies enquanto fontes locais de inóculo, já que a maioria vem fazendo parte da fruticultura nordestina.

É também possível que plantas suscetíveis, componentes da vegetação espontânea das áreas vitícolas, tenham significado como repositórios adicionais do patógeno, que nelas formariam populações residentes. Não se deveria descartar essa possibilidade em futuros estudos epidemiológicos. Objetos de

investigação, seriam também os porta-enxertos tolerantes que, mesmo após recepados, poderiam abrigar populações de *Xcvi*.

Interpretações dos resultados deste estudo remetem para a fundamental importância da desinfestação de ferramentas e utensílios durante operações de poda da videira, desbastes e raleios de cachos e a própria colheita de uvas, bem como instruir os trabalhadores sobre a necessidade de higienização antes de seu ingresso nas áreas de cultivo. Em parreirais já formados, os viticultores deveriam programar-se para que, dentro do possível, as podas fossem realizadas em períodos de menor precipitação pluviométrica. Os restos vegetais podados deveriam ser imediatamente recolhidos e destruídos por queima.

A detecção de tolerância ao cobre em isolados de *Xcvi* procedentes do Vale do São Francisco torna questionável o controle químico da doença e enfatiza a necessidade de busca de outras estratégias de redução dos prejuízos.

O controle ao patógeno via resistência genética parece, por ora, pouco promissor, visto que todas as cultivares disponíveis de *Vitis vinifera* mostraram-se suscetíveis ou altamente suscetíveis. Acrescente-se que cultivares de uvas sem sementes ("seedless") e aquelas que produzem bagas de pigmentação avermelhada, de ampla aceitação comercial, foram citadas como as mais suscetíveis à bactéria (Chand,1992). Ainda assim, avaliações sobre resistência de campo deveriam ser conduzidas na região do semi-árido nordestino, a fim de identificar cultivares tolerantes a *Xcvi*. Cultivares como a Red Globe, por exemplo, têm-se mostrado severamente atacadas. Um fato considerado relevante, desde a introdução da bactéria, refere-se à concentração da época de colheita de 'Red

Globe', no segundo semestre de cada ano, uma vez que, para atenuar os danos da doença, muitos viticultores deixaram de realizar podas durante a estação chuvosa.

Diante do exposto, provavelmente o caminho mais promissor para o controle do cancro bacteriano da videira seja o uso de material propagativo garantidamente livre de infecção, associado a práticas que possam limitar a disseminação da bactéria. Para tal, anticorpos policlonais representariam uma ferramenta útil na identificação e detecção de *Xcvi* no material propagativo utilizado.

