

Estado da Arte em Fitobacterioses Tropicais



Editores

Marco A.S. Gama

Alessandro Nicoli

Lilian M.P. Guimarães

Ueder P. Lopes

Sami J. Michereff



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia



Estado da Arte em Fitobacterioses Tropicais

Marco A.S. Gama
Alessandro Nicoli
Lilian M.P. Guimarães
Ueder P. Lopes
Sami J. Michereff

Editores

*Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Recife, Pernambuco, Brasil*





UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Reitora

Profa. Maria José de Sena

Vice-Reitor

Prof. Marcelo Brito Carneiro Leão

Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação

Profa. Maria Madalena Pessoa Guerra

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia

Prof. Sami Jorge Michereff

Diretor da Editora da UFRPE

Bruno de Souza Leão

Filiada a



Ficha Catalográfica

C719 Estado da arte em fitobacterioses tropicais / Marco Aurélio Siqueira da Gama, Alessandro Nicoli, Lilian Margarete Paes Guimarães, Ueder Pedro Lopes e Sami Jorge Michereff. - Recife: EDUFRPE, 2016.
308 p. : il.

Referências.

1. Fitobactérias 2. Fitobacterioses 3. Manejo de doenças
I. Gama, Marco Aurélio Siqueira da II. Nicoli, Alessandro
III. Guimarães, Lilian Margarete Paes IV. Lopes, Ueder Pedro
V. Michereff, Sami Jorge.

CDD 362

Editores e Colaboradores

Editores

Marco Aurélio Siqueira da Gama. Professor, Departamento de Agronomia - Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: marco.gama@ufrpe.br.

Alessandro Nicoli. Professor, Departamento de Agronomia - Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: alessandro.nicoli@ufrpe.br.

Lilian Margarete Paes Guimarães. Professora, Departamento de Agronomia - Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: lilian.guimarães@ufrpe.br.

Ueder Pedro Lopes. Professor, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Garanhuns, PE. E-mail: ueder.lopes@ufrpe.br.

Sami Jorge Michereff. Professor, Departamento de Agronomia - Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: sami.michereff@ufrpe.br.

Colaboradores

Adriano Márcio Freire Silva. Pós-Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: adrianomfsilva@yahoo.com.br.

Alessandra Jackeline Guedes de Moraes. Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: ale.jgm@gmail.com.

Ana Rosa Peixoto. Professora, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Universidade do Estado da Bahia - UNEB, Juazeiro, BA. E-mail: anarpeixoto@gmail.com.

Andrea Chaves Fiuza Porto. Pesquisadora, Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: achavesfiuza@yahoo.com.br.

Carlos Alberto Lopes. Pesquisador, Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. E-mail: carlos.lopes@embrapa.br.

Claudeana Souza da Conceição. Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: anaedualc@hotmail.com.

Diógenes da Cruz Batista. Pesquisador, Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. E-mail: diogenes.batista@embrapa.br.

Edilaine Alves de Melo. Pós-Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: laine-melo@hotmail.com.

Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Professor, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, MG. E-mail: mizubuti@ufv.br.

Elineide Barbosa de Souza. Professora, Departamento de Biologia - Área de Microbiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: elineidebs@yahoo.com.br

Fábio Junior Araújo Silva. Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: fabiojr@hotmail.com.

Gabriela de Sá Pinto Silva. Graduanda, Curso de Agronomia, Universidade do Estado da Bahia - UNEB, Juazeiro, BA. E-mail: gabippinto@gmail.com.

Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque. Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: greecy.mirian@hotmail.com.

Jéssica Bezerra de Souza. Graduanda, Curso de Agronomia, Universidade do Estado da Bahia - UNEB, Juazeiro, BA. E-mail: jessicabsouza@gmail.com.

Jéssica Rodrigues da Silva. Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: agronomajessica@gmail.com.

Joelma Santana Rezende. Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: joelmadesantana@hotmail.com.

Kamila Câmara Correia. Professora, Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Universidade Federal do Cariri - UFCA, Crato, CE. E-mail: kamila.correia@ufca.edu.br.

Kátia Cilene da Silva Felix. Pós-Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: kakal_cilene@hotmail.com.

Kledson Mendes dos Santos. Mestrando, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: kledsonmendes@gmail.com.

Leandro Victor Silva dos Santos. Mestrando, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: leandrovictor.santos@gmail.com.

Leonardo Silva Boiteux. Pesquisador, Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. E-mail: leonardo.boiteux@embrapa.br.

Marcos Henrique José de Lima Carvalho. Mestrando, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: mlcarvalho93@hotmail.com.

Maria Angélica Guimarães Barbosa. Pesquisadora, Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. E-mail: angelica.guimaraes@embrapa.br.

Marisa Alvares da Silva Velloso Ferreira. Professora, Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília - UnB, Brasília, DF. E-mail: marisavf@unb.br

Meridiana Lima Araújo Gonçalves. Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: meridiana.araujo@gmail.com.

Myrzânia de Lira Guerra. Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: myrzgue@gmail.com.

Pedro Martins Ribeiro Júnior. Pesquisador, Laboratório de Fitopatologia, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. E-mail: pedro.ribeiro@embrapa.br.

Renata Rodrigues de Almeida. Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: rralmeid@yahoo.com.br.

Rosa de Lima Ramos Mariano. Professora, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: rrmbac@gmail.com.

Tamiris Joana dos Santos Rêgo. Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: tamirisjoana_17@hotmail.com.

Tercílio Calsa Júnior. Professor, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE. E-mail: terciliojr@yahoo.com.br.

Thaís Ribeiro Santiago. Pós-Doutoranda, Laboratório de Bioinformática em Bioenergia, Embrapa Agroenergia, Brasília, DF. E-mail: tatasantiago@gmail.com.

Thaís Ferreira da Nóbrega. Programa de Pós-Graduação em Horticultura Irrigada, Universidade do Estado da Bahia - UNEB, Juazeiro, BA. E-mail: thaís.nobrega13@gmail.com.

Willams José de Oliveira. Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife, PE. E-mail: willamsoliveira9@gmail.com.

Apresentação

As bactérias fitopatogênicas caracterizam-se como um grupo de organismos capazes de causar severos prejuízos à produção agrícola nacional e mundial. Em regiões tropicais, as condições climáticas prevalentes favorecem a ocorrência de diversas fitobacterioses que comprometem a produtividade e a produção de várias culturas, provocando prejuízos consideráveis ao agronegócio. Portanto, a busca pelo entendimento das características etiológicas, epidemiológicas e por medidas de controle que sejam importantes para o manejo de fitobacterioses, são os parâmetros que norteiam os estudos fitobacteriológicos na busca de uma agricultura mais equilibrada.

Visando propiciar ao leitor uma visão aprofundada do que há de mais avançado para detecção e identificação de fitobactérias, bem como para o manejo de importantes fitobacterioses tropicais, a presente obra tenta compilar informações relevantes construídas ao longo dos anos pelos principais fitobacteriologistas brasileiros. Além disso, as informações aqui contidas serão de grande valia para utilização por produtores e técnicos, bem como para professores e estudantes de Fitopatologia e, sobretudo, Fitobacteriologia.

Agradecemos sinceramente aos autores e coautores deste livro pelo empenho e comprometimento na elaboração dos capítulos e à Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo fomento concedido para elaboração desta obra.

Os Editores

Índice

	Página
Editores e Colaboradores	III
Apresentação	VII
Índice	IX
1. Histórico da bacteriologia de plantas no Brasil	1
<i>Rosa L.R. Mariano & Elineide B. Souza</i>	
2. Genética da interação bactéria-planta	43
<i>Marco A.S. Gama, Willams J. Oliveira, Marcos H.J.L. Carvalho & Alessandro Nicoli</i>	
3. Detecção e identificação rápida de fitobactérias	65
<i>Adriano M.F. Silva, Jéssica R. Silva, Greecy M.R. Albuquerque & Marco A.S. Gama</i>	
4. Quantificação de fitobacterioses	83
<i>Fábio J.A. Silva & Sami J. Michereff</i>	
5. Amostragem de fitobacterioses	107
<i>Tamiris J.S. Rêgo, Kamila C. Correia & Sami J. Michereff</i>	
6. Manejo de fitobacterioses	137
<i>Kledson M. Santos, Ueder P. Lopes, Alessandro Nicoli & Marco A.S. Gama</i>	
7. Mancha angular das anacardiáceas	159
<i>Marco A.S. Gama, Adriano M.F. Silva, Edilaine A. Melo, Alessandra J.G. Moraes & Rosa L.R. Mariano</i>	
8. Manejo da podridão mole em hortaliças	177
<i>Kátia C.S. Felix, Alessandra J.G. Moraes, Leandro V.S. Santos, Joelma S. Rezende & Elineide B. Souza</i>	

9. Manejo da mancha aquosa em meloeiro	193
<i>Elineide B. Souza, Rosa L.R. Mariano & Claudeana S. Conceição</i>	
10. Detecção e variabilidade de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> , agente causal do cancro bacteriano da videira	211
<i>Marisa A.S.V. Ferreira</i>	
11. Manejo do cancro bacteriano da videira no Vale do São Francisco .	229
<i>Maria A.G. Barbosa, Pedro M. Ribeiro Júnior & Diógenes C. Batista</i>	
12. Diversidade e variabilidade de <i>Ralstonia</i> spp.	243
<i>Thaís R. Santiago, Carlos A. Lopes & Eduardo S.G. Mizubuti</i>	
13. Melhoramento genético visando resistência à murcha bacteriana	257
<i>Carlos A. Lopes & Leonardo S. Boiteux</i>	
14. Raquitismo da soqueira: a realidade da ação de um discreto agente nocivo em canaviais brasileiros	275
<i>Andrea C.F. Porto, Renata R. Almeida & Tercílio Calsa Júnior</i>	
15. Bactérias fitopatogênicas emergentes no Brasil	291
<i>Ana R. Peixoto, Meridiana L.A. Gonçalves, Myrzânia L. Guerra, Gabriela P. Sá, Jéssica Bezerra & Thaísa Nóbrega</i>	

Histórico da Bacteriologia de Plantas no Brasil

Rosa de Lima Ramos Mariano
Elineide Barbosa de Souza

1. Introdução

O objetivo deste trabalho é resgatar a história da bacteriologia de plantas no Brasil desde o seu descobrimento até agora. Sem a pretensão de ser completa, esta revisão aborda os principais marcos e nomes da fitobacteriologia brasileira, contidos em literatura nacional e internacional. Discute a polêmica sobre a primazia do relato da primeira fitobacteriose no mundo e revela sintomas da podridão negra no Brasil ainda em 1640. Comenta os primeiros passos na fitobacteriologia dados por fitopatologistas que se dedicaram não só às doenças causadas por fungos, vírus e nematoides, mas também àquelas causadas por bactérias. Relata ainda os diversos núcleos de fitobacteriologia no país e por fim, a literatura sobre o tema.

2. Polêmica e revelação

Desde o “descobrimento”, ou melhor, da chegada dos portugueses ao Brasil em 22 de abril de 1500, havia aqui uma luxuriante vegetação e um clima tropical quente e úmido, que certamente favorecia a ocorrência de doenças causadas por grande diversidade de agentes fitopatogênicos.

A primeira doença de plantas causada por bactérias no Brasil foi relatada pelo cientista alemão **Frederick M. Draenert**, que chegou à Bahia, vindo da Alemanha em 1863, indo morar num grande engenho de cana-de-açúcar. Lá observou uma doença desconhecida que destruía as plantações, a qual foi denominada posteriormente, gomose, cujo agente causal era *Xanthomonas*

vasculorum (Cobb) Dows. Suas observações foram relatadas na revista técnica “Zeitschrift für parasiten kunde” em Jena, Alemanha, 1869, ou seja, 369 anos após a chegada dos colonizadores. Uma tradução deste trabalho foi publicada no “Jornal da Bahia” número 4934 em 1870 e a segunda republicada nos Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica (Jornal da Bahia, 1970; Moura, 2006). Este trabalho representa a primeira notificação no mundo de uma fitobacteriose, já que os de Jonathan Burril datam de 1877 e 1878, sobre a queima da pereira, representando um direito de propriedade de Draenert e do Brasil (Puttemans, 1936; Moura, 2010). Entretanto, de acordo com Buddenhagen (1961) uma doença bacteriana da banana foi relatada por Schomburg em 1840 na Guiana, a qual Stover (1972) acreditou ser o Moko. Se isto for confirmado, Schomburg se torna o primeiro a relatar uma fitobacteriose no mundo, seguido de Draenert com a gomose da cana-de-açúcar e em terceiro lugar, a queima da pereira, por Burrill (Nolla & Valiella, 1976). Esta polêmica continuará até o reconhecimento desses relatos pioneiros.

No entanto, antes desta constatação existiu outra, bem anterior, não escrita, mas pintada em uma tela com vivas cores. Este quadro foi feito por **Albert Eckhout**, nascido em Groningen, Holanda (~1610~1666), desenhista e pintor trazido para Pernambuco pelo príncipe alemão Maurício de Nassau, em 1637. Sabe-se que os holandeses invadiram e dominaram Pernambuco de 1630 a 1654, visando à produção de açúcar do nordeste brasileiro. Eckhout retornou à Holanda em 1644. Nestes sete anos no Brasil, produziu cerca de 400 desenhos e esboços a óleo, originados da observação direta de espécimes vivos encontrados em suas excursões pelo território brasileiro ou ao Jardim Botânico, criado por Nassau. Estes desenhos serviram de base para grandes telas a óleo, realizadas posteriormente no Brasil ou em ateliê na Holanda, e para tapeçarias fabricadas pela Manufatura de Gobelins, em Paris, França (Brienen, 2006).

A série de doze naturezas mortas, de Eckhout, impressiona pela riqueza de cores e detalhes das frutas e vegetais. O modo como ele desenha o interior e apresenta a textura das superfícies, recorrendo a contrastes poderosos de luz e sombra, mostra grande habilidade e acuidade (Brienen, 2006). Assim, em seu esforço para captar totalmente a riqueza de detalhes das folhas retratadas, Eckhout pintou os sintomas da podridão negra das brássicas em couve (Figura 1). Por que ele pintou folhas com manchas? Será que ele não achou folhas sem lesões e, portanto, mais bonitas? Isto é bem provável, uma vez que nas outras naturezas mortas de sua autoria, não são observadas manchas ou lesões tão conspícuas quanto essas lesões em V, características da podridão negra. Portanto,

fica aqui o registro escrito desta revelação: em 1640, já existia no Brasil, no Nordeste, em Pernambuco, a podridão negra das brássicas.



Figura 1. Natureza morta com hortaliças, do holandês Albert Eckhout, óleo sobre tela 94 x 90 cm, pintado ± 1640 , evidenciando lesões (setas) da podridão negra das brássicas em couve.

3. Primeiros passos

Para situar a fitobacteriologia no Brasil é necessário relembrar um pouco da história da fitopatologia. Grandes nomes de pioneiros, a exemplo de Arsenio Puttemans, Octávio de Almeida Drumond, Josué Augusto Deslandes, Gregorio Bondar, Celeste Gobatto, Júlio Franco do Amaral, Ernesto Ronna, Augusto Chaves Batista, Dom Bento Pickel e Bento Dantas, eram fitopatologistas ou fitossanitaristas, dedicados principalmente às doenças causadas por fungos fitopatogênicos, mas que muito contribuíram com a fitobacteriologia e foram sucedidos por fitopatologistas especializados em fitobacterioses, inicialmente em

Piracicaba, Lavras e Viçosa, e posteriormente em outros núcleos espalhados pelo Brasil.

Arsênio Puttemans (1873-1937), arquiteto, botânico e paisagista, nasceu na Bélgica e veio para o Brasil, integrando-se ao Ministério da Agricultura (Figura 2). Interessando-se por doenças do algodoeiro, assinalou em 1905, na sessão comemorativa da morte de Linneu, na Sociedade Científica de São Paulo, a existência no Brasil da bacteriose das folhas e capulhos, causada por *Pseudomonas malvacearum* Smith (*Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (ex Smith) Schaad et al.) (Puttemans, 1936). Em 1910, o governo federal instalou um laboratório de fitopatologia no Museu Nacional, no Rio de Janeiro, onde Puttemans foi o primeiro diretor (Nolla & Valiella, 1976). O primeiro professor de fitopatologia no Brasil foi Garcia Redondo (Puttemans, 1936) que ministrou esta disciplina no curso de Agricultura da Escola Politécnica de São Paulo, de 1893 a 1899. Puttemans ministrou este curso de 1903 a 1910 (Nolla & Valiella, 1976). Em 1936, Puttemans participou da I Reunião de Fitopatologia que se realizou no Brasil, na sede do Jardim Botânico, no Rio de Janeiro, apresentando quatro trabalhos importantes (Moura, 2006).

Octávio de Almeida Drumond (1912-2001) (Figura 2), natural da cidade do Rio de Janeiro, formou-se em Agronomia em 1934 pela antiga Escola Superior de Agricultura e Veterinária de Viçosa, atual Universidade Federal de Viçosa (UFV). Foi professor naquela Instituição, ministrando aulas de Botânica, Horticultura e Fitopatologia. Realizou vários treinamentos no exterior, destacando-se o de um ano, na Potato Experimental Farm da Universidade de Cambridge, UK. Participou da I Reunião de Fitopatologia que se realizou no Brasil, em 1936, na sede do Jardim Botânico, no Rio de Janeiro. A partir de 1949, trabalhou no Instituto Agrônomo de Minas Gerais (IAMG-MA), nos laboratórios de Fitopatologia de Seropédica – RJ, do Serviço Nacional de Pesquisas Agronômicas (SNPA), na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), que substituiu o SNPA e Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), nas Fazendas Experimentais de Felixlândia, Maria da Fé e Lambari, onde construiu um infectário para estudar a murcha bacteriana da batateira, causada por *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.), dando ênfase ao controle com rotação de culturas, produtos químicos, resíduos orgânicos e métodos culturais. Drummond demonstrou a eficácia do uso de gramíneas em rotação com a cultura da batata e da prática da inundação do solo, por um a dois meses, no controle parcial ou total da murcha bacteriana (Drummond, 1997). Também estudou a *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith) Dye (*Xanthomonas*

citri subsp. *malvacearum* (ex Smith) Schaad et al.) em Minas Gerais (Drummond, 1957).



Figura 2. Arsênio Puttemans, Dom Bento José Pickel e Octávio de Almeida Drummond.

Josué Augusto Deslandes formou-se engenheiro agrônomo na 16ª turma da Escola Superior de Agricultura de Lavras em 1923. Em 1936, na I Reunião de Fitopatologistas do Brasil relatou a ocorrência da murcha bacteriana em bananeira nanica no litoral paulista em 1931. Descreveu os sintomas da doença, que mais tarde seria chamada de Moko e disse sobre o exsudato bacteriano: “exsudam-se gotas espessas de um líquido baço, produto da atividade das bactérias”, que seriam de espécie afim do *Bacterium solanacearum* (Smith) Smith. Comentou que, provavelmente, o *Cosmopolites sordidus* Germ seria um dos seus transmissores. Recomendou a erradicação de touceiras doentes, com corte das plantas e rega com óleo mineral, para apressar a decomposição, rotação de cultura e cobertura com cal virgem em abundância (Deslandes, 1936; Gonçalves, 1936)

Celeste Gobatto relatou na I Reunião de Fitopatologistas do Brasil, a ocorrência no Rio Grande do Sul da bacteriose dos cachos da videira, causada

pela *Bacterium uvae* Cuggini & Machiatti, nas variedades Pirovano 42 e 44 (Gobatto, 1936).

Júlio Franco do Amaral, paulista, trabalhou no Instituto Biológico de São Paulo (IB) com Agesilau Antônio Bitancourt e Veridiana Victória Rossetti. Publicou trabalhos sobre fitobacterioses em gergelim, cafeeiro e citros (Amaral, 1942; Amaral, 1945; Amaral, 1951; Amaral, 1956; Amaral, 1957).