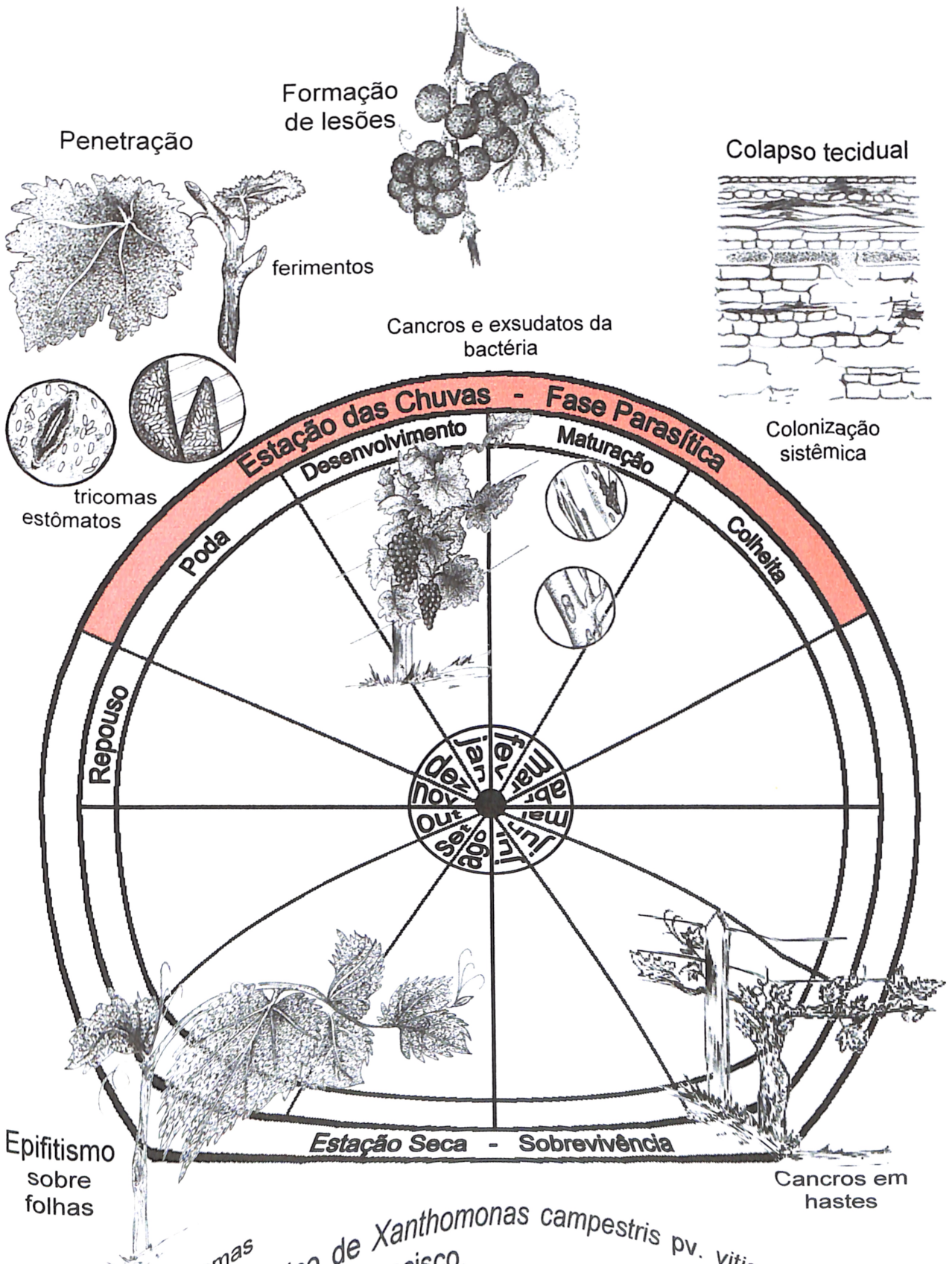


Figura 29. *Ciclo biológico de Xanthomonas campestris* pv. *viticola* na região do Vale do Rio São Francisco.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L.A. *Identificação de isolados nacionais de Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (Doidge) Dye, agente da mancha bacteriana do pimentão (Capsicum annuum L.), resistentes ao cobre e perspectivas de seu controle com formulações cúpricas e cuprorgânicas.* Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997,153f.

AGUIAR, L.A.; KIMURA, O.; CASTILHO, A.M.; CASTILHO, K.S.C.; RIBEIRO, R.L.D.; AKIBA, F.; CARMO, M.G.F. *Resistência ao cobre em isolados nacionais de Xanthomonas campestris pv. vesicatoria de pimentão e tomateiro. Agronomia*, v. 34, n. 1/2, p. 78-82, 2000.

ALBURQUERQUE, J.A.; ALBURQUERQUE, T.C. de. Comportamento de Dez Cultivares de Videira na Região do Sub-Médio São Francisco. Petrolina, EMBRAPA-CPATSA, 1982. 20 p. n.12.

ALBURQUERQUE, T.C. de. Uva para Exportação: Aspectos Técnicos da Produção. EMBRAPA-SPI, 1996. 53 p. (Publicações Técnicas FRUPEX, n. 25).

ALCARAZ, L.M.F. Factores climaticos relacionados com la cancrosis de los citrus (*Xanthomonas citri* (Hasse) Dow.) en Corrientes. *J. Fitosan*. v. 3, p.647-659, 1978.

ALVAREZ, A.M.; LOU, K. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. campestris by ELISA. *Plant Disease*, v. 69, p. 1082-1086,1985.

ARAUJO, J.S. de P.; ROBBS, C.F.; MACIEL, G.F. Novos hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Brasil. *Summa Phytopathol*. São Paulo, v. 25, n. 1, p. 83. 1999.

Associação dos Produtores e Exportadores de Hortigranjeiros e Derivados do Vale do São Francisco (VALEXPORT). "Manual do viticultor", Centro de Convenções Senador Nilo Coelho – Sala 6, 1ª andar, PE. 1999.

BALDSUIN, C.H.; GOODMAN, R.N. Prevalence of *Erwinia amylovora* in apple buds as detected by phage typing. *Phytopathology*, v. 53, p. 1299-303, 1963.

BASHAN, Y.; SHARON, E.; OKON, Y. Scanning electron and light microscopy of infection and symptom development in tomato leaves infected with *Pseudomonas tomato*. *Phys. Pl. Pathol.*, v. 19, p. 139-144, 1981.

BERIAN, L.O.S.; ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J. Galha bacteriana (*Agrobacterium* sp.) em videira no Estado do Rio Grande do Norte. *In*: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 1991, São Paulo. p. 4. Resumos... São Paulo, 1991.

BERIAN, L.O.S.; ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J. Galha bacteriana (*Agrobacterium* sp.) em videira no Estado de São Paulo, *Summa Phytopathol.*, Jaguariúna, v. 18,n. 4, p. 47, 1992.

BONDAR, G.; Molestia bacteriana da mandioca, *Boletin de Agricultura*. São Paulo, n. 16a, p. 513-524, 1915.

BRADBURY, J.F. Guide to plant pathogenic bacteria. Kew: C.A.B. International, 1986. 332 p.

BURR, T.J.; NORRELLI, J.L.; REID, C.L.; CAPRON, L.K.; NELSON, L.S.; ALDWINCKLE, H.S.; WILCOX, W.F. Streptomycin-resistant bacteria associated with fire blight infections. *Plant Disease,* n. 77, p. 63-66, 1993.

BURR, T.J.; NORELLI, J.L.; KATZ, B.; WILCOX, W.F.; HOYING, S.A. Streptomycin-resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *populans* in orchards its association with a conjugative plasmid. *Phytopathology*, v. 78, p. 410-413, 1988.

CHA, I.S.; COOKSEY, D.A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 88, p. 8915-8919, 1991.

CHAND, R. Sources of resistance to grapevine bacterial canker disease in *Vitis*. *Vitis*, v. 31, n. 83-86, 1992.

CHAND, R.; KISHUM, R. Outbreak of grapevine bacterial canker disease in India. *Vitis*, v. 29, p. 183-188. 1990a.

CHAND, R.; KISHUM, R. Effect of temperature on the growth of grapevine bacterial pathogen. *Drakshavrita Souvenir,* v. 73, p. 5, 1990b.

CHAND, R.; KISHUM, R. Inoculation technique for *Xanthomonas campestris pv. viticola* (Nayudu) Dye. *Int. J. Trop. Pl. Dis.*, v. 9, p. 115-122. 1991.

CHAND, R.; PATIL, B.P.; KISHUM, R. Management of bacterial canker disease (*Xanthomonas campestris pv. viticola*) of grapevine (*Vitis vinifera*) by prunning. *Indian J. Agric. Sci.*, v. 61, p. 220-222, 1991a.

CHAND, R.; PATIL, B.P.; KISHUM, R. Efficacy of different chemicals against grape - vine bacterial canker disease. *Indian J. Pl. Prot.*, v. 20, p. 108-110, 1991b.

CHAND, R.; SINGH, P. N.; SINGH, D.; SINGH, R. Copper and streptomycin resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *J. Pl. Dis. Prot.*, v. 101, n. 5, p. 487-491, 1994.

CHIOU, C.S.; JONES, A.L. The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, v. 81, p. 710-714, 1991.

COPLIN, D.L. Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, v. 27, p. 187-212, 1989.

COYIER, D.L.; COVER, R.P. Tolerance of *Erwinia amylovora* to streptomycin sulfate in Oregon and Washington. *Plant Dis.*, v. 59, p. 849-852, 1975.

DAFT, G.C.; LEBEN, C. Bacterial blight of soybeans: epidemiology of blight outbreaks. *Phytopathology*, v. 52, p. 57-62, 1972.

DAFT, G.C.; LEBEN, C. Bacterial blight of soybeans: field-overwintered *Pseudomonas glycinea* as possible primary inoculum. *Pl. Dis. Reporter*, v. 57, p. 156-157, 1973.

DANIEL, J.F.; B.BOHER. Ecology of cassava bacterial bligth: epiphytic survival of *Xanthomonas manihotis* on aerial parts of the cassava plant. Conf. Plant. Path, 4 ,1978, p. 763-771. Proceedings...Angers, 1978.

DEBOER, S.H. Leaf spot of cherry laurel caused by *Pseydomonas syringae. Can. J. Plant Patrol.* n. 2, p. 235-238, 1980

DE CLEENE, M. Scanning electron microscopy of tree establishment of compatible and incompatible *Xanthomonas campestris* pathovars on the leaf surface of Italian ryegrass and maize, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin,* n. 19, p. 81-88, 1989.

DHANVANTARI, B.N. Population dynamics of Xanthomonas pruni on peach bud and leaf surface and its relation to other microflora. *In:* CONG. PLANT PATHOL., 2, 1973, Minneapolis, session 13. Resumos... Minneapolis, 1973.

DOWLER, W.M.; PETERSEN, D.H. Transmission of Pseudomonas syringae in peach trees by bud propagation. *Pl. Dis. Reporter*, v. 51, p. 666-668, 1967.

DOWLER, W.M.; WEAVER, D.J. Isolation and characterization of fluorescent Pseudomonas from apparently healphy peach trees. *Phytopathology*, v. 65, p. 233-236, 1975.

DYE, D.W. A taxonomic study of the genus Erwinia. 1. The "Amylovora" group. *N.Z.J. Sci.*, v. 11, p. 590-607, 1968.

DYE, D.W. Genus Xanthomonas Dowson 1939. *In:* YOUNG, J.M; BRADBURY, J.F.; PANAGOPOULOS, C.G.; ROBBS, C.F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N. Z. J. Agric. Res.,* n. 21, p. 153-177, 1978.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho. Disponível na Internet (http//:www.cnpuv.embrapa.br, 10/04/2001).

FAHY, P.C.; HAYWARD, A.C. Media and methods for isolation and diagnostic tests. *In*: FAHY, P.C.; PRESLEY, G.J. (eds.). *Plant bacterial diseases: A diagnostic guide*. Sydney: Academic Press, 1983, 393 p.

FAULWETTER, R.C. Dissemination of the angular leafspot of cotton. *J. Agric. Res.*, v. 8, p. 457-475, 1917a.

FAULWETTER, R.C. Wind-blown rain, a factor in disease dissemination. *J. Agric. Res.*, v. 10, p. 639-648, 1917b.

FERREIRA, M.A.S.V.; BRAGA, J.P.; FRANÇA, C.D.; UESUGI, C.H.; LIMA, F.M. Caracterização bioquímica de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Fitopatol. bras.*, v. 25 (supl.), p. 459, 2000.

FETT, W.F. Survival of *Pseudomonas glycinea* and *Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis* in leaf debris and soybean seeds in Brazil. *Pl. Dis. Reporter*, v. 63, p. 79-83, 1979.

FIPE. Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas. Disponível na Internet, (http://www.fipe.com.br, 27/05/2001).