Ernesto Ronna, professor de fitopatologia da Escola Eliseu Maciel de Pelotas, em seu “Primeiro catálogo dos parasitas vegetais encontrados até hoje nas culturas do Rio Grande do Sul”, 1943, citou pela primeira vez a espécie *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Towsand (*Rhizobium radiobacter* (Beijerinck & van Delden 1902) Young et al.) causando tumores em raízes de várias plantas.

Augusto Chaves Batista (1916-1967), natural de Santo Amaro da Purificação, Bahia, famoso micologista, também relatou doenças causadas por bactérias no estado de Pernambuco. Foi professor da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) a partir de 1946 e atuou no Instituto de Pesquisas Agrônomicas de Pernambuco (IPA), hoje Instituto Agrônomico de Pernambuco (IPA) até 1951, como chefe da Seção de Fitopatologia. De março de 1954 até sua morte em 1967 foi diretor do Instituto de Micologia da Universidade do Recife (IMUR) atual Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde deixou extensa Micoteca, hoje chamada Micoteca URM, Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti, registrada no Commonwealth Mycological Institute (CMI) com o título URM (Universidade do Recife, Micologia) e filiada ao World Directory of Collections of Culture of Microorganisms (WFCC) sob o Nº 604 (Maia & Moura, 2013). A galha em coroa em cultivos de roseira no Recife, a podridão bacteriana em plantios de pimentão e alho, e em bulbos de alho armazenados, na Bahia e Paraíba, entre outras fitobacterioses, foram descritas em seus trabalhos “Principais doenças das plantas em o Nordeste” (Batista, 1946; Batista, 1947). A murcha bacteriana das solanáceas, mancha angular do algodoeiro, escaldadura e gomose da cana-de-açúcar, entre outras, foram relatadas no capítulo “Doenças causadas por bactérias”, em seu extenso “Tratado de Fitopatologia” com 970 páginas mimeografadas (Batista, 1953).

Dom Bento José Pickel (1890-1963), da Ordem de São Bento (O.S.B.), nasceu em Margenheim, na Alemanha, e faleceu em São Paulo (Figura 2). Emigrou para o Brasil em 1908, desembarcando no Recife, e cursou Filosofia e Teologia em Olinda. Ordenou-se monge beneditino em Roma, em 1913. Junto a outros monges beneditinos, sob a direção de D. Pedro Roeser, então Abade do

Mosteiro de São Bento, criaram as Escolas Superiores de Agricultura e Medicina Veterinária São Bento, célula-mater da atual UFRPE, em 1912. De 1914 a 1936, foi professor de Botânica, Fitopatologia e Entomologia, e também diretor da Escola Superior de Agricultura São Bento (ESA), em Tapera, Pernambuco. Na sua “Lista das moléstias e dos fungos parasitários das plantas cultivadas em Pernambuco”, apresentada na Primeira Reunião de Fitopatologistas do Brasil, não citou nenhuma doença bacteriana, talvez por estar mais interessado nas doenças fúngicas. Tornou-se Assistente Técnico do IB, em 1938, onde foi colega de Júlio Franco do Amaral, na Seção de Fitopatologia. Foi distinguido com o título de “Professor Benemérito da UFRPE” pelos Conselhos Superiores da dita Universidade, em 1962. Publicou 113 trabalhos diversos e coletou plantas nos Estados do Polígono das Secas, quando Professor na ESA, coleção continuada em São Paulo. Organizou um herbário composto por 5.960 itens, pertencente ao IPA, sob o nome de “Herbarium Pickel”. Dom Bento Pickel é patrono da cadeira n. 8 nas Associações Pernambucana e Brasileira de Ciência Agronômica, ambas sediadas em Recife.

Bento Dantas de Oliveira, pernambucano, foi técnico fitossanitarista e diretor do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Nordeste, IPEANE. Fundou o Laboratório de Fitopatologia do Instituto Agrônomo do Norte em 1945, atualmente Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA (Embrapa, 2001). Mais conhecido como Bento Dantas, citou o “mal das soqueiras” ocorrendo em canas POJ2878 e CP27-139 em Pernambuco (Dantas, 1956), escreveu sobre a escaldadura da cana-de-açúcar em 1958 (Dantas, 1958) e a história da gomose da cana-de-açúcar em Pernambuco e no Brasil, dando o crédito de primazia ao alemão F. M. Draenert, no relato desta doença como a primeira fitobacteriose relatada no mundo (Dantas, 1970a e 1970b). A gomose da cana-de-açúcar foi relatada em 25 países e tornou-se endêmica no Brasil pelo uso de variedades resistentes (Caminha Filho, 1936). Em Pernambuco, quando principal produtor de açúcar do Brasil, a gomose foi epidêmica durante várias décadas, mas posteriormente, não causou perdas econômicas (Tokeshi & Rago, 2005), não mais sendo encontrada em Pernambuco ou no Brasil.

4. Núcleos em São Paulo

O IB foi a primeira instituição a realizar pesquisas com bactérias patogênicas aos citros, dentre as demais doenças dessa cultura. Teve destacados fitopatologistas e fitobacteriologistas pioneiros, a exemplo de Aagesilau Antônio

Bitancourt, Dom Bento Pickel, Júlio Franco do Amaral e Veridiana Victória Rossetti.

Agésilau Antônio Bitancourt (1899-1987) (Figura 3), filho de Lauro Baptista Bitancourt e de Maria Luiza Pereira da Silva Bitancourt, nasceu em Manaus, mas um mês depois sua família mudou-se para a França, onde posteriormente, titulou-se como Engenheiro Agrônomo, pelo Institut National Agronomique de France e na Universidade de Paris, Sorbonne como “Licenciés-Sciences” e “Docteur-ès-Sciences”. De 1926 a 1928 ocupou a cadeira de Botânica, Fitopatologia e Microbiologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), hoje denominada Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) em Piracicaba, São Paulo (Rebouças, 2005). A contratação de Bitancourt para o IB, em 1931, marcou o início da pesquisa de citros na Seção de Fitopatologia e Entomologia, sendo identificadas várias doenças das laranjeiras (Ribeiro, 2011). Em 1957, Bitancourt identificou a bactéria *X. campestris* pv. *citri* (ex Hasse) Dye (*X. citri* subsp. *citri* (Gabriel et al.) Schaad et al.), agente do cancro cítrico, em material coletado por Celso Ferraz de Oliveira Santos na região de Presidente Prudente, São Paulo (Rossetti, 1995). Com o seu dinamismo e entusiasmo, a fitopatologia e a fitobacteriologia tomaram grande impulso que foi potencializado com a contratação de Veridiana Victória Rossetti para o IB, em 1941. A rápida expansão da cultura da laranja trouxe consigo o aumento dos problemas fitossanitários, e o cancro cítrico começou a se disseminar. O IB promoveu então, uma grande campanha fitossanitária para evitar sua chegada à região exportadora de laranja, pois o cancro cítrico constava dos regulamentos fitossanitários internacionais, o que autorizava os países a proibirem a importação a partir de locais contaminados (Ribeiro, 1997). Pela sua grande contribuição à fitopatologia, Bitancourt recebeu dentre vários prêmios, o seu nome no Museu de Fitopatologia “A. A. Bitancourt”, do IB, homenagem de Victória Rossetti em 1966; o título de “Fellow da American Phytopathological Society”, USA, em 1976; e biografias escritas pela pupila Victória Rossetti (Rossetti, 1975; Rossetti, 1987). Bitancourt aposentou-se em 1969.

Veridiana Victória Rossetti (1917-2010), nasceu em 15 de outubro de 1917, em Santa Cruz das Palmeiras, São Paulo, filha dos italianos Lina e Thomaz Rossetti. Foi à primeira engenheira agrônoma formada pela ESALQ em 1939 e trabalhou de 1941 a 1987 no IB (Figura 3). Dominando os idiomas italiano, inglês, francês, alemão e espanhol, além do português, Victória Rossetti foi destaque por todos os países em que trabalhou. Victória Rossetti, ou “Vicky”, como era carinhosamente chamada pelos amigos e colegas do IB, aposentou-se

oficialmente em 1987, aos 70 anos de idade. Após a aposentadoria, continuou na ativa até 2000 e deixou um grande legado de contribuições à pesquisa fitopatológica no Brasil, em especial à citricultura e à fitobacteriologia. Victória Rossetti dedicou vários anos ao estudo de doenças de citros, a exemplo da gomose, tristeza, exocorte, leprose e declínio. Em 1987, quando ocorreu a clorose variegada dos citros (CVC), nome dado por ela à doença popularmente conhecida por “amarelinho”, Victória Rossetti, já aposentada, formou o Grupo de Trabalho sobre CVC, unindo pesquisadores do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), da Sucocítrico CUTRALE Ltda., da Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), do Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), do IB e do Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) (Rossetti, 1995).



Figura 3. Victória Rossetti no Instituto Biológico, Agesilau A. Bitancourt e Victória Rossetti.

Relatou Eduardo Feichtenberger, considerado por Victória Rossetti “colega e dileto filho espiritual” (Rossetti, 1995): “Victória Rossetti temia que a doença fosse o temível “greening”, que ainda não chegara ao Brasil” (Ribeiro, 2011). Assim, enviava material dos experimentos, por correio, para Joseph Marie Bové e Monique Garnier, do INRA, que utilizavam a microscopia eletrônica, para localizar bactérias no floema ou no xilema das plantas. Em janeiro de 1990, a parceria do grupo de trabalho sobre CVC resultou na descoberta da etiologia da doença, quando uma bactéria foi observada no xilema de laranjeiras infectadas

por M. Garnier, descartando a hipótese de “greening”, sendo um marco histórico da Fitobacteriologia no Brasil (Rossetti et al., 1990) (Figura 4).

No Brasil, o primeiro isolamento desta bactéria foi realizado em agosto-setembro de 1990 pelo fitobacteriologista **Rui Pereira Leite Júnior**, no Instituto Agrônômico do Paraná, IAPAR. Em fevereiro de 1993, os postulados de Koch, para essa doença, foram completados pelo grupo de J. M. Bové na França e de Richard Lee, na Flórida (Rossetti, 1995). Ainda nesse ano, Victória Rossetti constatou a participação das cigarrinhas da família Cicadellidae como vetores, fornecendo subsídios para o controle da doença. Finalmente, em 1987, o gênero e espécie da bactéria foram denominados por Wells e colaboradores, *Xylella fastidiosa* Wells et al. (*X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (Wells et al.) Schaad et al.).

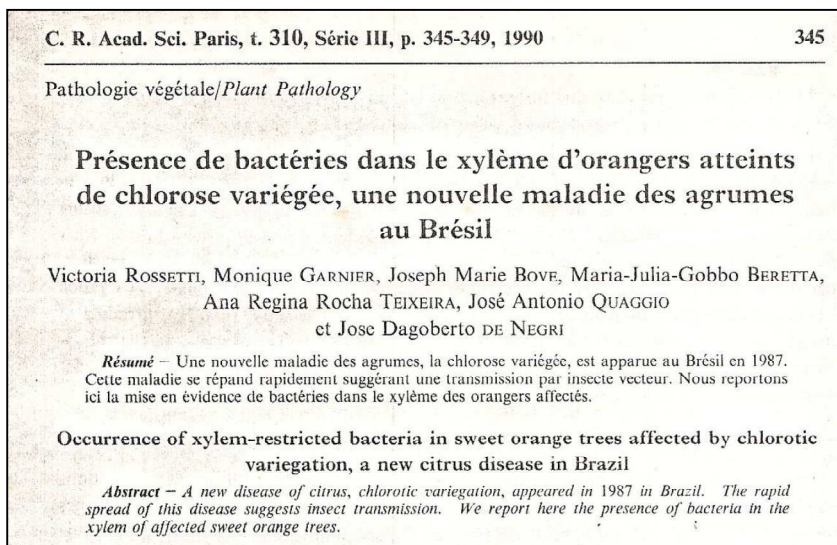


Figura 4. Résumé e abstract do artigo científico publicado por Victória Rossetti e colaboradores sobre a etiologia bacteriana da clorose variegada dos citros.

Junto a Victória Rossetti, trabalharam alguns nomes importantes da fitobacteriologia no Brasil, tais como, Júlio Franco do Amaral, Júlio Rodrigues Neto e Waldemar Atilio Malavolta Júnior. Maiores detalhes sobre a intensa vida profissional e familiar de Victória Rossetti podem ser encontrados em sua autobiografia, escrita em estilo leve e prazeroso para o leitor (Rossetti, 1995).

Em setembro de 1997, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) aprovou o projeto de sequenciamento do genoma completo de

X. fastidiosa subsp. *fastidiosa*. A publicação no periódico Nature, em 2000, com 115 autores (Simpson et al., 2000), elevou o Brasil a posição de primeiro país do mundo a decifrar o código genético de uma bactéria fitopatogênica, outro marco na fitobacteriologia.

Júlio Rodrigues Neto, natural de Tupã, São Paulo, nasceu em 1942. Quando ainda estudante de Agronomia em Pinhal, no ano de 1971, realizou estágio de férias na Seção de Bacteriologia do IB, localizada na sede do IB, onde começou a se interessar pela área, que abraçou ao se formar em 1972. No início de 1973 foi contratado para a referida Seção, para desenvolver o projeto “Levantamento e estudo de raças de *Xanthomonas manihotis* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Bondar) Vauterin et al.”. Posteriormente, desenvolveu seus trabalhos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Centro Experimental do Instituto Biológico (CEIB), em Campinas, SP (Figura 5). Dentre os prêmios que recebeu, destaca-se o Prêmio Paulista de Fitopatologia em 2000. Júlio R. Neto sempre ministrou cursos de fitobacteriologia na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) e na Universidade de São Paulo (USP), repassando seu grande conhecimento aos colegas (Vitiello & Ramires, 2010). Júlio R. Neto aposentou-se em 2012, deixando cerca de 62 artigos científicos publicados, vários em parceria com ilustres colegas fitobacteriologistas do Brasil e exterior, tendo seu nome como determinador da espécie nova, *Erwinia psidii* Neto et al. 1988, sp. nov. e do patovar *Xanthomonas campestris* pv. *melonis* Neto et al. 1984 (Bull et al., 2010).

Atualmente, o Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Centro Experimental do IB é referência para o Brasil e outros países, dando suporte ao produtor e abrigando a Coleção de Culturas de Fitobactérias do IB, Coleção IBSBF. A Coleção IBSBF foi idealizada e criada por Júlio R. Neto em 1980, com a colaboração do IAC. É registrada na World Federation of Culture Collections (WFCC) e possui 3,3 mil linhagens de bactérias fitopatogênicas, representadas em 234 espécies e subespécies distribuídas em 29 gêneros. Com base no Catálogo da Coleção IBSBF (<http://www.biologico.sp.gov.br/pdf/IBSBFcolecacao.pdf> e http://www.biologico.sp.gov.br/pdf/catalogo_IBSBF.pdf), muitas universidades e centros de pesquisa do Brasil e do exterior solicitam isolados bacterianos para dar suporte aos seus estudos.

Em substituição a Júlio R. Neto, a nova curadora da Coleção IBSBF é Suzete Aparecida Lanza Destéfano (Figura 5). Junto a ela, no Laboratório de Bacteriologia Vegetal, encontram-se os conhecidos fitobacteriologistas, Luís Otávio Saggion Beriam e Irene Maria Gatti de Almeida.

Suzete Aparecida Lanza Destéfano tem licenciatura plena em Ciências Biológicas na Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC Campinas). Concluiu o mestrado em genética e biologia molecular, com a dissertação “Introdução do Transposon Tn5 em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e análise dos recombinantes quanto à auxotrofia, fitopatogenicidade e aumento de viscosidade” em 1989 e o doutorado em genética e biologia molecular, com a tese “Isolamento e análise do clone pMV08 envolvido com a biossíntese do exopolissacarídeo de *Xanthomonas campestris*”, ambos na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), orientada por Yoko Bomura Rosato. É pesquisadora do IB desde 2005. Atua na área de biologia molecular e fitopatologia, com ênfase em bactérias fitopatogênicas e coleção de culturas de micro-organismos. Tem quatro pós-doutorados, sendo um no IB e três na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello. Desde 1991, publicou 27 artigos, sendo 25 com bactérias fitopatogênicas e um capítulo de livro. Formou sete mestres, dois doutores, um pós-doutor e 15 alunos de graduação em iniciação científica. Uma de suas grandes contribuições para a fitobacteriologia tem sido a continuação da Curadoria da Coleção IBSBF.

Luís Otávio Saggion Beriam (Figura 5) possui graduação em Ciências Biológicas pela UNICAMP (1982), mestrado em Agronomia (Fitopatologia) pela Universidade de São Paulo (1986), com a dissertação “Purificação simplificada do Vírus do Enrolamento da Folha da Batata com Triton X-100”, orientado por Avelino Rodrigues de Oliveira e doutorado em Genética e Biologia Molecular pela UNICAMP (1998), com a tese “Serologia e eletroforese aplicadas ao estudo de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye, agente causal da bacteriose do maracujazeiro (*Passiflora* spp.), orientado por Tomomassa Yano. Desde 1988 atua no IB, onde atualmente é pesquisador VI. Tem experiência na área de Fitopatologia, com ênfase em fitobacteriologia e serologia aplicada ao estudo de fitobactérias. Desde 2007, é professor do curso de pós-graduação do IB, na área de Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, onde ministra a disciplina Seminários e colabora na Patologia Vegetal Aplicada. Afastado no período de março de 2007 a outubro de 2012, prestando serviços de assessoria na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA, da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo. Reassumiu o cargo de Pesquisador Científico no Laboratório de Bacteriologia Vegetal do IB, Centro Experimental de Campinas, desde outubro de 2012. Recebeu os prêmios Honra ao mérito, Embrapa algodão/Associação Paulista de Produtores de Algodão em 2009 e 2011 e o Premio Victória Rossetti em 2015.



Figura 5. Júlio Rodrigues Neto com Suzete Destéfano, Luis Otávio Saggion Beriam e Valdemar Atílio Malavolta Júnior.

Irene Maria Gatti de Almeida é engenheira agrônoma pela USP (1974) e tem mestrado em Ciências (Energia Nuclear na Agricultura) pela USP (1980) com a dissertação “Efeitos do vírus F em *Bombyx mori* L., 1758 (Lep., Bombycidae) e determinação do local de síntese do RNA viral através de autoradiografia”. É pesquisadora científica do IB, com grande experiência em fitobacterioses. Publicou 52 artigos, dos quais 46 com bactérias fitopatogênicas, além de 6 capítulos de livros.

Ainda em Campinas, São Paulo, mas no IAC, encontra-se o fitobacteriologista **Waldemar Atílio Malavolta Júnior** (Figura 5). Engenheiro agrônomo pela ESALQ-USP (1975), concluiu o mestrado em 1985, com a dissertação “Metodologia de avaliação de resistência de *Citrus* spp. a *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, orientado por Clélio Lima Salgado e o doutorado em fitopatologia em 1996, com a tese “Contribuição ao conhecimento de bactérias do gênero *Xanthomonas* patogênicas a cereais de inverno”, orientado por Avelino Rodrigues de Oliveira, ambos na ESALQ-USP. Foi pesquisador do IB de 1977 a 1999, quando passou ao IAC. De 1983 a 2008, publicou 50 artigos em periódicos e seis capítulos de livros, todos com bactérias fitopatogênicas, um livro e três produtos tecnológicos. Coorientou uma dissertação de mestrado e orientou dois alunos em iniciação científica. Sempre atuou na área de etiologia, taxonomia, diagnose e controle de bactérias fitopatogênicas, tendo contribuído para o esclarecimento da etiologia do cancro

bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye), que causou grandes prejuízos à viticultura no Submédio do Vale do São Francisco.