FUKUSAWA, K.; SUKRAI, H.; SHIMIZU, S.; NAGANAWA, H.; KONDO, S.;KAWABE, H.; MITSUHASHI, S. 3" – Phosphoryldihydro-streptomycin produced by the inactivating enzyme of *Erwinia carotovora*. *J. Antibiot.* n. 33, p. 122-123, 1980.

GARDAN, L.; DEVAUX, M. Bacterial bligth of hazelnut caused by *Xanhomonas corylina*. Convegno Internazionale sul Nocciulo, Avelino, p. 443-448, 1983.

GOODMAN, R.N. The infection process. *In*: MOUNT, M.S.; LACY, G.H. (eds.) *Phytopathogenic Prokaryotes*, v. 1, New York: Academic. 1982. 541 p. 31-62.

GOTO, M. Copper resistance. *In:* Fundamentals of bacterial Plant Patrology. Academic Press, p. 119, 1992.

GRAHAM, J.H. Overwintering of three bacterial pathogens of soybeans. *Phytopathology*, v. 43, p. 189-92, 1953.

GUILHERME F. MACIEL. Frutivita S.A., Fazenda Frutivita, Perímetro Irrigado Senador Nilo Coelho, Lote Agrícola n. 1552, Petrolina, 1999. (comunicação pessoal).

HAGBORG, W.A.F. A device for injecting solutions and suspensions into thin leaves of plants. *Can. J. Bot.*, v. 48, p. 1135-1136, 1970.

HIRANO, S.S.; UPPER, C.D. Ecology and epidemiology of foliar bacteial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology,* n. 21, p. 243-269, 1983.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível na Internet (http//:www.ibge.gov.br, 25/05/2001).

INGLES DE SOUSA, J.S. Uvas para o Brasil. Piracicaba: FEALQ, 1996. 791 p.

JAMES, E.K; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany,* v. 45, p. 757-766, 1994.

JONES, A.L.; NORELLI, J.L.; EHRET, B. Detection fo streptomycin-resistant *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in Michigan apple orchards. *Plant disease,* n. 75, p. 529-531, 1991.

KEIL, H.L.; ZWET, T. van der. Recovery of *Erwinia amylovora* from symptomless stems and shoots of Jonathan apple and Bartlettt pear trees. *Phytopathology*, v. 62, p. 39-42, 1972.

KENNEDY, B.W. Detection and distribuition of *Pseudomonas glycinea* in soybean. *Phytopathology*, v. 59, p. 1618-1619, 1969.

KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab.Med.*, v. 44, p. 301-307, 1954.

KUAN, T.L.; MINSAVAGE, G.V.; SCHAAD, N.W. Airborne dispersal of Xanthomonas campestris pv. campestris. *Phytopathology*, v. 72, p. 945,1982.

LACERDA, B.S.L.; OLIVEIRA, J.L.; ROMEIRO, R.S.; BROMMONSHENKEL, S.H. Ocorrência de galha em videira incitada por *Agrobacterium*. *Fitopatol. bras.*, v. 16, n. 2, p. 47, 1991.

LEBEN, C. Epiphytic microrganisms in relation to plant disease. *Annu. Ver. Phytopathol.*, v. 3, p. 209-230. 1965.

LEBEN, C.; SLEESMAN, J.P. Bacterial pathogens: reducing in seed and *in vitro* survival by physical treatments. *Pl. Disease*, v. 65, p. 876-878, 1981.

LELLIOTT, R.A.; STEAD, D.E. Methods for diagnosis of bacterial diseases of plants. *In*: LELLIOT, R.A.; STEAD, D.E. *Methods in plant pathology*. Oxford: Blackwell Sci., 1987. v. 2, 216 p.

LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; KAHANA, Z. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd in cereal roots. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 358-364, 1987.

LIMA, F.M.; FERREIRA, M.A.S.V.; DIANESE, J.C. Situação do cancro da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Submédio do Vale do São Francisco em 1999. *Fitopatol. bras.*, v. 24 (supl.), p. 250, 1999.

LIMA, F.M.; MOREIRA, W.A.; FERREIRA, M.A.S.V. Detecção do cancro da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em parreirais do Submédio do Vale do São Francisco em 1998 e 1999. *Summa Phytopathol.*, v. 26, n. 1, p. 284. 2000.

LIMA, M.F.; MASHIMA, C. Tratamento químico e térmico de bacelos de videira infectados com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Fitopatol. bras.*, v. 25, p. 324, 2000.

LOPER, J.E.; HENKELS, M.D. Evaluation of streptomycin, oxytetracycline, and copper resistance of *Erwinia amylovora* isolated from pear orchards in Washington State. *Plant Dis.*, v. 75, p. 287-290, 1991.

LUISETTI, J.; PRUNIER, J.P.; GARDAN, L. Epiphytic survival of *X. juglandis*. Abstr. ISPP, Plant Pathology Section, Working Group: the ecology of plant pathogenic bacteria on aerial structures of plant, Wye College, september, 1975.

MALAVOLTA JR, V.A.; ALMEIDA, I.M.G.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E.J.P.; NOGUEIRA, E.M.C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. *Summa Phytopathol.*, v. 25, p. 262-264, 1998.

MALAVOLTA JR, V.A.; ALMEIDA, I.M.G.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A.; RODRIGUES NETO, J.; NOGUEIRA, E.M.C. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no estado do Piauí. *Summa Phytopathol.*, v. 25, n. 1, p. 89. 1999a.

MALAVOLTA JR, V.A.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J. Ação *in vitro* de alguns bactericidas sobre *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Summa Phytopathol.*, v. 25, n. 1, p. 8. 1999b.

MALAVOLTA JR, V.A.; ALMEIDA, I.M.G. Patogenicidade de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em neem. *Summa Phytopathol.*, v. 26, n. 1, p. 287, 2000.

MANICON, B.Q. Factors affecting bacterial black spot of mangoes caused by *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. *Ann. Appl. Biol.*, v. 109, p. 129-135, 1986.

MARCO, G.M.; STALL, R.E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensibility to copper. *Plant Disease*, v. 67, n. 7, p. 779-781, 1983.

MATSUDA, I.; SATO, Z. Bending symptoms of young rice seedlings grown in nursery flat caused by *Pseudomonas avenae*, the causal agent of bacterial stripe of rice. III. Mode of infection. *Bull. Nat. Inst. of Agric. Res. Service Center*, v. 38, p. 169-180, 1983.

MILES, W.G.; DAINES, R.H.; RUE, J.W. Presymptomatic egress of Xanthomonas prunii from infected peach leaves. *Phytopathology*, v. 67, p. 895-897. 1977.

MINSAVAGE, G.V.; CANTEROS, B.I.; STALL, R.E. Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, v. 80, p. 719-723, 1990.

MOFFETT, M.L.; Wood,b.a. Resident populations of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* on cotton leaves: a source of inoculum for bacterial bligth. *J. Appl. Biol.*, v. 58, p. 607-612, 1985.

MOLLER, W.J.; SCHROTH, M.N.; THOMSON, S.V. The scenario of fire bligth and streptomycin resistance. *Plant Dis.*, v. 65, p. 563-568, 1981.

MONIZ, L.; PATEL, M.K. Three new bacterial diseases of plants from Bombay State. *Current Sci.*, v. 27, p. 494-495, 1958.

MULREAN, E.N.; SCHROTH, M.N. Ecology of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* on Persian (English) walnuts. *Phytopathology*, v. 72, p. 434-438,1982.

NASCIMENTO, A.R.P.; TAVARES, S.C.C. de H.; GARZIERA, F.; BEZERRA, R.; LACERDA, M.; MARIANO, R.L.R. Avaliação da patogenicidade da bactéria da necrose em videiras (*Vitis* spp.). *Fitopatologia bras.*, v. 23 (supl.), p. 213, 1998.

NAYUDU, M.V. *Pseudomonas viticola* sp.nov., incitant of a new bacterial disease of grapevine. *Phytopathol. Zeit. Tirupati*, v. 73, p. 183-186. 1972.

OLIVARES, F.L. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. 1997. Tese – Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. 328f.

OLIVEIRA, J.R.; ROMEIRO, R.S.; LACERDA, B.S.L. Ocorrence of *Agrobacterium tumefasciens* biovar 3 on grapevine in Brazil. *J. of Phytopathol.*, v. 140, p. 363-366, 1994.

PATEL, M.K.; KULKARNI, Y.S.; MONIZ, L. *Pseudomonas mangiferae-indicae*, pathogenic on mango. *Indian Phytopathol.*, v. 1, p. 147-152, 1948a.

PATEL, M.K.; MONIZ, L.; KULKARNI, Y.S. A new disease of *Mangifera indica* L. *Current Science*, v. 6, p. 189-190, 1948b.

PATEL, M.K.; KULKARNI, Y.S. A new bacterial leaf spot on *Vitis woodrowii* Stapf. *Current Science*, v. 20, p. 132, 1951.

PADHYA, A.C.; PATEL, M.K.; KOTASTHANE, W.V. A new bacterial leaf-spot on *Vitis trifolia*. *Current Science*, v. 34, p. 462-463, 1965.

PANAGOPOULOS, C.G. The disease "Tsilik marasi" of grapevine: its description and identification of the causal agent (Xanthomonas ampelina sp.nov.). *Ann. Inst. Phytopathol.*, v. 9, p. 59-81, 1969.

PANAGOPOULOS, C.G. Bacterial Blight. *In*: PEARSON, C.R.;GOHEEN, A. (eds). Compendium of grape diseases. St. Paul, Minnesota: APS Press, 1988. 93 p.

PELTIER, G.L; FREDERICH, W.J. Effects of weather on the world distribution and prevalence of citrus canker and citrus scab. *J. of Agric. Res.*, v. 32, p. 147-164, 1926.

PERSLEY, G.J. Epiphytic survival of *Xanthomonas manihotis* in relation to disease cycle of cassava bacterial bligth. INT. CONF. PLANT PATH BACT, 4, 1978, Angers. p.773-777, Proceedings...1978.

PRUVOST, O.; LUISETTI, J. Strains of *Xanthomonas campestris* isolated from Ambarella (*Spondias cytherea* Sonn.) in French West Indies are probably a new pathogenic from of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. *Fruits*, v. 44, p. 539-542, 1989.