Na Faculdade de Ciências Agrônomicas-Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP), está **Antônio Carlos Maringoni** (Figura 6) formado engenheiro agrônomo em 1981, nessa mesma instituição. Concluiu o mestrado em 1986, com a dissertação “Caracterização de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye de pimentão e de tomateiro através de patogenicidade, sorologia, hidrólise de amido e sensibilidade a drogas”) e o doutorado em 1993, com a tese “Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye em sementes de feijoeiro e consequências epidemiológicas” pela ESALQ-USP sob a orientação de Hiroshi Kimati. Tem livre-docência em fitopatologia “Caracterização de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e resistência de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium, 2000” pela UNESP. É professor titular em Fitopatologia desde 2011, junto à FCA/UNESP e docente do programa de pós-graduação em agronomia (Proteção de Plantas). Grande formador de recursos humanos, orientou 12 mestres e 11 doutores, além de mais de 37 alunos de graduação em monografia ou iniciação científica. Tem produção científica extensa, com a maioria dos trabalhos dedicados a fitobacteriologia, incluindo 96 artigos, 14 capítulos de livros e 2 livros.



Figura 6. Antônio Carlos Maringoni entregando placa ao mestre Chukichi Kurosawa, José Belasque Júnior e Alessandra Alves de Souza.

Na ESALQ-USP em Piracicaba, a fitobacteriologia foi ministrada por vários mestres: Emilio Gomide Loures (1964-1975) da UFV, Clélio Lima Salgado (1975-1997), Ivan Paulo Bedendo (1998-2014) e a partir de 2015, por José Belasque Júnior (informação pessoal Lilian Amorim, 2016).

O professor da ESALQ-USP **Ivan Paulo Bedendo** é engenheiro agrônomo, com mestrado e doutorado na área de Fitopatologia (Fungos), todos realizados nessa instituição de ensino, onde ocupa o cargo de professor titular no Departamento de Fitopatologia e Nematologia. Como cientista visitante, fez seu pós-doutorado junto ao Molecular Plant Pathology Laboratory, pertencente ao United States Department of Agriculture, USDA/BARC, Maryland, USA. Tem se dedicado ao estudo de fitoplasmas em diversas culturas, buscando aumentar os conhecimentos sobre o papel destes fitopatógenos no agroecossistema brasileiro. Publicou 93 artigos científicos, a maioria com fitoplasmas e vírus, mas também alguns com bactérias fitopatogênicas, em parceria com Carlos Alberto Lopes.

José Belasque Junior (Figura 6) também é da ESALQ-USP, professor de Fitopatologia e Microbiologia. É engenheiro agrônomo (1988) e mestre pela FCA/UNESP (2000), com a dissertação “Doses e épocas de aplicação de nitrogênio sobre dois híbridos de milho cultivados na safrinha”, orientada por Domingos Fornasieri Filho. Doutor em Agronomia (Fitopatologia) pela ESALQ-USP (2005) defendeu a tese “Dinâmica espacial do cancro cítrico, interação com a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) e diversidade genética do seu agente causal (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)”, orientada por Lilian Amorim. Atuou na FUNDECITRUS e no Coopération Internationale En Recherche Agronomique Pour Le Développement, CIRAD. Ingressou na ESALQ-USP como docente em 2013, mas desde 2004, durante o doutorado, já orientava estudantes de graduação; e desde 2011, formou seis mestres. Com intensa produção científica, publicou 49 artigos e três capítulos de livros, principalmente nos temas cancro cítrico e “huanglongbing” (HLB) ou “greening” dos citros.

No Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira (Centro APTA Citros Sylvio Moreira -IAC), **Alessandra Alves de Souza** (Figura 6), tem trabalhado intensamente com bacterioses dos citros, com ênfase em biofilme bacteriano, genômica funcional de plantas e micro-organismos e interação molecular planta-patógeno. Pernambucana, graduada e laureada em Ciências Biológicas pela Universidade Católica de Pernambuco (1992), tem mestrado em Microbiologia Agrícola pela USP (1994) com a dissertação “Mapeamento de regiões genômicas associadas à nodulação e resistência à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em *Phaseolus vulgaris* sob dois níveis de adubação nitrogenada” orientada por Siu Mui Tsai; doutorado em Genética e Biologia Molecular pela UNICAMP (2004) com a tese “Análise comparativa da expressão de genes de *Xylella fastidiosa* associados a

patogenicidade e formação de biofilme”, orientada por Marcos Antônio Machado e pós-doutorado na Universidade da Califórnia-Berkeley (2009-2010). Entre outros, recebeu o Prêmio Top Ciência pela BASF (2015) e o Prêmio da Fundação Bunge Juventude, categoria Agronegócio (2015), além do Prêmio Jovem Geneticista, pela Sociedade Brasileira de Genética. Publicou 78 artigos científicos, um livro e três capítulos, além de uma patente e dois pedidos de patente. Já orientou cinco mestres, dois doutores, cinco pós-doutores e 20 alunos de graduação, principalmente na UNICAMP e FCA/UNESP.

5. Núcleo no Rio de Janeiro

Charles Frederick Robbs (1920-2012) (Figura 7) nasceu em 18 de janeiro de 1920, em Olinda, Pernambuco. Seu pai Frederick Robbs era inglês e sua mãe Judith Dantas Robbs, paraense, criada no Ceará. Em 1926 foi morar com a família na Inglaterra, em 1928 voltou para o Recife e em 1930 a família mudou-se para o Rio de Janeiro.

Em 1943, já no último ano do curso de Agronomia da Escola Nacional de Agronomia - ENA (Atual Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ), foi convidado por Verlande Duarte Silveira, professor da Cadeira de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola, para ser monitor. Em 1944, ocupou o cargo de Professor Assistente de Fitopatologia. A partir de então, enveredou pela fitossanidade, de forma pioneira e auto-didática, passando a dedicar-se especialmente ao estudo das bactérias fitopatogênicas, até tornar-se o mais destacado especialista brasileiro nessa área de pesquisa.

Seu primeiro artigo científico em fitobacteriologia foi “Contribuição ao estudo de uma bacteriose em *Stapelia variegata*”, publicado em 1946 no Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia (Robbs, 1946) e citado no Manual of bacterial plant pathogens (Elliot, 1951).

Obteve título equivalente ao de Mestre em Ciências com a monografia “Contribuição ao estudo das bactérias que atacam plantas no Brasil”, apresentada ao final do Curso de Fitossanitarista da ENA, em 1945. A monografia apresentava os capítulos: 1) “Contribuição ao estudo da podridão negra das crucíferas”; 2) “Considerações sobre insetos possivelmente transmissores de doenças bacterianas” e; 3) “Lista preliminar das bactérias fitopatogênicas observadas no Brasil”. Em 1967 obteve a Livre Docência e em 1970 titulou-se Doutor em Fitopatologia e Microbiologia Agrícola.

Isolados bacterianos obtidos de suas investigações estão até hoje depositados em coleções como a Coleção Internacional de Bactérias Fitopatogênicas, em

Davis, Califórnia (International Collection of Phytopathogenic Bacteria). Alguns desses isolados são ainda considerados espécie tipo ou patotipo e constam de diversos catálogos internacionais, a exemplo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, descrita no Brasil por Gregório Bondar (Bondar, 1912; Bondar, 1915), chefe da Seção Técnico-agrícola do Instituto do Cacao, em 1936, quando participou da Primeira Reunião de Phytopathologistas do Brasil (Moura, 2006).

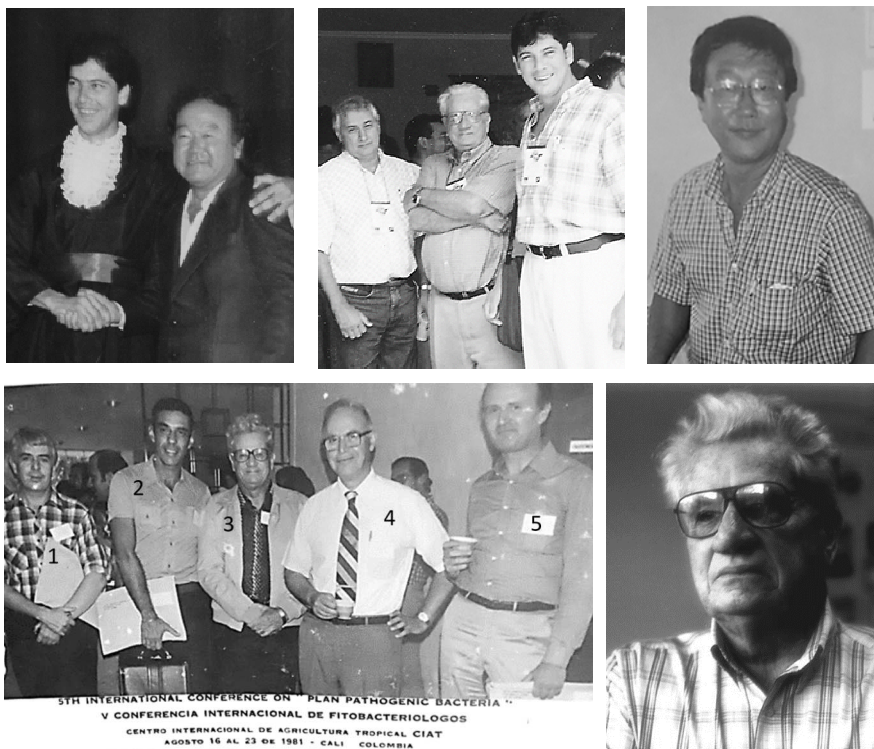


Figura 7. Em sentido horário: João Araújo em sua formatura com Osamu Kimura; Júlio Rodrigues Neto, Charles Robbs, pai da Fitobacteriologia no Brasil e João Araújo; Fujio Akiba; V Conferência Internacional de Fitobacteriologia, Cali, Colômbia, 1981: John M. Young (1), Raul de Lucena Duarte Ribeiro (2), Charles Robbs (3), Arthur Kelman (4) e D. W. Dye (5); Charles Robbs.

No decorrer de sua vida profissional, Charles Robbs realizou inúmeros trabalhos e publicou centenas de artigos científicos, com destaque para as fitobacterioses no Brasil. Participou do III Congresso Internacional de Fitopatologia em Munique, Alemanha, em 1978, apresentando: “Association of a mycoplasma-like organism with chayote witch’s broom”. Era a segunda constatação destes organismos causando doenças em plantas no mundo. Dali seguiu para Angers, França, onde durante a IV Conferência Internacional de Bactérias Fitopatogênicas, apresentou o trabalho pioneiro “Epiphytic survival of *Pseudomonas garçae*^{INA+} on coffee” e participou da proposta de criação do termo infrasubespecífico “patovar”, juntamente com J.M Young, D.W. Dye, J.F. Bradbury e C.G. Panagopoulos, todos fitobacteriologistas renomados (Young et al., 1978) (Figura 7). Por discordar do termo patovar (pv.) para alguns gêneros de bactérias fitopatogênicas, sugeriu ao fitobacteriologista americano D. W. Dye, o termo subespécie (subsp.), que foi aceito, sendo hoje utilizado para *Clavibacter*, *Erwinia* (*Pectobacterium*) e *Xanthomonas*. Seu nome consta na Approved lists of bacterial names de 1980 determinando as espécies *Pseudomonas caricapapayae* Robbs (Skerman et al., 1980) e *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Patel et al.) Robbs et al. (Bull et al., 2012).

Foi professor da ENA e posteriormente UFRRJ até 1985, quando se aposentou, mas continuou suas pesquisas na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna-São Paulo, na área de controle biológico de pragas e doenças. Em 1993 recebeu o título de professor Emérito pela UFRRJ. Teve participação direta na formação de grande número de fitobacteriologistas, dentre os quais podem ser destacados: Júlio Rodrigues Neto, Raul de Lucena Duarte Ribeiro, Fujio Akiba e Osamu Kimura (Figura 7), Armando Takatsu, Rosa de Lima Ramos Mariano e João Sebastião de Paula Araujo (Figura 7). Por tudo que fez é considerado o **Pai da Fitobacteriologia no Brasil**.

João Sebastião de Paula Araujo é natural de São Gonçalo, Rio de Janeiro, filho de Terezinha de Paula Araujo e João Facundo de Araujo. Graduiu-se Engenheiro Agrônomo, fazendo iniciação científica (Figura 7) e mestrado orientados por Osamu Kimura na UFRRJ. Com os três professores Raul de Lucena Duarte Ribeiro, Fujio Akiba e Osamu Kimura, teve oportunidade de absorver conhecimentos e práticas ímpares em diagnose de doenças de plantas e fitobacterioses, que o permitem formar novos talentos em Clínica Vegetal, por vezes reconhecidos e premiados durante Congressos de Fitopatologia. Foi convidado, pelo Dr. Charles Robbs, já aposentado pela UFRRJ e atuando como consultor e contratado pela Embrapa Agroindústria, para receber dele os conhecimentos, experiências e acervo bibliográfico, em visitas semanais ao seu

apartamento em Copacabana. Disto resultou a orientação de doutorado com *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e cerca de 13 anos de encontros e aprendizagem com aquele que considera, sem dúvida, o maior fitobacteriologista brasileiro e que detinha a história viva da fitobacteriologia em sua memória. João Araújo ajudou o grande mestre a escrever sua autobiografia (Robbs, 2000), fato que considera uma grande contribuição à fitobacteriologia, além da formação de vários alunos de graduação em iniciação científica, mestrado e doutorado. Outros mestres que o influenciaram foram Reginaldo Romeiro e Júlio Rodrigues Neto (Informação pessoal, João Sebastião de Paula Araujo, 2016).

6. Núcleos em Minas Gerais

Reginaldo da Silva Romeiro (1946-2010) (Figura 8) nasceu em 5 de dezembro de 1946, na cidade de Marumbi, no Paraná, filho de Francisco da Silva Romeiro e Oraida de Souza Lima Romeiro. Engenheiro agrônomo (Universidade Rural do Estado de Minas Gerais - UREMG, atual UFV, 1968), mestre em Microbiologia Agrícola (UFV, 1971) e Ph.D. em Fitopatologia (University of Missouri, USA, 1980), realizou treinamentos, após o doutorado, na University of California (USA, Riverside, 1981), Technische Universität Braunschweig (Alemanha, 1986) e University of Auburn (USA, Alabama, 1996). Ingressou na UFV, como professor, em 1972, chegando a professor titular da Instituição em 1997. Aposentado em 2009, foi convidado a permanecer no Departamento de Fitopatologia como professor voluntário, com atuação na pesquisa e na orientação de estudantes de pós-graduação.

Dedicou sua vida ao estudo das bactérias fitopatogênicas, tendo orientado em 37 anos de ensino e pesquisa, 25 dissertações de mestrado e 16 teses de doutorado, além de dezenas de alunos de graduação em iniciação científica. Publicou 115 artigos científicos e 11 capítulos de livros. É autor de oito livros, nas áreas de bacteriologia e de biocontrole de enfermidades de plantas. Seus livros “Bactérias fitopatogênicas” e “Métodos em bacteriologia de plantas” são adotados em todo o Brasil, nos programas de graduação e pós-graduação em Fitopatologia e afins. Pela sua expressiva participação na Fitopatologia e Fitobacteriologia Brasileiras recebeu o Prêmio Summa Phytopathologica, concedido pelo Grupo Paulista de Fitopatologia, em 1990, e o Prêmio Dr. Arnaldo Gomes Medeiros, concedido pela Sociedade Brasileira de Fitopatologia, em 2005. Além disso, Reginaldo Romeiro também escrevia contos, recebendo prêmios. Foi uma liderança muito expressiva na Fitobacteriologia e a sua dedicação ao ensino e pesquisa, será eternamente lembrada por todos os seus

alunos/amigos, a quem brindou com sua excelente capacidade didática e carisma pessoal.



Figura 8. Dirceu Macagnam, Elineide Souza, Flavio Medeiros, Rosa Mariano, Reginaldo Romeiro e Abi Marques (da esquerda para direita) no Congresso Brasileiro de Fitopatologia em 2006; Elineide Souza, Bernardo Halfeld Vieira e Andréa Moura; Rosa Mariano e Reginaldo Romeiro; José Rogério de Oliveira; Jorge Luis Badel Pacheco e Ricardo Magela de Souza.

Na UFV, José Rogério Oliveira sucedeu o mestre Reginaldo Romeiro, que também deixou discípulos atuantes na Universidade Federal de Lavras – UFLA (Ricardo Magela de Souza), Universidade Federal de Roraima – UFRR (Bernardo de Almeida Halfeld Vieira) e Universidade Federal de Pelotas – UFPel (Andréa Moura Bittencourt), dentre outros.

José Rogério Oliveira (Figura 8) possui graduação em Agronomia pela UFV (1984), mestrado e doutorado em Agronomia (Fitopatologia) pela UFV (1988 e 1995) com a dissertação “Idade da folha e suscetibilidade do cafeeiro a *Pseudomonas cichorii* e a *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*” e a tese “Detecção

de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro”. Desde 1994 é professor da UFV. De 2001 a 2002 realizou pós-doutorado na Universidade da Flórida, EUA. Participa de 3 grupos de pesquisa-CNPq na UFV, tendo publicado 31 artigos científicos e 7 capítulos de livros. Já formou 10 mestres, 4 doutores e 2 alunos de graduação em iniciação científica.

Jorge Luis Badel Pacheco, contratado pela UFV como fitobacteriologista concursado, é natural da Colômbia e graduado em Biologia e Química (1984), pela Universidad del Valle, Colômbia. Tem mestrado em Bioquímica (1989), com a dissertação “Consumo de Glucosa y Glutamina por Tejidos Tumoraes de Humanos”, orientado por Carlos Corredor e doutorado em Fitopatologia (2003), Cornell University, com a tese: “Contributions of the *hrp/hrc* cluster and conserved effector locus to the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000”, orientado por Alan R. Collmer. Fez pós-doutorado no The Sainsbury Laboratory, TSL, Inglaterra (2008-2011) e também na UFV (2012-2015). Atuou também na Universidad Nacional de Colombia, no ensino de fitobacteriologia (2003-2005), na Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA e no Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFÉ (2003-2005), além do Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT (1992-1996). Publicou 17 artigos científicos, dos quais sete com bactérias fitopatogênicas, principalmente *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al. Ainda não tem orientações concluídas e orienta duas dissertações de mestrado.

Na UFLA, encontra-se o professor **Ricardo Magela de Souza** (Figura 8). Ricardo Magela é engenheiro agrônomo pela Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL, 1983). Fez o mestrado (1987) e Doutorado (1992) na UFV, com a dissertação “Elicitação de uma fitoalexina em cafeeiro (*Coffea arabica* L.)” e com a tese “Cianogênese na interação mandioca *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (*X. axonopodis* pv. *manihotis*) e sensibilidade de fitobactérias a cianeto”. Desde 1992 é docente da UFLA, sendo atualmente Professor Titular em Bacteriologia de Plantas. Participa de cinco grupos de pesquisa-CNPq, sendo quatro na UFLA e um na UFRGS, tendo publicado 70 artigos científicos e 8 capítulos de livros. Na pós-graduação já formou 19 mestres, 12 doutores e 2 pós-doutores. Na graduação orientou 28 alunos.

Um dos últimos discípulos de Reginaldo Romeiro foi **Bernardo de Almeida Halfeld Vieira** (Figura 8). Fez graduação em Agronomia pela UFRRJ (1996), mestrado em Agronomia (Fitopatologia) pela UFLA (1999) com a dissertação “Caracterização fisiológica, molecular e virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*”, orientado por Ricardo Magela e

doutorado em Agronomia (Fitopatologia) pela UFV (2002), com a tese “Bactérias residentes do filopiano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura”, orientado por Reginaldo Romeiro. É pesquisador da Embrapa desde 2001, inicialmente em Roraima, sendo transferido em 2010 para a Embrapa Meio Ambiente, onde é pesquisador A. É professor-orientador do curso de pós-graduação da UFRR, onde formou quatro mestres e cinco alunos de graduação. Publicou 52 artigos científicos, dentre os quais 17 com fitobactérias.