PRUVOST, O.; A. COUTEAU; LUISETTI, J. Development of bacterial black spot of mangoes and epiphytic populations of the pathogen (*Xanthomonas campestris* pv. mangiferaeindicae) under natural conditions in Reunion Island. *Fruits*, v. 45, p. 125-140, 1990.

PRUVOST, O.; COUTEAU, A.; LUISETTI, J. Pepper tree (*Schinus terebenthifolius* Raddi), a new host plant for *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. *J. of Phytopathology*, v. 137, p. 289-298, 1992.

PRUVOST, O.; LUISETTI, J. Epiphytic survival of *Xanthomonas campestris* pv. mangiferaeindicae) on mango buds. *Acta Hortic.*, v. 341, p. 337-344, 1993.

REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERNANDES, M.F.; FERREIRA, A. C.; REIS, F.B.; RIBEIRO, J.R.A.; SALLES, J.F.; WEBER, O.B. Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas. EMBRAPA-CNPAB, 1997. 11 p.

ROBBS, C.F. A mancha bacteriana, doença da mangueira nova no Brasil, *Agricultura e Pecuária,* v. 25, n. 357, p. 7, 1953.

ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R. de L.D.; KIMURA, O. Sobre a posição taxonômica de *Pseudomonas mangiferaeindicae* Patel *et al.* 1948, agente causal de "mancha bacteriana" das folhas de mangueira (*Mangifera indica* L.). *Arq. Univ. Fed. Rur. RJ,* n. 4, p. 11-14, 1974.

ROBBS, C.F.; da PONTE, J.J.; SALES, M.G. Nota sobre *Xanthomonas mangiferaeindicae* no nordeste do Brasil. *Fitopatol. bras.*, v. 3, n. 2, p. 215-218, 1978.

ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J. Enfermidades causadas por bactérias em fruteiras tropicais no Brasil. *Summa Phytopathol.*, v. 25, n. 1, p. 47-51. 1999.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V.A.; VITOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopatologica,* v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. *Annual Review of Plant Phytopath.*, v. 30, p. 225-243, 1992.

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

ROMEIRO, R.S.; OLIVEIRA, J.R. MOURA, A.B.; BARBOSA, L.S.; MIGUEL, D.S.; SOARES, F.M.P.; PERES, F.; SIMÕES, A.R. Significado biológico da sensibilidade diferencial de fitobactérias a antibióticos. *Fitopatol. bras.* N. 18, 277 p., 1993. (Resumo).

SANDERS, G.M; VERSCHOOR, J.A.; WYNGAARD, S.V.; KORSTEN, L.; KOTZÉ, J.M. Production of monoclonal antibodies against Xanthomonas campestris pv. maniferaeindicae and their use to investigate differences in virulence. *J. Applied Bact.*, v. 77, p. 509-518, 1994.

SCHAAD, N.W. Survival of *Erwinia rubrifaciens* in exsudate on diseased walnut trees. *Phytopathology*, v. 610, p. 909, 1971.

SCHAAD, N.W. (Ed.) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2.ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1994. 163 p.

SCHNEIDER, R.W.; GROGAN, R.G. Tomato leaf trichomes, a habitat for resident population of *Pseudomonas tomato*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 67, p. 898-902, 1977.

SCHROTH, M.N.; MOLLER, W.J.; THOMSON, S.V.; HILDEBRAND, D.C. Epidemiology and control of fire bligth. *Ann. Rev. of Phytopath.*, v. 12, p. 389-412, 1974.

SCHROTH, M.N; THOMSON, S.V.; MOLLER, W.J. Streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, v. 69, p. 565-568, 1979.

SHEKHAWAT, G.S; PATEL, P.N. Histopatology of pigeon pea plant infected with Xanthomonas cajani. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenchutz, v. 86, p. 18-24. 1979.

SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology,* n.12, p. 199-221, 1974.

SILVA, V.L.; LOPES, C.A. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistente a estreptomicina e oxitetraciclina em tomateiros pulverizados ou não com antibióticos agrícolas. *Fitopatol. bras.*, v. 20, p. 80-84, 1995.

SILVA, V.A.V.; AGUIAR, I.F.; CASTRO, G.S.S.; NASCIMENTO, A.R.P.; PAZ, C.D. Ação in vitro de produtos químicos em relação a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Fitopatol. bras.* v. 25 (supl.), p. 331, 2000.

STALL, R.E.; THAYER, P.L. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Dis.*, v. 46, p. 389-392, 1962.

STALL, R.E.; LOSCHKE, D.C.; JONES, J.B. Linkage of copper resistance and avirulence *loci* on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, v. 76, p. 240-243, 1986.

SUDIN, G.W.; BENDER, C.L. Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 59, p. 1018-1024, 1993.

SUDIN, G.W.; JONES, A.L.; FULBRIGHT, D.W. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro in planta with plasmid. *Phytopathology*, v. 79, p. 861-865, 1989.

SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; KERSTERS. The bacterium *Xanthomonas*, *In*: Swings, J.G.; Civerolo, E.L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993, p. 121-156.

TIMMER, L.W.; MAROIS, J.J.; ACHOR, D. Growth and survival of xantromonads under conditions nonconducive to disease development. *Phytopathology,* n. 77, p. 1341-1345, 1987.

VANDERBOSCH, K. A. Light and electron microscopic visualization of uricase by immunogold labelling of sections of resin-embedded soybean. *J. of Microscopy*, v. 143, p. 187-197, 1986.

VENETTE, J.R. Detection of *Xanthomonas phaseoli* downwind from na aerosol generator. *In*: INT. CONGR. PROTECTION AND ANN. MEET. Abstracts of papers, Int. Congr. AM. *Phytopathol. Soc.*, 71, 1979, St. Paul. Abstract... *Phytopathol. Soc.* 1979.

VERDIER, V.; SCHMIT, J.; LEMATTRE, M. Etude en microscopie életronique a balayge de l'installation de deux souches de Xanthomonas campestris pv. manihotis sur feuilles de vitroplants de manioc. *Agronomie*, v. 10, p. 93-102. 1990.

WAISSBLUTH, M.E.; LATORRE, B.A. Source and seasonal for pear blast in Chile. *Pl. Dis. Reporter*, v. 62, p. 651-655, 1978.

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

TIMMER, L.W.; MAROIS, J.J.; ACHOR, D. Growth and survival of xantromonads under conditions nonconducive to disease development. *Phytopathology,* n. 77, p. 1341-1345, 1987.

VANDERBOSCH, K. A. Light and electron microscopic visualization of uricase by immunogold labelling of sections of resin-embedded soybean. *J. of Microscopy*, v. 143, p. 187-197, 1986.

VENETTE, J.R. Detection of *Xanthomonas phaseoli* downwind from na aerosol generator. *In*: INT. CONGR. PROTECTION AND ANN. MEET. Abstracts of papers, Int. Congr. AM. *Phytopathol. Soc.*, 71, 1979, St. Paul. Abstract... *Phytopathol. Soc.* 1979.

VERDIER, V.; SCHMIT, J.; LEMATTRE, M. Etude en microscopie életronique a balayge de l'installation de deux souches de Xanthomonas campestris pv. manihotis sur feuilles de vitroplants de manioc. *Agronomie*, v. 10, p. 93-102. 1990.

WAISSBLUTH, M.E.; LATORRE, B.A. Source and seasonal for pear blast in Chile. *Pl. Dis. Reporter*, v. 62, p. 651-655, 1978.

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

WILLEMS, A.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; VAN DEN BROECKE, I.; DE LEY, J. Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos 1969 to a new genus, *Xylophilus* gen. nov., as *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos 1969) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 37, p. 422-430. 1987.

WRATHER, J.A.; SAPPENFIELD, W.P.; BALDWIN, C.H. Colonization of cotton buds by *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum. *Plant Dis.*, v. 70, p. 551-552, 1986.

YAMANAKA, S.; OZAKI, M.; KATO, S. Some observations on angular leaf spot of cucumber with a scanning electron microscope. *Tohoku Jornal of Agricultural Research*, v. 30, p. 135-141, 1980.

YANO, H.; FUJII, H.; MUKOO, H.; SHIMURA, M.; WATANAB, T.; SEKIZAWA, Y. On the enzymatic inactivation of dihydrostreptomycin by *Pseudomoas lachrymans,* cucumber angular leaf spot bacterium isolation and structural resolution of the inactivated poduct. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan,* n. 44, p. 413-419, 1978.

YOUNG, J.M. Resistance to streptomucin in *Pseudomonas syringae* from apricot. *N. Z. J. Agric. Res.* n. 20, p. 249-251, 1977.

YOUNG, J.M. Survival of bacteria on Prunus leaves. INT. CONF. PLANT. PATH. BACT., 4, 1978, Angers, p. 779-786, 1978.

YOUNG, J.M.; SADDLER, G.S.; TAKIKAWA, Y.; DE BOER, S.H.; VAUTERIN, L.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R.I.; STEAD, D.E. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Re. of Plant Pathol.*, v. 75, p. 721-763, 1996.

6- APÊNDICE

6.1- MEIO NUTRIENTE ÁGAR (Schaad,1994)

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Glucose	2,5g
Agar	18g
Água destilada	1000ml
pH	7,0

6.2- MEIO DE DYGS (Rodrigues Neto *et al.*, 1986)

Dextrose	2g
Peptona bacteriológica	1,5g
Extrato de levedura	2,0g
K2 HPO4	0,5g
MgSO4 + 7H2O	0,5g
Ácido L-glutâmico	1,5g
Ágar	18,0g
Água destilada	1,000ml
pH	7,0

6.3- MEIO B DE KING (King *et al.*,1954)

Glicerol	15ml
K_2HPO_4	2,5g
$MgSO_4$ $7H_2O$	6,0g
Proteose peptona	20,0g
Agar	18,0g
Água destilada	1,000ml
pH	7,0

6.4- MEIO BÁSICO DE DYE (Dye,1968)

Extrato de levedura	1,0g
$NH_4H_2PO_4$	0,5g
K_2HPO_4	0,5g
$MgSO_4$ $7H_2O$	0,2g
NaCl	5,0g
Agar	6,0g
Azul de bromotimol (sol. Aquosa 1%)	3,0ml
Água destilada	1000ml
pH	7,0

6.5- MEIO BDA (Lelliott & Stead,1987)