7. Núcleos em Brasília

Na Universidade de Brasília - UnB, um dos fundadores da pós-graduação em Fitopatologia, foi o grande mestre fitobacteriologista Armando Takatsu (Figura 9), que sempre colaborou com seus colegas da UnB, professores Carlos Hidemi Uesugi e Marisa Alvares da Silva Velloso Ferreira; com pesquisadores da Embrapa Hortaliças, Carlos Alberto Lopes e Alice Maria Quezado Duval e da Embrapa Quarentena Vegetal, Abi Soares dos Anjos Marques e Sueli Corrêa Marques de Mello. Presença constante nos congressos brasileiros de fitopatologia, Armando Takatsu foi sempre muito atuante e querido por todos.

Armando Takatsu, nasceu em 1936 na cidade de São Paulo. É engenheiro agrônomo pela USP (1966) e doutor em Agronomia com a tese “Estudos sobre a antracnose do pimentão, berinjela e jiló”, orientada por Paulo Campos Torres de Carvalho, pela ESALQ-USP (1970). Concluiu dois pós-doutorados: um no Centro Internacional por Agricultura Tropical (Colômbia, 1974) e outro no National Institute of Agrobiological Resources (Japão, 1979). Recebeu o título de professor emérito da UnB em 2006, o que considerou um reconhecimento especial pelo seu trabalho na universidade durante 30 anos. Ele afirmou que o fato de encontrar ex-alunos em cargos importantes lhe dá força moral e satisfação para seguir sua carreira. Atuou na pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia e atualmente é professor e pesquisador voluntário da UnB, Departamento de Fitopatologia, Programa de pós-graduação em Fitopatologia. Trabalhou com diversas bactérias fitopatogênicas dentre as quais, *X. axonopodis* pv. *manihotis*, *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., *X. fastidiosa*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye e *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Amaral et al.) Young et al. No Instituto de Biologia da UnB, publicou mais de 50 artigos científicos de 1967 a 1997 e orientou 24 alunos entre mestres e doutores. Assim

como Charles Robbs, foi muito convidado para consultorias em campo, tendo participado da detecção do Moko da bananeira em Alagoas.



Figura 9. Carlos Alberto Lopes e Alice Quezado Duval (primeiro e terceiro da esquerda para direita) em campo de tomate; Carlos A. Lopes e Armando Takatsu; Marisa Ferreira, Anna Cristina de Freitas, estudante de mestrado e Angélica Guimarães em campo de videira, Petrolina.

Marisa Alvares da Silva Velloso Ferreira (Figura 9) nasceu em Ouro Preto, Minas Gerais, filha de Marcio Velloso Ferreira e Marcia Alvares da Silva Ferreira. Engenheira agrônoma pela UnB em 1985, realizou mestrado em Fitopatologia, na UnB em 1989 e Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) na mesma universidade, em 1996, com a tese “Desenvolvimento de um marcador molecular de DNA mitocondrial para identificação de *Tilletia indica*”, orientada por Paul W. Tooley. Como bolsista da CAPES, fez pós-doutorado no Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, França, trabalhando com diversidade de *X. campestris* pv. *viticola* (2012-2013). É professora da UnB desde 1997, inicialmente como visitante e depois como associada. Participa dos grupos de pesquisa-CNPq, Fitopatologia e Sustentabilidade no Cerrado Brasileiro, UnB e Bacterioses da Videira, UFRPE. Publicou 35 artigos científicos, a maioria com fitobacterioses e quatro capítulos de livros. Formou oito mestres, três doutores e 23 alunos de graduação, em monografias e iniciação científica.

Marisa Ferreira diz ter tido grande influência do mestre Armando Takatsu. Julga como principais contribuições até o presente: a formação de dois doutores que atuam na área (bacteriologia e fitopatologia) e são bons profissionais em extensão e pesquisa, Loiselene Trindade (que recebeu o prêmio Capes de Tese em 2007) e Edivânio Araújo; o estabelecimento de parcerias de sucesso com

colegas para a solução e pesquisa de problemas, a exemplo do trabalho com o cancro bacteriano da videira que começou com uma colaboração em 1998 e continua até o presente; e o desenvolvimento de ferramentas moleculares para diagnose de três fitobacteriose importantes, o cancro bacteriano da videira, a seca dos ponteiros da goiabeira e a mancha bacteriana do tomateiro (Informação pessoal Marisa Alvares da Silva Velloso Ferreira, 2016).

Carlos Hidemi Uesugi graduou-se em Agronomia, pela UnB, em 1980. Realizou dois mestrados, sendo o primeiro em nematologia na UnB (1984) e o segundo em Agronomia, na Kyushu University, U-KYUSHU, Japão, com a dissertação “A causal bacterium of brown canker disease of pear” (1988) e o doutorado em Agronomia, na mesma universidade, com a tese “Analysis of membrane proteins of various plant pathogenic bacteria with special reference to pathovar differentiation”, (1990), ambos orientados por Satoshi Wakimoto. É professor da UnB desde 1993. Publicou 30 artigos científicos, sendo 19 em fitobacteriologia, um livro e um capítulo de livro em fitopatologia. Formou oito mestres, sete doutores e 30 alunos de graduação em iniciação científica ou monografias. Recebeu os prêmios de Melhor Apresentação Oral, Sociedade Brasileira de Fitopatologia e Jovens Talentos, Embrapa Cerrados, ambos em 2009.

A fitopatologia da UnB e do Brasil devem muito aos docentes que fundaram a pós-graduação desta universidade (mestrado em 1976 e doutorado em 1991), dentre eles Armando Takatsu. **José Carmine Dianese**, também fundador, publicou artigos e orientou pós-graduandos em fitobacteriologia, além de ter trazido Norman Schaad, da Universidade da Geórgia, o qual ajudou na fundação do mestrado e ministrou o primeiro curso de Bacteriologia Vegetal, em 1974. Este mesmo fitobacteriologista colaborou na realização do doutorado sanduiche de Marisa Ferreira, com Paul W. Tooley no USDA Frederick, USA (Dianese & Café Filho, 2013).

Outro importante núcleo em Brasília é a Embrapa Hortaliças, com os fitobacteriologistas Carlos Alberto Lopes e Alice Maria Quezado Duval.

Carlos Alberto Lopes (Figura 9) nasceu em Viçosa, MG, filho de Sebastião Lopes da Silva e Maria de Lourdes Cardoso Silva. Engenheiro Agrônomo pela UFV (1973), realizou mestrado em Fitopatologia pela Universidade de Wisconsin - Madison (1977) com a dissertação “Multiple disease screening for reaction to three bean diseases, orientada por D. Hagedorn” e doutorado em Fitopatologia pela Universidade da Flórida (1986) com a tese “Biological control of *Pseudomonas avenae* with epiphytic bacteria isolated from corn plants”, orientada por R. Stall. É pesquisador da Embrapa Hortaliças desde 1977,

professor colaborador na pós-graduação em fitopatologia da UnB, a partir de 1986 e da UFV, a partir de 2010. A partir de 1980, publicou 124 artigos científicos, editou/escreveu 17 livros, dentre os quais alguns muito famosos (Doenças bacterianas das hortaliças, Doenças do Tomateiro) e 53 capítulos de livros. Formou seis doutores, 11 mestres, um pós-doutor e oito alunos de graduação. Recebeu vários prêmios e distinções, sendo os últimos da Asociación Latino americana da Batata e Associação Brasileira da Batata, em 2012, e a Bota do Dr. Álvaro Santos Costa, da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, em 2013.

De acordo com Carlos Lopes, suas maiores contribuições para a fitobacteriologia são: artigos e livros sobre epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças; aulas e palestras sobre controle integrado de bacterioses, em especial pelo melhoramento genético na obtenção de resistência estável; e desenvolvimento de protocolos que permitiram a seleção de clones de batata com alta resistência à murcha bacteriana. Dentre os alunos que formou e que continuam na fitobacteriologia, Carlos Lopes destaca: Alice Maria Quezado Duval (Embrapa Hortaliças); Valácia Lemes S. Lobo (Embrapa Arroz e Feijão); Mauricio Rossato (UnB) e Thais R. Santiago (Pós-doutorado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) (Informação pessoal Carlos Alberto Lopes, 2016).

Carlos Lopes assegura que sua formação e atuação em fitobacteriologia foi influenciada no Brasil por: “Reginaldo Romeiro, que me fez gostar de fitopatologia e de bacteriologia na graduação e com o qual troquei ideias por muitos anos em minhas visitas a Viçosa; Charles F. Robbs, que me ensinou muito no início de minha carreira, de maneira informal, por meio de correspondências e reuniões técnicas; Armando Takatsu, com quem atuei em prazerosa parceria na UnB na coorientação de estudantes nas décadas de 1980 e 1990 e; Chukichi Kurozawa, que no início de minha carreira, quando o visitei na UNESP Botucatu, me contou ‘segredos’ do melhoramento para resistência a doenças bacterianas e me forneceu sementes de tomate de acessos resistentes e suscetíveis a algumas doenças bacterianas, bem como isolados das respectivas bactérias. Também recebeu influência de grandes mestres e pesquisadores do exterior, a exemplo de Arthur Kelman, Luis Sequeira, Robert E. Stall e Eduardo French” (Informação pessoal Carlos Alberto Lopes, 2016).

Alice Maria Quezado Duval (Figura 9), natural de Fortaleza, Ceará é filha de Antonio Pedro Soares e Maria Quezado Soares. Engenheira agrônoma pela UnB (1987), fez mestrado em Fitopatologia pela mesma universidade (1992) com a dissertação “Estudos sobre *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard &

Suggs em milho-pipoca (*Zea mays* L.): caracterização de isolados, detecção de fontes de resistência em populações e perdas na produção da var. South American Mushroom”, orientada por Carlos Alberto Lopes e doutorado em Agronomia (Fitopatologia) pela ESALQ-USP (2003) com a tese “Diversidade de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana em *Lycopersicon esculentum*, em campos destinados ao processamento industrial no Brasil” orientada por Luiz Eduardo Aranha Camargo. Desde 1994 é pesquisadora da Embrapa Hortaliças. É docente permanente do Curso de Mestrado Profissionalizante em Olericultura do Instituto Federal Goiano, campus Morrinhos, Goiás e coordenadora da Disciplina Manejo Integrado de Doenças. Publicou 40 artigos, 2 livros e 13 capítulos de livros. Formou 10 mestres, dois pós-doutores e oito alunos de graduação, em monografias ou iniciação científica. Possui registro da ‘BRS Sena’, no. 28686, cultivar de tomate resistente a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye & Wilkie e certa tolerância a *Xanthomonas* spp., em parceria com colaboradores (Furumoto et al., 2012). Para Alice, suas maiores contribuições para a Fitobacteriologia foram: levantamento de espécies e raças de *Xanthomonas* que causam a mancha bacteriana em tomateiro no Brasil; ajustes de metodologia de identificação das espécies dessas *Xanthomonas*; desenvolvimento e inserção na cadeia produtiva do híbrido de tomate para processamento industrial BRS Sena, com melhor desempenho frente à mancha bacteriana; os estudos epidemiológicos e de hospedeiras alternativas das *Xanthomonas* do complexo mancha bacteriana do tomateiro e a prática de controle da mancha bacteriana do tomateiro pela integração de princípios ativos. Segundo ela, Carlos Alberto Lopes, da Embrapa Hortaliças e Rui Pereira Leite Júnior, do IAPAR, foram suas principais influências na Fitobacteriologia (Informação pessoal Alice Maria Quezado Duval, 2016).

Ainda em Brasília, **Abi Soares dos Anjos Marques** (Figura 8) atua na Embrapa Quarentena Vegetal, desmembrada da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN em 2011. Abi Marques possui graduação em Engenharia Agrônômica pela UFRPE (1977), mestrado em Fitopatologia pela UnB (1980) e doutorado em Bacteriologia Vegetal pela Escola Nacional Superior de Agronomia de Rennes/Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica, França (2000), com a tese “Graisie à halo du haricot due à *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*: diversité de l'agent pathogène, dynamique des populations bactériennes au cours des phases épiphytes et pathogènes”, orientada por Régine Samson. De 2009-2010 realizou pós-doutorado no USDA- ARS- Foreign Disease-Weed Science Research Unit, USA, com bolsa da Embrapa, trabalhando com “*Candidatus Liberibacter* spp.”. Desde 1985 é pesquisadora do

CENARGEN e a partir de 2011 da Embrapa Quarentena Vegetal, atualmente nível A. Publicou 23 artigos científicos, um livro e cinco capítulos de livros. Formou quatro pós-doutores e 23 alunos de graduação, em monografias ou iniciação científica. Abi Marques nasceu em Abaíra, BA (pequena cidade na região da Chapada Diamantina), filha de Ananias Temóteo dos Anjos e Cecília Costa Soares dos Anjos, e sua vocação para fitobacteriologia foi influenciada por Armando Takatsu, Régine Samson e Norman Schaad. Ela considera que suas principais contribuições para esta área no Brasil foram, o desenvolvimento e validação de métodos diagnósticos para fitobacterioses, a atuação na 'promoção da visibilidade' e 'compreensão da importância' sobre o tema Quarentena Vegetal e a formação de recursos humanos (Informação pessoal Abi Soares dos Anjos Marques, 2016).

Sueli Corrêa Marques de Mello, aluna de doutorado de Armando Takatsu, é agrônoma pela UnB, com mestrado em Ciências Biológicas (Fitopatologia) e doutorado em Fitopatologia “Resistência do tomateiro à mancha-bacteriana de *X. vesicatoria*” também pela UnB. É pesquisadora do CENARGEN, onde desenvolve pesquisa em recursos genéticos microbianos e controle biológico e responde pelo Banco de Recursos Genéticos Microbianos do CENARGEN, junto ao Conselho de Patrimônio Genético (CGEN). Colabora no Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia da UnB, como professora e orientadora de Mestrado e Doutorado.

8. Núcleos no Rio Grande do Sul

Na Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, destacou-se o professor **Valmir Duarte** (Figura 10), que nasceu em Porto Alegre, RS, em 12 de outubro de 1953, filho de Leocádia Maria Beckerle Duarte e Ramão Duarte. Recebeu o título de engenheiro agrônomo da UFRGS em 1977. Defendeu sua dissertação de mestrado em Fitotecnia, em 1981, também na UFRGS, orientado pelo Prof. Miguel D. M. Porto, que julga como maior influenciador de sua formação e atuação em fitobacteriologia. O doutorado, iniciado em junho de 1987, em Plant Health - Louisiana State University System, foi orientado por Christopher A. Clark e concluído em 1990 com a tese “Ecology of *Erwinia chrysanthemi*, causal agent of bacterial stem and root rot on sweetpotato and etiology of souring”. Em 2001, permaneceu em treinamento de pós-doutorado no Canadian Food Inspection Agency, Charlottetown, Prince Edward Island, Canadá, sob a orientação do Dr. Solke De Boer.



Figura 10. João Ruy Jardim Freire; Valmir Duarte e Arthur Kelman em Guadaloupe, Antilhas Francesas, 1997; Valmir Duarte e Rosa Mariano no Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, em 2006.

Começou sua carreira docente como professor no curso de Agronomia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS de Uruguaiana), trabalhando durante 1980. No final daquele ano, iniciou como docente do curso de Agronomia da UFRGS, mas atuou também como professor na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis e na pós-graduação da Universidade de Passo Fundo. Aposentou-se como professor titular de Fitopatologia da UFRGS em 2011, onde continuou como colaborador convidado pelo Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, até abril de 2015. O “Agrônômica - Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria” e “Alfa - Consultoria e Análise de Risco de Pragas Ltda.” são de sua propriedade em parcerias. Valmir Duarte publicou 53 artigos científicos, dos quais 33 em fitobacteriologia e sete capítulos de livros. Formou 13 mestres, oito doutores e 11 alunos de graduação em iniciação científica.

Valmir Duarte considera como principais contribuições a fitobacteriologia: o oferecimento da disciplina Fitobacteriologia no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Faculdade de Agronomia, UFRGS, no período de 1992 até 2012 e a proposta de uma nova subespécie de *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*), denominada de *brasiliensis* por ele e colaboradores (Bull et al. 2012; Duarte et al., 2004). Valmir Duarte comunicou que o professor João Ruy Jardim Freire atuou no curso de Agronomia como fitobacteriologista (Informação pessoal Valmir Duarte, 2016)

João Ruy Jardim Freire (Figura 10) natural do Rio Grande do Sul, passou a maior parte da vida trabalhando na área agropecuária. Iniciou sua carreira profissional, em 1946, na Seção de Bacteriologia da Secretaria Estadual da Agricultura, atualmente denominado Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio (LFBN), pertencente à Fundação Estadual de Pesquisa agropecuária, Fepagro. Trabalhou na Secretaria da Agricultura até 1964 e, desde 1957, foi professor da UFRGS, inicialmente em fitobacteriologia, migrando depois para a microbiologia, onde se destacou na pesquisa com rizóbios e foi homenageado com seu nome na nova espécie *Rhizobium freirei*. Em 2011, recebeu o título de Professor Emérito da UFRGS, quando ressaltou a importância da ajuda de colegas, funcionários e instituições no desenvolvimento de suas pesquisas, afirmando que “sonhar é uma tarefa individual; tornar os sonhos realidade requer colaboração e dedicação”.

Na Universidade Federal de Pelotas encontra-se **Andrea Bittencourt Moura** (Figura 8) que teve sua formação na UFV, onde após a graduação em Agronomia (1989), realizou, sob a orientação do professor Reginaldo Romeiro, mestrado e doutorado em Agronomia (Fitopatologia), com a dissertação “Detecção e quantificação de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em lotes de sementes de pepino” (1992) e tese “Actinomicetos como agentes potenciais de controle biológico da murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e como promotores de crescimento de tomateiro” (1996).

Desde 1997 é professora associada da UFPel, tendo realizado o seu pós-doutorado em 2016, na Università degli Studi di Verona, UNIVERONA, Itália, como bolsista do CNPq. Participa de dois grupos de pesquisa no CNPq, sendo um na UFPel e o outro na UFRGS, tendo já publicado 45 artigos, 4 livros e 6 capítulos.

Antes de completar 20 anos de carreira acadêmica, já formou 21 mestres, oito doutores, 3 pós-doutores e 50 alunos de graduação em iniciação científica ou monografia. Sempre incentivou seus alunos a alçarem voo e assim, duas de suas estudantes de mestrado, Indira del Carmem Molo Alvarado, do Panamá e Carine Rosa Naue, de Bajé, RS, fizeram doutorado na UFRPE, sob orientação de Rosa de Lima Ramos Mariano.

9. Núcleos em Pernambuco

Na UFRPE, está o grupo de pesquisa de Rosa de Lima Ramos Mariano e Elineide Barbosa de Souza. Ainda estudante de Agronomia, **Rosa de Lima Ramos Mariano** (Figuras 8, 10 e 11), realizou estágio de um mês na UFRJ

(janeiro de 1974), com o professor Charles Robbs e seus colaboradores, os professores Osamu Kimura, Fujio Akiba e Raul de Lucena Duarte Ribeiro (Figura 8). Do convívio diário e aprendizagem com este grupo de expoentes da fitobacteriologia, resultou a firme resolução de dedicar-se, em Pernambuco, ao estudo das bactérias fitopatogênicas.