Dextrose	20g
Batata	200g
Agar	15g
Água destilada	1000ml
pH	6,5

META EXPORT AGRÍCOLA LTDA

RELATÓRIO CLIMÁTICO MENSAL(1998)

DATA	TPN	TPX	T 09	T 15	T 21	TPM	U 09	U 15	U 21	INS	VTO	ETO T	ETO P	PCT
jan/98	18,60	32,20	23,10	26,70	22,90	25,40	72,10	55,80	76,30	230,70	101,70	242,80	168,40	197,50
fev/98	19,20	33,10	23,80	27,10	23,60	26,10	69,90	53,20	71,90	255,00	115,60	247,60	173,70	55,00
mar/98	19,40	34,20	24,10	28,50	24,20	26,80	62,50	46,20	63,00	280,60	117,00	304,50	193,30	35,00
abr/98	19,10	33,30	24,00	28,00	23,80	26,20	61,60	41,20	61,50	294,20	167,50	309,20	191,60	10,90
mai/98	18,80	31,00	23,30	26,90	22,70	24,90	60,50	44,50	64,60	289,20	212,20	297,00	183,40	0,00
jun/98	18,90	29,60	22,20	25,40	22,00	24,30	62,30	45,50	66,30	229,70	236,10	259,00	162,20	0,00
jul/98	19,40	30,30	22,50	25,90	22,50	24,90	64,10	44,30	61,80	257,10	226,80	260,90	177,80	0,00
ago/98	18,70	31,30	22,10	26,10	22,40	25,00	58,50	37,10	55,20	288,00	223,70	300,80	202,10	0,00
set/98	19,00	32,50	22,60	26,90	22,70	25,70	54,50	34,60	51,20	297,50	238,80	293,80	225,50	0,00
out/98	20,30	34,20	24,20	28,30	24,20	27,20	53,10	35,50	52,50	323,20	235,40	337,80	254,60	0,00
nov/98	21,80	32,80	25,20	28,10	25,30	27,30	61,40	48,60	65,70	227,00	141,70	230,90	190,20	177,50
dez/98	20,50	31,80	24,20	27,40	23,90	26,20	63,40	48,30	67,20	228,20	117,70	249,40	181,40	50,40
MÉDIA	19	32	23	27	23	26	62	45	63	267	178	278	192	44
TOTAL/ANO										3200,4		3333,7	2304,2	526,3

RELATÓRIO CLIMÁTICO MENSAL(1999)

DATA	TPN	TPX	T 09	T 15	T 21	TPM	U 09	U 15	U 21	INS	VTO	ETO T	ETO P	PCT
jan/99	20,40	31,90	23,70	27,50	24,10	26,10	64,90	52,40	73,50	257,60	112,30	251,90	184,70	101,30
fev/99	20,20	33,00	24,20	28,20	23,80	26,60	71,00	49,20	77,10	239,50	115,10	250,70	170,20	98,00
mar/99	19,70	30,80	23,30	26,70	22,40	25,30	73,30	57,70	82,90	246,90	66,70	217,10	158,50	262,50
abr/99	20,12	32,20	23,80	27,50	23,10	26,20	65,60	47,20	69,40	261,40	124,90	251,50	169,70	0,00
mai/99	19,90	30,80	23,30	26,60	22,50	25,40	65,20	48,50	72,50	223,10	150,20	234,20	152,20	0,00
jun/99	19,30	30,50	22,50	26,50	21,80	24,90	66,00	47,10	68,00	249,10	165,90	230,50	148,80	0,00
jul/99	18,90	29,60	21,90	25,90	21,50	24,30	66,00	44,50	63,20	255,30	198,40	245,30	164,60	0,00
ago/99	18,00	29,00	21,30	25,10	20,60	23,50	65,30	44,80	67,80	245,70	237,80	251,00	178,00	2,00
set/99	18,60	31,00	22,10	26,30	21,90	24,80	58,50	39,50	60,70	261,20	240,40	285,00	204,70	2,60
out/99	19,60	32,40	23,00	27,30	23,00	26,00	62,40	41,10	60,30	232,70	214,10	288,60	208,30	0,00
nov/99	19,80	31,50	22,60	27,06	23,48	25,60	70,40	48,10	64,90	194,70	158,40	239,50	176,40	133,80
dez/99	20,00	30,00	23,35	26,96	23,52	25,00	78,06	59,60	78,40	198,20	101,00	180,60	158,10	149,20
MÉDIA	20	31	23	27	23	25	67	48	70	239	157	244	173	62
TOTAL/ANO										2865,4		2925,9	2074,2	749,4

TPN_____TEMPERATURA MÍNIMA
TPX_____TEMPERATURA MÁXIMA
T09,T15,T21___ TEMPERATURA 9 , 15 , 21 HORAS
TPM_____TEMPERATURA MÉDIA

VTO_____VELOCIDADE DO VENTO (Km/Mês)
ETOT_____EVAPOTRANSPIRAÇÃO TANQUE CLASSE "A"
ETOP_____EVAPOTRANSPIRAÇÃO PEEMAN (PROGRAMA SAACI)
U09,15,21_____UMIDADE 9, 15 , 21 HORAS

PCT_____PRECIPITAÇÃO(mm / mês)
INS_____ INSOLAÇÃO (Horas)

[Data]03:39Estaçãodosanual