Terminada a graduação, já concursada na UFRPE, partiu para o mestrado na UFV, em meados de 1975, tendo como primeiro orientador aquele que iria consolidar sua paixão pela área tão carente, à época, de pesquisadores e professores, Reginaldo Romeiro. Foi sua primeira orientanda e iria trabalhar com bacteriófagos, mas ele foi chamado para o doutorado na Universidade de Missouri, USA e ela foi “herdada” pelo professor Kyioshi Matsuoka. Concluiu sua dissertação “Métodos de Detecção de *Corynebacterium michiganensis* subsp. *michiganensis* em sementes de tomate” em 1978, regressando à docência na UFRPE. Incentivada pelo professor Romero Marinho de Moura e pela professora Maria Menezes, seguiu para o doutorado em 1982 na University of Georgia – UGA, Athens, GA, USA. E finalmente, após quatro anos sem retornar ao Brasil, voltou com o Ph.D. em Fitopatologia (Fitobacteriologia) e a tese “Ecology of three fluorescent pseudomonads that cause diseases on tomato”, orientada por States Marion McCarter e apresentada no XIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia em Brasília, 1986. A partir de então, começou a ministrar a disciplina de Fitobacteriologia no já existente Mestrado em Fitossanidade, tendo como primeira orientanda Ruth Linda Benchimol Stein, da Embrapa Amazônia Oriental, que concluiu o mestrado em 1988.

A partir daí a paixão pela fitobacteriologia só aumentou, estendendo-se às bactérias promotoras de crescimento e biocontroladoras. Laboratório sempre repleto de ótimos alunos, participação em congressos e cursos na Austrália, China, Japão, Guadalupe, Argentina, Chile, e, principalmente, nos realizados no Brasil. Como principais contribuições para a fitobacteriologia, destaca a formação de recursos humanos (53 na graduação em monografias ou iniciação científica, 21 mestres e 12 doutores) a exemplo de Elineide Barbosa de Souza (UFRPE), Marco Aurélio Siqueira da Gama (UFRPE), Adriano Márcio Freire Silva (pós-doutorando da UFRPE) (Figura 11), Ana Rosa Peixoto (Universidade Estadual da Bahia, UNEB), Maria Angélica Guimarães Barbosa (Embrapa Semiárido), Indira del Carmen Molo Alvarado (Ministério de Agricultura do Panamá) e Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros (UFLA), entre outros. Vários deles participam dos dois grupos de pesquisa que coordena na UFRPE, “Bactérias fitopatogênicas, promotoras de crescimento e de biocontrole” e “Bacterioses da Videira”.



Figura 11. Elineide Souza e Marco Aurélio Siqueira da Gama (1 e 3) no Lafibac, UFRPE, com alunos de mestrado, doutorado e os pós-doutores Nelson Bernardi (4), Kátia Félix (5) e Adriano Silva (6); Rosa Mariano recebendo o prêmio “Bota de Dr. Álvaro Santos Costa” no Congresso Brasileiro de Fitopatologia em 2006 e; Elineide Souza, Marco Gama e Rosa Mariano, professores de Fitobacteriologia da UFRPE.

Considera também que as pesquisas realizadas no Laboratório de Fitobacteriologia – LAFIBAC, da UFRPE, sob sua orientação, que resultaram em 163 artigos científicos, 39 capítulos e três livros, contribuíram para minimizar os prejuízos causados por algumas fitobacterioses importantes no Nordeste, a exemplo da mancha aquosa do meloeiro e melancieira (*Acidovorax*

citrulli (Schaad et al.) Schaad et al.), cancro bacteriano da videira (*X. campestris* pv. *viticola*), podridão mole da alface e couve chinesa (*Pectobacterium carotovorum* ssp.) e murcha bacteriana das solanáceas, bananeira e helicônias (*R. solanacearum*). Assinala que a fitobacteriologia da UFRPE evoluiu muito a partir das cooperações e intercâmbios realizados com grandes mestres, a exemplo de, John C. Sutton (University of Guelph, Canadá), Joseph W. Kloepper (University of Alabama, USA) e A. C. Hayward (University of Queensland, Austrália).

Aposentada como titular em 1996, não se afastou do LAFIBAC e do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE (PPGF), onde participou como visitante por quatro anos e participa até o momento, como colaboradora e bolsista de produtividade do CNPq. Comemorou 40 anos de “Rural” em 2015 e festeja 20 anos de aposentadoria, agora em maio de 2016. Dentre os prêmios que recebeu, destaca a Bota de Dr. Álvaro Santos Costa, homenagem da Sociedade Brasileira de Fitopatologia em 2006, no XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia e sua participação nas Academias Pernambucana e Brasileira de Ciência Agrônômica.

Elineide Barbosa de Souza (Figuras 8 e 11) nasceu em Bezerros, Pernambuco, filha de José Barbosa de Souza e Cleonice Maria de Souza. É engenheira agrônoma pela UFRPE (1991), tem mestrado e doutorado pela mesma universidade (1995 e 2002), com a dissertação “Antagonismo das rizobactérias *Bacillus* spp. contra *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith, agente da murcha bacteriana, e efeito no desenvolvimento de plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)” e com a tese “Variabilidade de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e epidemiologia da mancha-aquosa em melão”, ambas orientadas por Rosa Mariano, com a qual vem trabalhando em produtiva parceria desde 2000. Mais que colegas são amigas e Rosa Mariano a considera seu braço direito, no LAFIBAC e no PPGF. Já formou 10 mestres, seis doutores, 48 graduados e um pós-doutor, o que considera como sua maior contribuição à fitobacteriologia, juntamente com a coautoria na publicação do Manual de Práticas em Fitobacteriologia, com a 3ª. edição lançada em 2016. Nos seus 14 anos de vida acadêmica publicou 65 artigos científicos, dois livros e 33 capítulos de livros, sendo muito querida por todos os orientados.

Marco Aurélio Siqueira da Gama (Figura 11) nasceu em Recife, PE, filho de José Rodrigues da Gama e Ana Maria de Siqueira Gama. Na UFRPE, concluiu a graduação em Agronomia (2007), o mestrado (2010) com a dissertação “Caracterização fenotípica, patogênica e molecular de isolados pigmentados de *Xanthomonas* causando mancha-de-xanthomonas em cajueiro” e

o doutorado (2014) com a tese “Caracterização polifásica de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e reposicionamento de espécies de *Xanthomonas* patogênicas à videira e cajueiro”; ambas no PPGF, orientadas por Elineide B. de Souza. Desde 2014 é professor adjunto da UFRPE, atuando no ensino de graduação e pós-graduação, e na pesquisa com identificação, variabilidade e caracterização polifásica de fitobactérias, tratamento de sementes para controle de fitobacterioses e indução a infecções quiescentes. Com tão pouco tempo de vida acadêmica, já formou um mestre e um graduado, e orienta três mestrandos e três doutorandos. Considera como contribuição inicial para a fitobacteriologia o esclarecimento de aspectos etiológicos de espécies de *Xanthomonas* relacionadas às anacardiáceas e à videira, além do estabelecimento de cooperação com a Louisiana State University (Dr. Jong Hyun Ham), nessa área. Como inspiradoras do seu interesse pela fitobacteriologia considera as professoras Elineide B. de Souza e Rosa Mariano (Informação pessoal Marco Aurélio Siqueira da Gama, 2016).

Na Universidade do Estado da Bahia – UNEB em Juazeiro, encontra-se **Ana Rosa Peixoto** que nasceu em Recife, filha de Pedro de Melo Peixoto e Maria de Lourdes Peixoto. Graduou-se em Agronomia pela UFRPE, onde concluiu também seu mestrado com a dissertação “Ação antagônica de *Pseudomonas* spp. fluorescentes contra *P. solanacearum*, agente causal da murcha bacteriana do tomateiro” (1994) e doutorado com a tese “Cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) da videira (*Vitis* spp.): métodos de preservação e crescimento de isolados; escala diagramática e reação de variedades de videira à doença” (2005), ambos no PPGF. Segundo Rosa Mariano, sua orientadora, nunca se restringiu aos trabalhos básicos da dissertação e tese, sempre realizando trabalhos adicionais. Desde 1995 é professora da UNEB, onde atualmente é titular e tem atuado no estudo de doenças bacterianas, qualidade sanitária de sementes e controle alternativo de doenças de plantas. Publicou 40 artigos científicos e quatro capítulos de livros; e formou sete mestres, um doutor e 14 graduados. Julga como maiores contribuições à fitobacteriologia: ter participado da descoberta da etiologia do cancro bacteriano da videira (*X. campestris* pv. *viticola*), no Submédio do Vale do São Francisco e colaborado para o manejo desta doença pela resistência genética e indução de resistência (Informação pessoal Ana Rosa Peixoto, 2016).

Maria Angélica Guimarães Barbosa (Figura 9), nasceu em Recife, PE. Na UFRPE concluiu a graduação em Agronomia (1992), bem como o mestrado (1998) e doutorado em Fitopatologia (2006). É também graduada em Direito. Foi professora da Universidade Federal do Pará de 2004 a 2006. Desde 2006 é

pesquisadora da Embrapa Semiárido, onde estuda doenças da videira, e apesar das suas dissertação e tese não versarem sobre fitobacteriologia, tem contribuído notavelmente para solução de problemas causados pelo cancro bacteriano no Submédio do Vale do São Francisco, em colaboração com a UFRPE, UnB e UFRRJ. Faz parte do Grupo de Pesquisa CNPq “Bacterioses da videira”.

10. Outros nomes

Não se pode, neste trabalho, deixar de citar outros colegas que deram contribuições à fitobacteriologia no Brasil, tais como: **José Júlio da Ponte**, que estudou fitobacterioses em colorau, alfafa, bananeira, feijão macassar e chuchu, na UFC; **Rosalee A. Coelho Netto**, com estudos sobre murcha bacteriana no Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA; **Gilmar P. Henz** que estudou fitobacterioses na Embrapa Hortaliças; **Rui Pereira Leite Jr.**, que pesquisa sobre bactérias fitopatogênicas no IAPAR do Paraná; **Dirceu Macagnan**, orientado de Reginaldo Romeiro na UFV; **Cleusa Maria Mantovanelo Lucon**, no IB, São Paulo; **Hiroshi Noda** que criou a cultivar de tomate ‘Yoshimatsu’ tolerante a murcha bacteriana das solanáceas, no INPA; **Edson Ampélio Pozza** na UFLA; **Luis Sebastião Poltronieri** e **Paulo S. T. Brioso** que detectaram *Xyllela fastidiosa* no Pará; **Olinda Maria Martins**, que estudou *R. solanacearum* (Malavolta et al., 2008); **H. P. Liu** do PLANALSUCAR, Carpina, Pernambuco, que estudou as doenças da cana-de-açúcar, dentre elas as fitobacterioses raquitismo das soqueiras, estrias vermelhas, estrias mosqueadas e escaldadura (Mariano & Michereff, 1994); **Paulo Estevão de Souza** na UFLA; **Chukichi Kurozawa**, no melhoramento para resistência a doenças bacterianas; **Nilvanira Donizeti Tebaldi**, na UFU; **Andréa Maria André Gomes** e **Sayonara Paulino de Assis**, na UFRPE; **João Pedro Pimentel**, na UFRRJ, entre outros que não foram citados nesta revisão por questão de espaço.

11. Fitobacterioses no Brasil, índices, listas e livros

A primeira lista específica de fitobacterioses ocorrendo no Brasil foi publicada em 1981, pelo Dr. Charles Robbs e colaboradores na V International Conference of Plant Pathogenic Bacteria em Cali, Colômbia (Robbs et al., 1981), um trabalho clássico de referência, bastante conhecido como “Annotated List”.

Livros e índices de doenças incluindo algumas bacterioses foram também publicados (Robbs, 1954a e 1954b; Reifschneider et al., 1983; Siqueira et al., 1985; Pitta et al., 1989; Robbs & Rodrigues Neto, 1999).

A partir de 1993, o grupo de Fitobacteriologia da UFRPE iniciou o resgate da bibliografia publicada em Pernambuco (Mariano & Michereff, 1994) e no Brasil, sobre bactérias fitopatogênicas (Michereff & Mariano, 1993; Reis & Mariano, 1994; Silveira et al., 1996; Gomes et al., 1998).

Um índice completo de fitobacterioses assinaladas no Brasil foi publicado em 1994 (Marques et al., 1994), trazendo a distribuição geográfica da doença e entradas pelo nome comum e binômio latino do hospedeiro, e ainda pelo nome científico do patógeno, além do texto com entrada pelo nome da família do hospedeiro. As doenças bacterianas de plantas ornamentais no Brasil foram também listadas (Malavolta et al., 1995). Neste mesmo ano, a 1ª. edição do livro “Bactérias Fitopatogênicas”, do professor Reginaldo Romeiro, trazia em seu último capítulo uma lista das fitobacterioses mais importantes no Brasil, a qual foi atualizada na 2ª. Edição em 2005 (Romeiro, 1995; Romeiro, 2005).

Em 1993, a Revisão Anual de Patologia de Plantas – RAPP, editada pelo Wilmar Cório da Luz, da Embrapa Trigo no Rio Grande do Sul e colaboradores, principiou a publicação de uma excelente série de revisões sobre a Taxonomia dos principais gêneros de bactérias fitopatogênicas, incluindo *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, Corinebactérias, *Agrobacterium* e *Erwinia* (Robbs & Rodrigues Neto, 1993; Kimura & Ribeiro, 1994; Takatsu, 1995; Beriam & Malavolta Jr., 1996; Duarte, 2002).

Finalmente, em 2008, o periódico Summa Phytopathologica dedicou um Suplemento Especial do volume 34 para a publicação da lista: “Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização”. Excelente trabalho de revisão com 722 referências bibliográficas. É o índice brasileiro mais completo, até setembro de 2007. Os autores, Valdemar A. Malavolta Jr., Luís O.S. Beriam, Irene M. G. Almeida, Júlio Rodrigues Neto e Charles F. Robbs, fazem uma discussão bem detalhada sobre o que consta ou não na listagem e o porquê de não constar. Incluem a ocorrência, nome popular e científico do patógeno e hospedeiros, além de região ou estado de constatação (Malavolta Jr. et al., 2008).

Alguns livros didáticos em Fitobacteriologia foram publicados no Brasil: Bactérias Fitopatogênicas, em duas edições (Romeiro, 1995, 2005) e Métodos em Bacteriologia de Plantas (Romeiro, 2001); Apontamentos de Técnicas em Fitobacteriologia e Técnicas em Fitobacteriologia (Maringoni, 1995, 2010) e Manual de Práticas em Fitobacteriologia em três edições (Mariano, 2000, Mariano & Silveira, 2005, Mariano & Souza, 2016).

12. Considerações finais

Em agradecimento aos vários alunos que formou, Rosa Mariano quer deixar para as novas gerações os exemplos de amor pela pesquisa científica bem realizada e com responsabilidade, o estudo e atualização diários e o espírito de equipe e união. Tudo isto sem esquecer o amor a Deus e ao próximo, representado pela família, colegas, amigos e todos que necessitam de ajuda.

Aos colegas que enviaram fotos e respostas ao pequeno questionário que lhes enviou, Rosa Mariano expressa seu agradecimento.

Por fim, em memória dos grandes mestres fitobacteriologistas, que lhe inculcaram o amor pelo tema, deseja deixar para as futuras gerações, a 3ª. edição do “Manual de Práticas em Fitobacteriologia” (Mariano & Souza, 2016), e esta revisão, onde procurou resgatar a história da Fitobacteriologia no Brasil. Entretanto, ela sabe da incompletude desta tarefa, primeiro porque, pelo exíguo tempo de pesquisa, alguns nomes deixaram de ser aqui citados, e segundo porque a história não tem fim, a história continua, e certamente com tanta garra e amor quanto as demonstradas pelos nossos pioneiros.

13. Bibliografia

- AMARAL, J. F. Doença bacteriana (*Phytophthora*) do gergelim. **O Biológico**, v. 8, p.118, 1942.
- AMARAL, J. F. do. Doenças vasculares das plantas causadas por bactérias. **O Biológico**, v. 11, p. 250-253, 1945.
- AMARAL, J. F. Principais doenças das plantas cultivadas no estado de São Paulo e seus respectivos tratamentos. **O Biológico**, v. 17, p.179-188, 1951.
- AMARAL, J. F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E. D. O bactério causador da mancha aureolada do cafeeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 23, p. 151-155, 1956.
- AMARAL, J. F. Providências para a erradicação do “cancro cítrico”. **O Biológico**, v. 23, p.112-123, 1957.
- ANÔNIMO. **Victoria Rossetti**. Grandes nomes. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/grandesnomes/victoria.php>>. Acesso em: 20 abr. 2016.
- BATISTA, A. C. Principais doenças das plantas cultivadas em o Nordeste. **Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio de Pernambuco**, v. 13, p. 195-252, 1946.
- BATISTA, A. C. Principais doenças das plantas cultivadas em o Nordeste. **Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio de Pernambuco**, v. 14, p. 5-46, 1947.
- BATISTA, A. C. Doenças causadas por bactérias. In: _____. **Tratado de Fitopatologia**. Recife: Escola Superior de Agricultura de Pernambuco, 1953. p. 754-836. (Mimeografado).
- BRIENEN, R. P. **Visions of Savage Paradise** - Albert Eckhout, Court Painter in Colonial Dutch Brazil. Amsterdam: Amsterdam University Press, 2006. 288 p.
- BERIAM, L. O. S.; MALAVOLTA JR., V. A.; ROBBS, C. F. Considerações sobre o gênero *Agrobacterium*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 51-74, 1996.
- BONDAR, G. G. Moléstia bacteriana da mandioca. **Boletim de Agricultura**, v. 16, p. 513-524, 1915.

- BONDAR, G.G. Uma nova moléstia bacteriana das hastes da mandioca. **Chácaras e Quintaes**, v. 5, p. 15-18, 1912.
- BONFANTI, C. **HOMENAGEM. Excelência na dedicação à biologia**. Três professores do instituto da UnB recebem título de Professor Emérito pela atuação na criação da pós-graduação em Fitopatologia. 2006. Disponível em: <http://www.secom.unb.br/unbagencia/ag0506-22.htm>. Acesso em: 25 de maio de 2016.
- BUDDENHAGEN, I. W. Bacterial wilt of bananas: history and known distribution. **Tropical Agriculture**, v. 38, p. 107-21, 1961.
- BULL C. T.; DE BOER S. H.; DENNY T. P.; FIRRAO G.; FISCHER-LE SAUX, M.; SADDLER G. S.; SCORTICHINI M.; STEAD D. E.; TAKIKAWA Y. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, p. 551-592, 2010.
- BULL C. T.; DE BOER, S. H.; DENNY, T. P.; FIRRAO, G. M.; FISCHER-LE SAUX, M.; SADDLER, G. S.; SCORTICHINI, M.; STEAD, D. E.; TAKIKAWA, Y. List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 21-27, 2012.
- CAMINHA FILHO, A. Doenças da canna de assucar no Brasil. 1936. In: MOURA, R. M. (Org.). **Annaes da primeira reunião de phytopathologistas do Brasil, Rio de Janeiro, 1936**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2006. p. 245-250.
- DANTAS, B. A “**escaldadura das folhas**” da cana-de-açúcar. Recife: Comissão de combate as pragas da cana-de-açúcar no estado de Pernambuco, 1958. 9 p. (Publicação, n.7)
- DANTAS, B. Contribuição para história da gomose da cana-de-açúcar em Pernambuco e no Brasil. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Nordeste**, v. 11, p. 3-17, 1970a.
- DANTAS, B. Moléstias da cana-de-açúcar no Nordeste. **Ciência e Cultura**, v. 22, p. 392-399, 1970b.
- DANTAS, B. Uma nova doença da cana-de-açúcar em Pernambuco. **Boletim Técnico I.A.N.E.** v. 4, p. 3-17, 1956.
- DESLANDES, J. A. Doenças da banana. 1936. In: MOURA, R. M. (Org.). **Annaes da primeira reunião de phytopathologistas do Brasil, Rio de Janeiro, 1936**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2006. p. 253-261.
- DIANESE, J. C.; CAFÉ FILHO, A. C. História da Fitopatologia. In: Diniz, I. R. (Org.) **Instituto de Ciências Biológicas 1963-2013: fragmentos de memórias**. Brasília: UnB, 2013. p. 141-167.
- DRAENERT, F. M. Molestia da canna de assucar na Bahia. 1879. In: MOURA, R. M.; MENEZES, M.; MARIANO, R. L. R. (Eds.). **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 3, p. 327-231, 2006.
- DRAENERT, F. M. Molestia da canna de assucar na Bahia. **Jornal da Bahia**, n. 4935, p. 1, 1879.
- DRUMMOND, O. A. Autobiografia: Octávio de Almeida Drummond. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 5, p. 427-458, 1997.
- DUARTE, V.; DE BOER, S.; WARD, L. J; OLIVEIRA, A. M. R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 535-545, 2004.
- DUARTE, V. Taxonomia do gênero *Erwinia*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, p. 197-212, 2002.
- DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; GOTO, M.; HAYWARD, A. C.; LELLIOTT, R. A.; SCHROTH, M. N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. **Review of Plant Pathology**, v. 59, p.153-168, 1980.
- ELLIOTT, C. **Manual of bacterial plant pathogens**. 2. ed. Waltham: Chronica Botanica Co., 1951. 186 p.

- EMBRAPA. **Laboratório de Fitopatologia**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 2 p. (Folder)
- FURUMOTO, O.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; INOUE-NAGATA, A. K. **BRS Sena**. Patente. Número do registro: 28686, título: "BRS Sena". Brasília: Instituição de registro. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012.
- GOBBATO, C. Principais pragas e moléstias das vides cultivadas no Rio Grande do Sul. In: MOURA, R. M. (Org.). **Annaes da primeira reunião de phytopathologistas do Brasil, Rio de Janeiro, 1936**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2006. p. 241-244.
- GOMES, A. M. A.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. O gênero *Agrobacterium* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 197-203, 1998.
- GONÇALVES, C. R. Considerações sobre a transmissão de doenças das plantas pelos insectos. In: MOURA, R. M. (Org.). **Annaes da primeira reunião de phytopathologistas do Brasil, Rio de Janeiro, 1936**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2006. p. 151-161.
- KIMURA, O.; RIBEIRO, R. L. D. Taxonomia do gênero *Pseudomonas*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 209-228, 1994.
- LIMA M.F.; CARVALHO, R. C. P.; BRIOSO, P. S. T. **Histórico da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2014. 9 p. Disponível em: <www.sbfito.com.br/_pdf/historico.pdf>. Acesso em: 20 de abr. 2016.
- LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. Doenças bacterianas das hortaliças – Diagnose e controle. Brasília: Embrapa-CNPq, 1997. 70 p.
- MAIA, L. C. ; MOURA, R. M. Professor Doutor Augusto Chaves Batista; um pesquisador micologista à frente do seu tempo no Recife. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 10, p.92-98, 2013.
- MALAVOLTA JR., V. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J. ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, v. 34, Special supplement, 2008.
- MALAVOLTA JR., V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; BERIAM, L. O. S.; RODRIGUES NETO, J. Bactérias patogênicas a plantas ornamentais ocorrendo no Brasil: uma atualização. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 1, p. 56-63, 1995.
- MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Lista comentada de bactérias fitopatogênicas registradas e/ou estudadas no Estado de Pernambuco, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 499-509, 1994.
- MARIANO, R. L. R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária, 2000. 171 p.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. (Coords.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: Os Aurores, 2005. 184 p.
- MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. (Coords.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 3. ed. Recife: EDUFPRPE, 2016. 234 p.
- MARINGONI, A. C. **Apontamentos de técnicas em fitobacteriologia**. Botucatu: Fundação de Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1995. 29 p.
- MARINGONI, A. C. **Técnicas em fitobacteriologia**. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2010. 70 p.
- MARQUES, A. S. A.; ROBBS, C. F.; BOITEUX, L. S.; PARENTE, P. M. G. **Índice de fitobacterioses assinaladas no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 65 p.
- MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Gênero *Erwinia* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 19, p. 134-144, 1993.

- MOURA, R. M. (Org.). **Annaes da primeira reunião de phytopathologistas do Brasil, Rio de Janeiro, 1936**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2006. 460 p.
- NOLLA, J. A. B.; VALIELA, M. V. F. Contributions to the history of plant pathology in South America, Central America, and Mexico. **Annual Review of Phytopathology**, v. 14, p. 11-29, 1976.
- OLIVEIRA, L. B. de. O Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Nordeste, (IPEANE): um olhar sobre a sua história. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vols. 5-6, p. 66-78, 2008-2009.
- OLIVEIRA, J. R. **Reginaldo Romeiro**. Notícias - 08/03/2010. Universidade Federal de Viçosa, 2010. Disponível em: <https://www2.dti.ufv.br/ccs_noticias/scripts/exibeNoNoticiasticia.php?cod Not=11008>. Acesso em: 20 abr. 2016.
- PITTA, G. P. B.; CARDOSO, R. M. G.; CARDOSO, E. J. B. N. **Doenças das plantas ornamentais**. São Paulo: Instituto Brasileiro do Livro Científico, 1989. 174 p.
- PUTTEMANS, A. Alguns dados para servir à história da Phytopathologia no Brasil e as primeiras notificações de doenças vegetais neste país. (1936). In: MOURA, R. M. (Org.). **Annaes da primeira reunião de phytopathologistas do Brasil, Rio de Janeiro, 1936**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2006. p. 37-60.
- REBOUÇAS, M. M. Agésilau Antônio Bitancourt. **O Biológico**, v. 67, p. 51-54, 2005.
- REIFSCHNEIDER, F. J. B.; SIQUEIRA, C. B.; CORDEIRO, C. M. T. **Índice de doenças de hortaliças no Brasil: bactérias e fungos**. Brasília: Embrapa CNPH, 1983, 156 p.
- REIS, A.; MARIANO, R. L. R. O gênero *Clavibacter* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 20, p. 83-89, 1994.
- RIBEIRO, M. A. R. Desenvolvimento da citricultura brasileira e a pesquisa científica e tecnológica (1930-2006). In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE HISTORIA ECONOMICA, 1., 2007, Montevideu. **Resúmenes...** Montevideu: Associação Latino Americana de História econômica, 2007.
- RIBEIRO, M. A. R. Instituto Biológico de São Paulo. **Revista Brasileira de Inovação**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 197-224, 2011.
- RIBEIRO, M. A. R. **História, Ciência e Tecnologia – 70 anos do Instituto Biológico de São Paulo na defesa da agricultura 1927-1997**. São Paulo: Instituto Biológico, 1997.
- ROBBS, C. F. Contribuição ao estudo de uma bacteriose em *Stapelia variegata*. **Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia**, v. 7, p. 407-414, 1946.
- ROBBS, C. F. Autobiografia: Charles Robbs. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 365-390, 2000.
- ROBBS, C. F. Algumas bactérias fitopatogênicas do Distrito Federal. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE AGRONOMIA, 2., 1954, Piracicaba. **Anais ...** Piracicaba: Comissão do IV Centenário de São Paulo, 1954a. p. 379-380.
- ROBBS, C. F. Bactérias Fitopatogênicas do Brasil. **Agronomia**, v. 13, p. 265-382, 1954b.
- ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J. Enfermidades causadas por bactérias em fruteiras tropicais no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 73-76, 1999.
- ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J. Taxonomia de *Xanthomonas*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 143-164, 1993.
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Editora UFV, 1995. 367 p.
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 417 p.
- ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279 p.
- ROSSETTI, V. Agésilau Antonio Bitancourt. **Fitopatologia brasileira**, v. 12, p. 290-292, 1987.

- ROSSETTI, V. Homenagem dos fitopatologistas a Bitancourt, A. A. **Summa Phytopathologica**, v. 1, p. 2434-2444, 1975.
- ROSSETTI, V. Autobiografia: Victória Rossetti. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, v. 3, p. 391-429, 1995.
- ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVE, J. M.; BERETTA, M. J. G.; TEIXEIRA, A. R. R.; QUAGGIO, J. A.; NEGRI, J. D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Comptes Rendus Academie Science Paris**, t. 10, Série III, p. 345-349, 1990.
- SILVEIRA, N. S. S.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. O gênero *Pseudomonas solanacearum* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 22, p. 97-111, 1996.
- SIMPSON, A. J.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L. M.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J. M.; BRIONES, M. R.; BUENO, M. R.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.; COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C.; COSTA-NETO, C. M.; COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, V. C.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.; FRANÇA, S. C.; FRANCO, M. C.; FROHME, M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; GOMES, S. L.; GRUBER, A.; HO, P. L.; HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M. L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J. E.; KURAMAE, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOPES, S. A.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MADEIRA, H. M.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E. A.; MARTINS, E. M.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI, C. Y.; MONTERIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO, A. L.; NETTO, L. E.; NHANI, A. JR.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A.; PEREIRA, H. A. J. R.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO, R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V.; DE M ROSA, A. J.; DE ROSA, V. E. J. R.; DE SÁ, R. G.; SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H. E.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DA SILVA, F. R.; DA SILVA, W. A. JR.; DA SILVEIRA, J. F.; SILVESTRI, M. L.; SIQUEIRA, W. J.; DE SOUZA, A. A.; DE SOUZA, A. P.; TERENCEZ, M. F.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; TSUHAKO, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A. L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, p.151-159, 2000.
- SILVEIRA, V. D. As galhas ou tumores das raízes. **Agronomia**, v. 2, p. 5-23, 1943.
- SILVEIRA, V. D. Doenças bacterianas. **Agronomia**, v. 8, p. 207-247, 1949.
- SIQUEIRA, C. B.; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; CORDEIRO, C. M. T. **Índice de doenças de hortaliças no Brasil**: bactérias e fungos. Brasília: Embrapa CNPH, 1985. v. 2, 89 p.
- SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. (Ed.). Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, p. 225-420, 1980.
- STOVER, R. H. **Banana, plantain and abaca diseases**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1972. 316 p.
- TAKATSU, A. Taxonomia de corinebactérias fitopatogênicas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 3, p. 85-110, 1995.

- TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H; AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ed. Agrocere LTDA, 2005. v. 2, p.185-196.
- VITIELLO, N.; RAMIRES, C. A. **Júlio Rodrigues Neto**. 2010. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/grandesnomes/julio.php>>. Acesso em: 20 de abr. 2016.
- YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification of plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agriculture Research**, v. 21, p.153-177, 1978.

Genética da Interação Bactéria-Planta

Marco Aurélio Siqueira da Gama

Willams José de Oliveira

Marcos Henrique José de Lima Carvalho

Alessandro Nicoli

1. Introdução

As bactérias são micro-organismos unicelulares e muitas espécies constituem importantes fitopatógenos de plantas cultivadas. Esses micro-organismos apresentam seu ciclo de vida em relação ao hospedeiro e vários destes eventos estão relacionados com processos infecciosos, como a aderência, penetração, colonização e reprodução. Sendo assim, é de extrema importância conhecer as etapas do ciclo de vida das bactérias, para que essas informações sejam aplicadas em diferentes áreas da fitobacteriologia, como o controle das fitobacterioses.

As bactérias utilizam proteínase outras substâncias para converter os metabólitos das células do hospedeiro para sua nutrição e causar doença, além de suprimir as respostas de defesa das plantas hospedeiras. Para secreção desses fatores de virulência, existe atualmente uma ampla gama de vias de secreção classificadas como sistemas de secreção tipo I, II, III, IV, V, VI e VII.

A patogênese das bactérias pode ser expressa através dos vários estágios da infecção, a saber: reconhecimento, penetração, multiplicação, produção de fatores de virulência e desenvolvimento dos sintomas. Esses estágios ocorrem em continuidade e são difíceis de reconhecer como fenômenos independentes. Por sua vez, no decorrer desses diferentes estágios, as plantas utilizam mecanismos pelos quais tentam eliminar as bactérias ou os processos decorrentes da patogênese. Adicionalmente, antes da infecção propriamente dita ocorrer, os

mecanismos de ataque do patógeno e de defesa da planta podem atuar e se manifestar. Por traz destes mecanismos, estão complexas interações genéticas que governam a compatibilidade ou incompatibilidade entre estes organismos.

Nesse contexto da genética da interação, as bactérias apresentam os padrões moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular pattern - PAMPs), além de efetores (proteínas Avr) responsáveis pelo processo de patogenicidade e que atuam impedindo a resposta de defesa da planta. No entanto, as plantas podem apresentar duas linhas de defesa para reconhecimento do patógeno e formação de diferentes respostas de resistência. Essas duas linhas são conhecidas como imunidade desencadeada por PAMPs (pamp-triggered immunity – PTI) e imunidade desencadeada por efector (effector-triggered immunity - ETI). Assim, as alterações genéticas que ocorrem na população do patógeno são acompanhadas pelas alterações que também ocorrem na população do hospedeiro e vice-versa, sendo esse processo conhecido como co-evolução. Nesse sentido, a variabilidade genética representa uma importância fundamental para ocorrência desse evento na natureza.

2. Aderência, reconhecimento e quimiotaxia

As bactérias quando associadas às folhas das plantas, desenvolvem estratégias de colonização como a modificação no *habitat* foliar e agregação, e essas estratégias são muitas vezes dependentes da densidade bacteriana presente na superfície, mediada pelo processo de *quorum-sensing*. As bactérias não colonizam de maneira uniforme o limbo foliar, elas concentram-se em algumas regiões. Estudos utilizando microscopia eletrônica de varredura demonstraram que os locais mais comuns são a base dos tricomas, os estômatos, nas junções da parede celular da epiderme, em depressões na cutícula, próximos a hidatódios, sendo possível observar que existe uma maior densidade populacional na porção abaxial das folhas, devido a uma maior quantidade de estômatos ou tricomas nessa região (Biattie & Lindow, 1999).

A maioria das bactérias não requer mecanismos de adesão, exceto quando este é utilizado no interior dos vasos condutores da planta (Cao et al., 2001). No entanto, *Rhizobium radiobacter*, agente causal da galha da coroa em diversas culturas, requer necessariamente uma ligação com a planta para que aconteça o transporte de T-DNA e possa haver o desencadeamento do processo infeccioso (Rodríguez-Navarro et al., 2007). Outras bactérias também possuem genes que codificam proteínas que participam da adesão, tais como *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp. (Prasannath, 2013).

A penetração das bactérias ocorre por meio de ferimentos, insetos vetores ou por aberturas naturais, como: hidatódios, estômatos, lenticelas, estigma e nectários (Melotto & Kunkel, 2013). No caso de interações compatíveis, ou seja, interação onde ocorrerá a doença, a aderência das células bacterianas em ferimentos é derivada de interações entre a célula bacteriana e moléculas do hospedeiro. Como exemplo, tem-se o caso da interação entre *Xanthomonas citri* e aglutininas localizadas em ferimentos localizados nas folhas de cultivares suscetíveis de citros (Janse, 2005).

Muitas bactérias podem reconhecer a presença de seu hospedeiro por meio da percepção de sinais químicos gerados pelas plantas. Os sinais percebidos pelas células bacterianas são transmitidos através da membrana bacteriana para iniciar eventos de motilidade onde o patógeno segue um sinal bioquímico até alcançar a porta de entrada da planta hospedeira. Neste caso, as células bacterianas se movem por meio de flagelos ou pili (Kado, 2010).

Várias substâncias químicas, tais como produtos da rota dos fenil propanóides-flavonóides, servem como sinais específicos que são reconhecidos pelos patógenos. No caso de *R. radiobacter*, as moléculas reconhecidas são metoxifenóis (ácidos cinâmico e sinapínico, acetoseringona, álcool coniferil, entre outros), os quais são derivados da rota biossintética da lignina produzida pela planta. Nesta bactéria, uma histidina quinase presente na membrana bacteriana (VirA) auxilia na percepção de metoxifenóis e inicia os eventos da infecção. Adicionalmente, membros da família histidina quinase também estão presentes em *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas campestris*. Dessa forma, a presença da histidina quinase oferece uma grande flexibilidade metabólica e permite que o organismo se associe com sua planta hospedeira (Kado, 2010).

As bactérias não reconhecem apenas o sinal químico gerado pelas plantas, conforme mencionado anteriormente, mas também reconhecem sinais químicos gerados por elas mesmas. A habilidade para se comunicar e coordenar o comportamento via moléculas sinalizadoras, uma característica dependente do tamanho da população celular, é um mecanismo amplamente distribuído entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, conhecido com *quorum-sensing* (Miller & Bassler, 2001). Neste mecanismo, por um processo de autoindução, quando as bactérias se multiplicam ocorre à regulação da expressão gênica em função da percepção de uma molécula sinalizadora difusível produzida pela própria célula bacteriana. Dessa forma, cada célula bacteriana produz uma pequena quantidade de uma molécula sinalizadora do *quorum-sensing*, a qual se torna perceptível quando a concentração da molécula se eleva devido ao aumento de células bacterianas. Em Gram-negativas, a principal molécula sinalizadora é a

N-acil-homoserina-lactona (AHLs), enquanto as Gram-positivas utilizam oligopeptídeos processados como autoindutores (Miller & Bassler, 2001). Além disso, mais de um sistema de *quorum-sensing* pode estar presente em uma determinada espécie.

Em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o *quorum-sensing* regula funções como: simbiose, virulência, competência, conjugação, produção de antibióticos, motilidade, esporulação, formação de biofilme e divisão/multiplicação de células bacterianas (Kado, 2010; Miller & Bassler, 2001). Em bactérias Gram-negativas, as moléculas autoindutoras mais bem estudadas são as derivadas AHLs. Os sistemas de *quorum-sensing* são sintonizados para preferencialmente sintetizar e responder a AHLs específicos. Dois genes, *I* (responsável pela síntese do autoindutor) e *R* (responsável pela detecção do autoindutor), codificam uma AHL sintase para produção da AHL e do regulador da transcrição sensível à AHL. Como exemplo, tem-se TraI e TraR em *R. radiobacter*. Como exemplo de bactérias que regulam a expressão de características envolvidas na patogênese por meio de *quorum-sensing* tem-se: *Pectobacterium carotovorum*, agente causal de podridão em diversas hortaliças; *Pantoea stewartii*, agente causal de murcha no milho; *R. solanacearum*, agente causal de murcha bacteriana em diversas espécies botânicas e *X.campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra em brássicas (Cha et al., 1998).

3. Interações incompatíveis e compatíveis

É bem documentado que em interações incompatíveis, as células bacterianas aderem à superfície da parede celular da planta e rapidamente induzem danos estruturais na membrana citoplasmática, resultando na liberação de eletrólitos e consequente morte da célula do hospedeiro. Este fenômeno é conhecido como reação de hipersensibilidade (hypersensitive reaction – HR), que em bactérias é regulado pelos genes *hrp*– *hypersensitive response and pathogenicity* (Lam et al., 2001; He, 2007). Nesse processo, compostos fenólicos tóxicos também são liberados levando a morte das células bacterianas localizadas nos espaços intercelulares. Por outro lado, quando os tecidos das plantas são infectados por bactérias compatíveis, ocorre à degeneração parcial da membrana celular, o efluxo de K^+ e influxo de H^+ . Os íons de potássio liberados nos espaços intercelulares aumentam o pH do fluido intercelular de 5,5 para 7,0-7,5 e essa mudança induz o efluxo de sacarose, aminoácidos e íons inorgânicos sem causar danos estruturais a membrana celular (Janse, 2005).

A capacidade de invadir e colonizar o tecido vegetal (patogenicidade) e de induzir a reação de hipersensibilidade são, em grande parte, atribuídas a dois conjuntos de genes: um conjunto de genes de 22-25 kb (em 6-8 unidades transcricionais), nomeado *hrp* (de HR e patogenicidade) e genes de avirulência (genes *Avr*) (Lindgren, 1997).

Quando os genes *hrp* são bem conservados eles são chamados de genes *hrc*. Os genes *hrp* podem estar tanto em plasmídeos quanto em ilhas de patogenicidade no cromossomo e estão envolvidos no envio de sinais para planta, na recepção de sinais da planta e na regulação dos genes *hrp*, *avre* outros genes de patogenicidade. Os genes *hrp* codificam proteínas extracelulares, a exemplo de proteínas indutoras de necroses (harpinas) que são secretadas pelo T3SS e proteínas de avirulência (*Avr*). Portanto, os genes *hrp* representam uma função direta no reconhecimento entre a bactéria e o hospedeiro e parecem ser essenciais para patogenicidade (Lindgren, 1997; Prasannath, 2013).

Em interações incompatíveis, a planta reconhece as proteínas *Avr* secretadas pela bactéria e induz uma HR seguindo-se uma interação gene a gene, a qual leva à resistência na planta. É importante mencionar que alguns genes *Avr* estão frequentemente localizados próximos aos genes *hrp*. Portanto, os genes *hrp* e *Avr* dependentes de *hrp* também contribuem para especificidade do patógeno e limitam a gama de hospedeiros. Adicionalmente, proteínas secretadas que levam ao desenvolvimento de sintomas na planta são denominadas proteínas de virulência (codificadas por genes *vir*) (Janse, 2005).

No caso de interações compatíveis, com o crescimento bacteriano nos espaços intercelulares, diversos fatores de patogenicidade e virulência são produzidos, a saber: enzimas, fitotoxinas, fitormônios, proteínas extracelulares, estruturas de aderência, sistemas de absorção de nutrientes, polissacarídeos e exopolissacarídeos, os quais podem representar importantes funções na supressão das respostas de defesa do hospedeiro, prevenindo o reconhecimento do patógeno, facilitando a extração de nutrientes e promovendo a reprodução e propagação da bactéria (Agrios, 2005).

Os termos patogenicidade e virulência, aqui utilizados, devem ser entendidos da seguinte forma: patogenicidade – capacidade da bactéria causar a doença (a bactéria é ou não capaz de causar a doença), com os fatores de patogenicidade sendo considerados como as características que conferem a capacidade de causar a doença; virulência – reflete o nível da doença, sendo frequentemente relacionado com a severidade dos sintomas, dessa forma, os fatores de virulência são aqueles que alteram a quantidade de doença causada pelo patógeno.

Conforme já mencionado, as bactérias podem detectar a presença do seu hospedeiro devido à presença de moléculas especificamente produzidas por este. Vários compostos metoxifenólicos ou β -glicosídeos fenólicos em combinação com mono ou dissacarídeos induzem a expressão de genes de virulência e produtores de fitotoxinas em espécies de *Rhizobium* e em patovares de *P.syringae*, respectivamente. Em *R.radiobacter*, um sistema regulatório de dois componentes composto pela proteína sensorial acoplada a membrana VirA (uma histidina quinase) e VirG (um ativador transcricional) iniciam a expressão de genes de virulência no plasmídeo Ti (Cascales & Christie, 2004). Por sua vez, em *P. syringae* pv. *syringae* a produção da siringomicina é induzida por glicosídeos flavonóides, os quais estão presentes nos tecidos de cerejeiras e são percebidos pelos produtos dos genes *syrB1* e *sypA* (Scholz-Schroeder et al., 2000).

A expressão de proteínas de patogenicidade e virulência dependem da transcrição fiel dos genes que as codificam. A transcrição em bactérias é catalisada por multissubunidades de RNA polimerase, a qual é composta por uma enzima core e um fator sigma. Os fatores sigmas são requeridos para iniciação fiel da transcrição e são membros de uma família de subunidades dissociáveis que se ligam as subunidades core para formar uma holoenzima RNA polimerase de iniciação específica. Portanto, cada holoenzima reconhece especificamente os promotores determinados pelo fator sigma. Em espécies de *Erwinia*, *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Pantoea* e *Pseudomonas*, um fator sigma designado HrpL (ou sigma L) é complexado com sua enzima core RNA polimerase para reconhecer promotores específicos e iniciar a expressão dos genes *hrp*, de genes de patogenicidade e genes que codificam para síntese do T3SS (Kado, 2010).

4. Sistemas de secreção em bactérias

As bactérias, sejam elas patogênicas a animais ou a plantas, desenvolvem constantemente estratégias bastante elaboradas para conseguirem infectar o seu hospedeiro. Em muitos casos, o sucesso da colonização bacteriana pode ser dependente de proteínas extracelulares, tornando o estudo dos sistemas de secreção bastante importante. A secreção pode ser definida como o transporte ativo de proteínas através da membrana citoplasmática da bactéria (Lucas et al., 2010).

Para o estabelecimento eficiente de infecções por bactérias, vários sistemas de influxo e efluxo, bem como vias de translocação de proteínas/enzimas são

utilizados. Os sistemas de influxo são utilizados para absorção de componentes essenciais necessários a sobrevivência, os quais são normalmente gerados por meio de quebras enzimáticas de substratos complexos em pequenos compostos acessíveis pelo sistema de influxo. Os sistemas de efluxo são utilizados para esvaziar a célula bacteriana dos compostos tóxicos e antimetabólicos, incluindo diferenças no pH e compostos de defesa do hospedeiro, tais como peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, fitoalexinas e compostos fenólicos (Kado, 2010).

Todas as bactérias fitopatogênicas utilizam proteínas secretadas para converter os metabólitos da célula do hospedeiro para sua nutrição e causar doença. Para secreção de fatores de virulência, existe uma ampla gama de vias de secreção atualmente classificadas como sistemas de secreção tipo I, II, III, IV, V, VI e VII (Abdallah et al., 2007; Thanassi & Hultgren, 2000). O sistema de secreção tipo I (Type I secretion system - T1SS) permite a translocação de proteínas de vários tamanhos e funções do ambiente extracelular através das membranas interna e externa sem a interação do periplasma (Figura 1A). Peptídeos, produtos metabólicos, lipídeos, esteróis, enzimas, toxinas e drogas são secretados por este sistema (Kado, 2010). O T1SS é formado por três proteínas localizadas no envelope celular, cada uma delas com uma função no mecanismo de secreção (Wandersman, 1996). Pode-se citar como exemplos de bactérias que possuem o T1SS, *R. radiobacter*, *Burkholderia cepacia*, *Dickeya chrysanthemi*, *Leifsonia xyli*, *P. carotovorum*, *P. syringae* seus patovares, *R. solanacearum*, *X. axonopodis* e seus patovares, *X. campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae* e *Xylella fastidiosa* (Kado, 2010).

O sistema de secreção tipo II (Type II secretion system - T2SS) (Figura 1B), presente em muitas bactérias Gram-negativas, é caracterizado como um sistema cuja translocação de proteínas é realizada em dois passos: o primeiro passo envolve o processamento da proteína pela membrana interna e o segundo passo envolve a modificação da proteína no periplasma para posterior saída pela membrana externa (Kado, 2010). O T2SS é um sofisticado maquinário multiproteico, onde 12 a 15 genes são essenciais para o funcionamento desse sistema de secreção (Kado, 2010). Quatro subunidades são distinguíveis neste sistema de secreção: pseudopilus, complexo da membrana externa, plataforma da membrana interna e ATPase. Diversos fatores de virulência tais como toxinas e enzimas pectinolíticas, celulases e proteases são secretadas pelo T2SS. Diversas enzimas pectinolíticas são secretadas por *Pectobacterium* e *Dickeya* por meio do T2SS, que também está presente em *X. campestris*. Adicionalmente, mais de um T2SS pode estar presente na mesma bactéria (Kado, 2010; Korotkov et al., 2013).

Várias bactérias utilizam sistemas de secreção tipo III (Type III secretion system - T3SS) para injetar proteínas no citoplasma da célula do hospedeiro, podendo manipular as funções celulares e com isso causar a doença (Coburn et al., 2007) (Figura 1C). Mais de um T3SS pode estar presente na mesma bactéria. O T3SS é composto por aproximadamente 20 proteínas estruturais. Os componentes estruturais consistem em dois anéis que fornecem um caminho contínuo através da membrana interna e externa. O anel da membrana interna é o maior deles e a sua composição têm sido descrita para algumas bactérias. O T3SS é codificado pelos genes *hrp/hrc*, os quais formam um poro e um pilus complexo para secreção de proteínas dentro do citoplasma da célula hospedeira. O T3SS é codificado por mais de 40 genes, o que torna sua regulação temporal e espacial muito complexa. A síntese, montagem e regulação desse sistema de secreção é induzida por mudanças no pH, temperatura, presença de flavonóides e altas e baixas concentrações de magnésio e cálcio nos espaços intercelulares (Kado, 2010).

Em *X. vesicatoria* e em provavelmente outras espécies de *Xanthomonas*, o locus *hrpE* codifica para produção da proteína Hrp pili, o qual é requerida para secreção de proteínas por este sistema de secreção. Hrp pili serve como um condutor de proteínas e se estende por vários micrômetros da superfície bacteriana. As proteínas secretadas são injetadas diretamente dentro da célula do hospedeiro, manipulando a célula e promovendo a infecção. Adicionalmente, a translocação de proteínas bacterianas é auxiliada por harpinas agindo na membrana celular da planta (Kado, 2010). No gênero *Xanthomonas* spp. o T3SS é responsável pela injeção de efetores TAL (transcription activator like effectors) na célula hospedeira (Bogdanove et al., 2010), os quais são importantes fatores de virulência para este gênero bacteriano (Doyle et al., 2013).

Embora a função precisa da maioria das proteínas efetoras seja desconhecida, a quantidade de proteínas secretadas é impressionante. Vários efetores suprimem a resistência basal ou imunidade das plantas, porém ainda não está estabelecido como este mecanismo ocorre. Contudo, acredita-se que esses efetores contribuem para virulência por interferir na transdução de sinais de defesa da planta. Como exemplo, tem-se as proteínas AvrBs2, AvrBs3 e AvrBs4 de *X. vesicatoria*, as quais são secretadas pelo T3SS. AvrBs3 se localiza no núcleo da planta enquanto AvrBs4 imita a atividade de protease de Ulp1 de células eucarióticas (atividade de cisteína protease). Além disso, as proteínas efetoras atuam na liberação de nutrientes do tecido hospedeiro e na transmissão bacteriana (Kado, 2010).

O sistema de secreção tipo IV (Type IV secretion system - T4SS) (Figura 1D) é um dos mais bem conservados e peculiares dentre os sistemas de secreção, podendo ser encontrado em bactérias Gram-positivas e negativas, sendo em Gram-positivas relacionadas à transferência lateral (horizontal) de genes (Goessweiner-Mohr et al., 2013). O T4SS de *R. radiobacter* é o mais bem estudado. Este sistema possibilita o transporte de proteínas, nucleoproteínas e substratos de ácidos nucleicos, os quais são injetados nas células eucarióticas. Outro benefício deste sistema está relacionado com a possibilidade de absorção e inserção de parte de DNA nas células hospedeiras. Os genes que codificam para o T4SS podem ser abrigados tanto no plasmídeo quanto no cromossomo e uma bactéria pode conter mais de um tipo de T4SS. O T4SS também é utilizado por bactérias para conjugação e consequente transferência de plasmídeo. Basicamente, o T4SS é utilizado tanto para transferência de proteínas efetoras para célula do hospedeiro quanto para absorver proteínas e DNA para adaptação ambiental. De maneira semelhante ao T3SS, o T4SS produz um pilus “T”, que serve de condutor para transferência de proteínas e absorção de substratos (Kado, 2010). Adicionalmente, o T4SS também foi detectado em *Bordetella pertusis*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila* e *X. citri* subsp. *citri* (Sá, 2011).

O sistema de secreção tipo V (Type V secretion system - T5SS) é composto de proteínas que são classificadas como auto transportadoras, ocorrendo o translocação de proteínas do periplasma até o meio sem necessidade de proteínas acessórias neste processo (Figura 1E). Entre as bactérias fitopatogênicas, *R. solanacearum*, *X. campestris* e *X. fastidiosa* abrigam o T5SS (Henderson et al., 2004).

Quanto ao sistema de secreção tipo VI (Type VI secretion system - T6SS), *R. radiobacter* utiliza este sistema para secretar a proteína Hcp (proteína hemolisina-regulada) que é requerida para aumentar a eficiência da produção de tumores (Figura 1F). Assim como o T4SS, o T6SS também permite a transferência de proteínas entre células procarióticas e eucarióticas (Kado, 2010).

O sistema de secreção tipo VII (Type VII secretion system - T7SS) foi evidenciado pela primeira vez por Abdallah et al. (2007), sendo um importante sistema de secreção para o transporte proteínas extracelulares, sendo descoberto em *Mycobacteria*, uma bactéria Gram-positiva, até então único organismo onde este sistema foi descrito (Costa et al., 2015). No entanto, existem apenas modelos hipotéticos de sua conformação como o proposto por Houben et al. (2014).

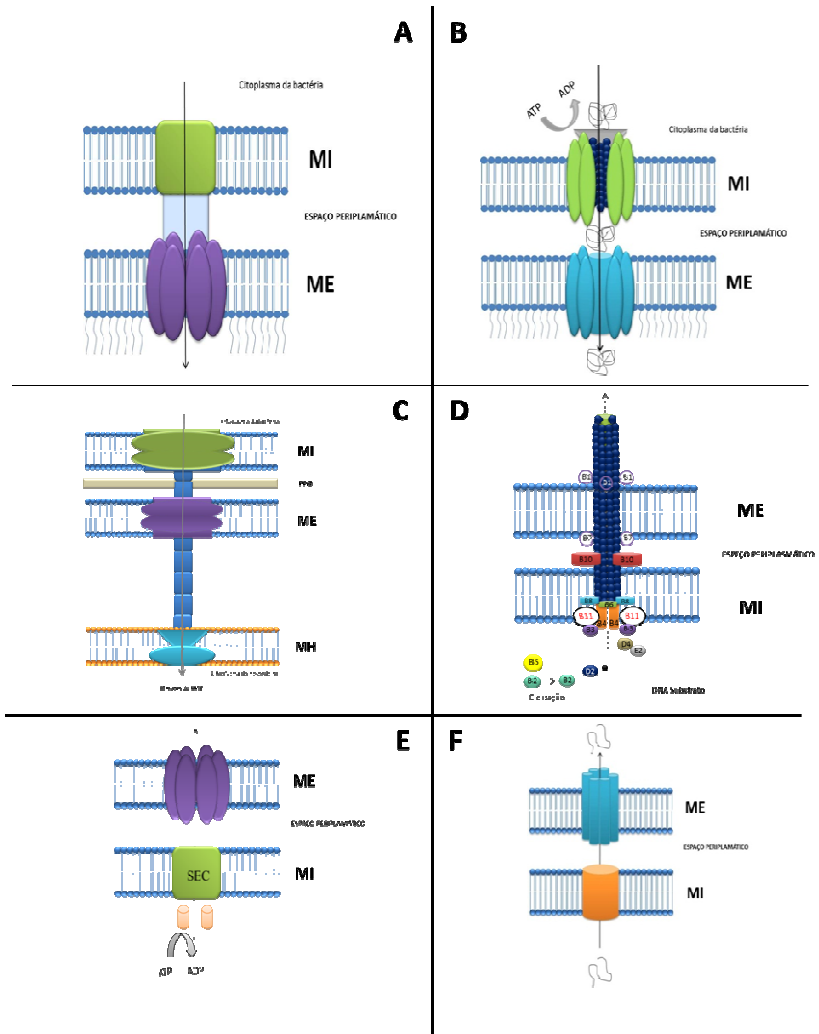


Figura 1. Sistemas de secreção tipo 1 a 6 (A – F). MI = membrana interna. ME = membrana externa; MI = membrana interna. P = periplasma; PPG = peptídeoglicano; MH = Membrana do hospedeiro (Adaptado de Kado, 2010).

Exemplos de espécies bacterianas e sistemas de secreção utilizados, além do tipo de sintoma causado nas plantas hospedeiras, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de espécies de bactérias, sistema de secreção e os sintomas causados em plantas hospedeiras.

Sistema de secreção	Espécies	Sintoma em hospedeiro
T1SS	<i>Rhizobium radiobacter</i> ; <i>Burckolderia cepacia</i> ; <i>Dickeya chrysanthemi</i> ; <i>Leifsonia xyli</i> ; <i>Pectobacterium carotovorum</i> ; <i>Pseudomonas syringae</i> ; <i>Ralstonia solanacearum</i> ; <i>Xanthomonas axonopodis</i> ; <i>Xanthomonas campestris</i> ; <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> e <i>Xylella fastidiosa</i>	Galhas, podridões, subdesenvolvimento, mancha e murcha
T2SS	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Dickeya chrysanthemi</i> e <i>Xanthomonas campestris</i>	Podridão mole e mancha
T3SS	Espécies de <i>Xanthomonas</i> e <i>Pseudomonas syringae</i>	Mancha
T4SS	<i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Tumores (galhas) e manchas
T5SS	<i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> e <i>Xylella fastidiosa</i>	Manchas e murchas
T6SS	<i>Rhizobium radiobacter</i>	Tumores (galhas)
T7SS	<i>Mycobacteria</i>	Não fitopatogênica

5. Colonização da planta hospedeira

No sítio de infecção, as células bacterianas inicialmente aderem ao substrato da planta como uma monocamada, formando em seguida microcolônias, geralmente nos espaços intercelulares. Posteriormente, são formadas macrocolônias (maturação do biofilme) (Kado, 2010). A aderência a superfície do hospedeiro por *R. radiobacter* aparentemente envolve a síntese de fibrilas de celulose e β -glucanas codificadas por *cel* e *chvA* e *chvB*, respectivamente (Breedveld& Miller, 1994; Matthysse, 1983). A taxa de maturação e formação do biofilme nesta bactéria é regulada por SinR, um regulador transcricional global de genes expressos na presença de oxigênio (Ramey et al., 2004). No caso da colonização de feixes vasculares, as células bacterianas são propagadas passivamente por meio de difusão nos vasos do xilema, uma vez que neste ambiente as células bacterianas são imóveis e não apresentam quimiotactismo (Kamoun & Kado, 1990).

Nos espaços intercelulares, o T3SS mostra-se essencial para patogênese de bactérias hemibiotróficas (*P. syringae*), porém é dispensável em patógenos necrotróficos (*D. chrysanthemi* e *Pectobacterium* spp.), embora contribua para infectividade e virulência em baixo nível de inóculo. Quando os genes do T3SS são expressos, um pilus tipo seringa é montado, o qual atravessa a parede celular da planta e injeta proteínas efetoras no citoplasma. O T3SS interage com vários alvos intracelulares, levando ao parasitismo e, conseqüentemente, a doença em cultivares suscetíveis, ou a HR em plantas resistentes. A função primária das proteínas efetoras é suprimir a resposta de defesa do hospedeiro, no entanto, a secreção coordenada de efetores e toxinas também podem ajudar a bactéria a obter nutrientes da célula, embora a natureza das proteínas efetoras e alvos celulares responsáveis por mudar a disponibilidade de nutrientes não esteja clara (Jackson, 2009).

Os genes induzidos nos espaços intercelulares das plantas podem ser divididos em quatro categorias: genes de virulência e patogenicidade, tais como T3SS, coronatina, alginato e peptídeos similares a siringomicina; genes de assimilação de nutrientes; genes de tolerância ao estresse, tais como catalase, utilizados para detoxificar espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species – ROS) e, genes de biossíntese. O estudo dos genes induzidos nos espaços intercelulares demonstra que a regulação diferencial da expressão gênica é uma característica importante da adaptação bacteriana neste ambiente. No entanto, relativamente pouco é conhecido sobre os fatores ambientais e moleculares que suportam a mudança da expressão gênica. A maioria dos estudos dos mecanismos moleculares sobre a expressão de genes induzidos nos espaços intercelulares tem focado os fatores ambientais e regulatórios que promovem a expressão de genes de patogenicidade e virulência, tais como genes do T3SS, toxinas, EPS e exoenzimas (Jackson, 2009).

A regulação ambiental do T3SS tem sido estudada em detalhes, embora algumas questões sobre como a percepção de sinais ocorre ainda não foram bem explicadas. Os fatores que contribuem para expressão deste sistema são baixo pH (aproximadamente 5,5), baixa osmolaridade e predominância de açúcares tais como sacarose, frutose e manitol e aminoácidos. Em *R. solanacearum*, um composto não difusível da parede celular de plantas de tomateiro é responsável pela indução do T3SS. Adicionalmente, outros fatores que interferem na expressão do T3SS também podem ser relacionados às respostas do hospedeiro a infecção (Jackson, 2009; Kado, 2010).

A produção de fitotoxinas também é ambientalmente regulada. Como exemplo, a coronatina pode ser afetada pelo pH, temperatura, osmolaridade,

fontes de carbono, níveis de nutrientes, aminoácidos e pela presença de fontes de carbono e nitrogênio complexas. No entanto, o efeito dos fatores ambientais sobre a produção de fitotoxinas pode variar significativamente entre isolados. De forma similar, a produção de siringomicina também é induzida por metabólitos da planta, tais como glicosídeos fenólicos e açúcares. A siringomicina é uma fitotoxina formadora de poros que induz o fluxo de íons na membrana celular, levando a alcalinização dos espaços intercelulares e aumentando a permeabilidade da membrana a açúcares e outros compostos orgânicos que favorecem o crescimento bacteriano. A faseolotoxina inibe a enzima ornitina carbomil transferase (ORT), a qual converte ornitina a citrulina na rota da biossíntese da arginina. O acúmulo de ornitina causa um requerimento fenotípico da arginina, o qual leva a clorose. A faseolotoxina não é essencial para multiplicação bacteriana durante a infecção. Portanto, é provável que a faseolotoxina, assim como outras fitotoxinas, contribuam para virulência por causar mudanças locais e sistêmicas no metabolismo da planta (Jackson, 2009).

O tempo e o contexto no qual as enzimas degradantes da parede celular são expressas são essenciais para patogênese bem sucedida de patógenos como *Pectobacterium* spp. e *D. chrysanthemi*, quando a expressão prematura de enzimas pectinolíticas podem elicitar as respostas de defesa do hospedeiro antes que o número de células bacterianas sejam altas o suficiente para superá-las. A estabilidade das moléculas de *quorum-sensing* pode ser significativamente alterada pelo pH (instabilidade das moléculas em pH alcalino), pela natureza química do ambiente e pela hidrofobicidade do ambiente. Neste último caso, a difusão da AHL pode ser afetada e polissacarídeos derivados das plantas podem atuar sequestrando a AHL. O *quorum-sensing* forma parte do sinal da rede de transduções que integra diversas informações sobre o ambiente e a fisiologia bacteriana, agindo de maneira coordenada para regular o tempo e a expressão das enzimas pectinolíticas (Janse, 2005).

Os mecanismos de *quorum-sensing* também regulam fatores de patogenicidade e virulência em outros patógenos, tais como *R. solanacearum* (Morris & Monier, 2003). Esta bactéria penetra por aberturas decorrentes do crescimento radicular bem como por ferimentos e passa a crescer nos espaços intercelulares. Quando a densidade celular ideal é alcançada, a produção de EPS e exoenzimas reguladas pelo sistema de *quorum-sensing* facilita a entrada nos vasos do xilema (Kado, 2010).

A maioria dos patógenos usa dois ou três fatores de patogenicidade ou virulência para causar infecção, com cada fator atuando para criar as condições ambientais que permitam que o próximo fator seja expresso. Neste contexto, o

T3SS de patógenos necrotróficos suprime as respostas de defesa do hospedeiro permitindo que a bactéria se estabeleça na planta e, finalmente, utilize os T1SS e T2SS para secretar as enzimas que degradam a parede celular, as quais matam a célula da planta. De maneira similar, *X. citri* utiliza o T3SS para injetar a proteína PthA nas células da planta, a qual induz o encharcamento e a hiperplasia nas células do hospedeiro. O inchaço das células absorve mais água dos vasos do xilema por meio da ação da capilaridade, o que provoca mais rompimentos celulares, que por sua vez oferece nutrientes adicionais para o crescimento e auxilia na dispersão quando a bactéria é exposta em função da ruptura da epiderme. Finalmente, o crescimento bacteriano pode ativar os mecanismos regulados pelo *quorum-sensing*, tais como a goma xantana (Jackson, 2009; Kado, 2010).

6. Coevolução e modelos de reconhecimento das bactérias

As plantas cultivadas na natureza estão constantemente expostas à presença de patógenos e as interações entre esses organismos estão relacionadas com os mecanismos de defesa e de ataque, os quais são controlados geneticamente (Agrios, 2005). Nesse contexto, as bactérias são equipadas com um arsenal de substâncias utilizadas como estratégias para infectar e suprimir a defesa do hospedeiro. Assim como outros patógenos, as bactérias também apresentam moléculas específicas, conhecidas como PAMPs, além de efetores (proteínas Avr) responsáveis pelo processo de patogenicidade e que atuam impedindo a resposta de defesa da planta e também convertem os metabólitos da célula do hospedeiro para nutrição da bactéria. No entanto, as plantas podem apresentar duas linhas de defesa para reconhecimento do patógeno e desencadeamento de cascatas de sinais para formação de diferentes respostas de resistência: PTI e ETI (Dangl et al., 2013; Hurley et al., 2014). Esse reconhecimento induz diferentes respostas de defesa, tais como a produção de fitoalexinas, compostos fenólicos, explosão oxidativa, geração de óxidos nítricos, aumento do pH extracelular, reforço da parede celular, acúmulo de proteínas PR, entre outros.

Os diferentes PAMPs geralmente apresentam funções estruturais para sobrevivência da bactéria, e vários destes elicitores bacterianos já são conhecidos, tais como lipopolissacarídeos (LPS), peptídeoglicano (PGN), flagelina, fator de alongação Tu (EF-Tu), proteínas de choque frio (PCF) e a enzima superóxido dismutase. Para reconhecimento desses PAMPs, a primeira linha de defesa da planta utiliza-se de proteínas receptoras também conhecidas como receptores de reconhecimento padrão (pattern recognition receptor - PRR),

levando ao desenvolvimento da PTI. Como exemplos, o PRR conhecido como EFR (LRR-quinase) reconhece EF-Tu, o FLS2 (flagelina sensível 2) reconhece a flagelina, e o complexo LYM1/LYM3/CERK1 reconhecem os peptídeoglicanos (Hurley et al., 2014).

O reconhecimento de PAMPs ocorre na superfície da célula e os PRR conhecidos são receptores tipoquinas ancorados a membrana. O reconhecimento de PAMPs ativa uma cascata de sinais para ativar as respostas de defesa na planta. Os eventos de sinalização agindo após o reconhecimento dos PAMPs induzem mudanças no nível de cálcio no citoplasma, produção de ROS e de óxido nítrico bem como ativam proteínas quinases ativadas por mitógenos (PQAM), as quais levam a indução de genes através dos fatores de transcrição WRKY (Faulkner & Robatzek, 2012; Hurley et al., 2014).

Os primeiros estudos de reconhecimento de PAMPs em plantas foram realizados com a flagelina, a principal proteína encontrada nos flagelos. Estudos com *Arabidopsis* e tomate revelaram que as plantas respondem a um domínio altamente conservado na porção N-terminal da flagelina bacteriana, um peptídeo de 22 aminoácidos denominado flg22. Na planta, flg22 é percebido por FLS2, que pertence à família de receptores tipoquinas e tem um domínio extracelular com 28 repetições ricas em leucina (LRR), um domínio transmembrana e um domínio quinaseserina/treonina intracelular. Tanto o domínio LRR quanto a atividade de quinase de FLS2 foram necessários para alta afinidade e especificidade da ligação pela flagelina (Faulkner & Robatzek, 2012).

A molécula de LPS é formada por um lipídio A, o core R (cadeia curta de oligossacarídeos) e uma cadeia lateral O (cadeia polissacarídica longa). Dependendo da interação, todas essas três estruturas podem atuar como PAMPs. Estudos realizados com o LPS de *X. campestris* pv. *campestris* marcado com fluorosceína em culturas com *Nicotiana tabacum* revelaram que o LPS foi rapidamente ligado a parede celular da planta, sendo transpostado para o interior dos vacúolos. Estes resultados sugerem que houve endocitose do LPS de *X. campestris* pv. *campestris* de forma similar ao sistema de mamíferos (Jackson, 2009).

O fator de elongação EF-Tu é a proteína em maior abundância na célula bacteriana e está associada à fase de elongação dos ribossomos. EF-Tu não é livremente exposto na superfície da parede celular, portanto, como e porque EF-Tu é liberado da bactéria ainda não é conhecido. Acredita-se que este PAMP pode ser liberado pelo sistema de exportação da célula bacteriana durante o processo de infecção ou pela ruptura das células bacterianas causadas por enzimas líticas do hospedeiro. A atividade elicitora é atribuída ao N-terminal de

EF-Tu, um peptídeo de 26 aminoácido denominado efl26. É importante mencionar que efl26 e flg22 se ligam a diferentes receptores de alta afinidade. No entanto, tanto efl26 quanto flg22 induzem o mesmo conjunto de genes no hospedeiro e também a mesma resposta. O receptor de EF-Tu no hospedeiro é o PRR conhecido como EFR, o qual também pertence à família de receptores tipo quinases (Faulkner & Robatzek, 2012; Hurley et al., 2014).

As PCFs, as quais são induzidas pela queda da temperatura, são produzidas para proporcionar que alguns microrganismos se adaptem a baixas temperaturas. Nesse contexto, um peptídeo de 22 aminoácidos localizado na porção N-terminal da PCF, chamado de cps22, é responsável por incitar a explosão oxidativa bem como por aumentar a biossíntese de etileno indicando um sistema de percepção para PCFs na planta. O receptor para PCF ainda não foi encontrado. No entanto, os elicitores derivados da PCF e da flagelina induzem o mesmo conjunto de respostas. Quanto à superóxido dismutase, acredita-se que quando PRR reconhecem PAMPs ocorre à produção de ROS, o que ativa a transcrição do gene da superóxido dismutase (*sodM*). Por sua vez, o aumento de *sodM* induz as respostas de defesa dos hospedeiro (Jackson, 2009).

Conforme mencionado anteriormente, durante o processo evolutivo da interação entre bactérias e plantas, as primeiras desenvolveram diferentes sistemas de secreção responsáveis pelo processo infeccioso. Como exemplo, tem-se o T3SS, codificado pelos genes *hrp*, e que é utilizado para translocar efetores responsáveis pelo processo de patogenicidade na planta. Com esse processo evolutivo, muitas bactérias adquiriram efetores, os quais interferem na imunidade da planta, suprimindo a primeira linha de defesa (PTI), e resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (effector triggered susceptibility - ETS) (Alfano & Collmer, 2004).

Alguns efetores modificam moléculas alvos no hospedeiro, podendo degradá-las. Os locais de ação dos efetores suprimindo a defesa da planta incluem algumas rotas específicas da transdução de sinais, podendo atuar dentro do núcleo interferindo na transcrição para respostas de defesa e após a transcrição (Alfano & Collmer, 2004). As proteínas efetoras podem apresentar diferentes funções como proteases, fosfatases, ubiquitinaligase, transferases e hidrolases (Rodriguez-Herva et al., 2012).

Nesse contexto evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos para reconhecimento dos efetores, e assim se defenderem do ataque dos fitopatógenos. Esse mecanismo é governado pelos genes *R*, que codificam as proteínas *R*. Após o reconhecimento dos efetores, as diversas respostas de defesa das plantas são ativadas, levando a formação da ETI (Hurley et al., 2014).

Primeiramente, devemos considerar que esse reconhecimento pode ocorrer de forma direta ou indireta. Na forma direta, ocorre a interação entre as proteínas R e as proteínas Avr. Entretanto, tem-se verificado que na maioria dos casos o reconhecimento é realizado de forma indireta, podendo ser por meio do modelo guarda ou decoy (Van der Hoorn & Kamoun, 2008).

O modelo guarda implica que proteínas R conseguem perceber os efetores das bactérias por meio do monitoramento dos alvos dos efetores bacterianos. Quando o efector interage com o alvo “guardado” nas células, causando modificações neste, as proteínas R reconhecem esse efector e ativam assim as respostas de defesa. Na ausência da proteína R, o alvo é indispensável para a função de virulência da proteína efetora e para permitir um maior crescimento da bactéria (Van der Hoorn & Kamoun, 2008). Outro modelo conhecido é o decoy, o qual é especializado no evento de reconhecimento do efector pela proteína R, mas a proteína ‘decoy’ não contribui para a adaptação ou desenvolvimento das bactérias na ausência da proteína R. Assim, esse modelo funciona como uma armadilha para o reconhecimento do efector (Van der Hoorn & Kamoun, 2008). Exemplos de genes *R* e genes *Avr* na interação planta-bactéria estão citados na Tabela 1 (Gururani et al., 2012; Hurley et al., 2014).

Atualmente, diferentes genes *R* são conhecidos como responsáveis pelo reconhecimento dos efetores produzidos pelos patógenos. Esses genes podem ser divididos em oito grupos com base em características da proteína R (organização dos aminoácidos e domínio de membrana) (Gururani et al., 2012). A grande maioria dos genes *R* codificam proteínas contendo o sítio de ligação de nucleotídeo (nuclear binding site - NBS) e as repetições ricas em leucina (leucine-rich Repeat - LRR). Esse domínio LRR representa uma função muito importante para o reconhecimento específico das proteínas do patógeno e a maior variação entre os genes *R* se deve a essa região da proteína. Essas classes de proteínas R têm sido caracterizadas como: NBS-LRR-TIR; NBS-LRR-CC; LRR-TrD; LRR-TrD-Quinase; TrD-CC; TIR-NBS-LRR-NLS-WRKY; LRR-TrD-PEST-ECS; Quinase intracelular, Receptor quinase, HC toxina redutase (TIR: receptor Toll/Interleucina; CC: domínio cauda espiralada-*Coiled-coil*; TrD: domínio transmembrana; NLS: sinal de localização nuclear; WRKY: domínio aminoácido; PEST: domínio aminoácido; ESC: domínio de sinalização da endocitose celular). Existem vários genes *R* conhecidos na interação bactéria-planta, como o gene *RPS4* (NBS-LRR-TIR), *RPS2* (NBS-LRR-CC), *RPM1* (NBS-LRR-CC) e *RRS1R* (TIR-NBS-LRR-NLS-WRKY) em *Arabidopsis*; o gene *Xa21* (LRR-TrD-Quinase) em arroz; e o gene *Pto* (Quinase intracelular) em tomate (Tabela 2) (Gururani et al., 2012).

Tabela 2. Exemplos de espécies de bactérias e relação gene de avirulência (Avr) e gene de resistência (R).

Espécie	Gene Avr (proteína efetora)	Gene R (proteína de resistência)
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>AvrRps4</i>	<i>RPS4</i>
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>AvrRpm1</i> ou <i>AvrB</i>	<i>RPM1</i>
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>AvrRpt2</i>	<i>RPS2</i>
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>AvrPphB</i>	<i>RPS5</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>AvrXa1</i>	<i>Xa1</i>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>AvrXa21</i>	<i>Xa21</i>
<i>Ralstonia solanacearum</i>	-	<i>RRS1R</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>AvrPto</i> ou <i>AvrPtoB</i>	<i>Pto</i>
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	<i>AvrBs3</i>	<i>Bs3</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	<i>AvrD</i>	<i>RPG4</i>
<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>AvrBs2</i>	<i>Bs2</i>

Embora os efetores sejam reconhecidos levando a imunidade da planta, com o processo de evolução, novos efetores adicionais podem surgir, suprimindo a resistência e desencadeando novamente a suscetibilidade da planta à doença. Por meio do processo de seleção, novos genes de resistência surgem e reconhecem os efetores, resultando novamente em imunidade. Assim, as alterações genéticas que ocorrem na população do patógeno são acompanhadas pelas alterações que também ocorrem na população do hospedeiro, sendo esse processo conhecido como coevolução. Nesse contexto, a variabilidade genética representa uma importância fundamental para ocorrência desse evento na natureza.

7. Considerações finais

Enquanto as fitobactérias apresentam vários exemplos de PAMPs e utilizam diferentes sistemas de secreção com proteínas efetoras durante o processo de infecção no hospedeiro, as plantas apresentam suas linhas de defesa (PTI e ETI) para reconhecimento e inibição da colonização pela bactéria. Com o uso da biotecnologia, vários estudos têm sido realizados nos últimos anos, os quais têm relatado novas informações sobre os mecanismos da genética da interação em diferentes interações bactéria-planta. Portanto, com o crescente número de estudos envolvidos nessa área, a tendência é que novos trabalhos sejam publicados gerando ainda mais informações que possam ser aplicadas no controle das fitobacterioses.

8. Bibliografia

- ABDALLAH, A.M.; PITTIUS, N. C.G.; CHAMPION, P. A. D.; COX, J.; LUIRINK, J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; APPELMELK, B. J.; BITTER, W. Type VII secretion [mdash] mycobacteria show the way. **Nature Review Microbiology**, v. 5, p. 883-891, 2007.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 948 p.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 385-414, 2004.
- BIATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v. 89, p. 353-359, 1999.
- BOGDANOVE, A. J.; SCHORNACK, S.; LAHAYE, T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 394-401, 2010.
- BREEDVELD, M. W.; MILLER, K. J. Cyclic β -glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. **Microbiological Reviews**, v. 58, p. 145-161, 1994.
- CAO, H.; BALDINI, R. L.; RAHME, L. G. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 259-284, 2001.
- CASCALES, E.; CHRISTIE, P. J. Definition of a bacterial Type IV secretion pathway for a DNA substrate. **Science**, v. 304, p. 1170-1173, 2000.
- CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y. C.; SHAW, P. D.; FARRAND, S. K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 11, p. 1119-1129, 1998.
- COBURN, B.; SEKIROV, I.; FINLAY, B. B. Type III secretion systems and disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 535-549, 2007.
- COSTA, T. R. D.; FELISBERTO-RODRIGUES, C.; MEIR, A.; PREVOST, M. S.; REDZEJ, A.; TROKTER, M.; WAKSMAN, G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 343-359, 2015.

- DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science**, v. 341, p. 746-751, 2013.
- DOYLE, E. L.; STODDARD, B. L.; VOYTAS, D. F.; BOGDANOVE, A. J. TAL effectors: highly adaptable phytochemical virulence factors and readily engineered DNA-targeting proteins. **Trends in Cell Biology**, v. 23, p. 390-398, 2013.
- FAULKNER, C.; ROBATZEK, S. Plants and pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, p. 699-707, 2012.
- GOESSWEINER-MOHR, N.; ARENDS, K.; KELLER, W.; GROHMANN, E. Conjugative type IV secretion systems in Gram-positive bacteria. **Plasmid**, v. 70, p. 289-302, 2013.
- GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P.; NOOKARAJU, A.; PANDEY, S. K.; PARK, S. W. Plant disease resistance genes: current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 51-65, 2012.
- HE, S. Y. Role of the type III protein secretion system in bacterial infection of plants. In: BROGDEN, K. A.; MINION, F. C.; CORNICK, N.; STANTON, T. B.; ZHANG, Q.; NOLAN, L. K.; WANNEMUEHLER, M. J. (Eds.). **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**. Washington: ASM Press, 2007. p. 209-220.
- HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ADEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p. 692-744, 2004.
- HOUBEN, E. N. G.; KOROTKOV, K. V.; BITTER, W. Take five – type III secretion systems of *Mycobacteria*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, p. 1707-1716, 2014.
- HURLEY, B.; SUBRAMANIAM, R.; GUTTMAN, D. S.; DESVEAUX, D. Proteomics of effector-triggered immunity (ETI) in plants. **Virulence**, v. 5, p. 752-760, 2014.
- JACKSON, R. W. **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology**. Haverhill: Caister Academic Press, 2009. 330 p.
- JANSE, J. D. **Phytopathology: principles and practice**. Wallingford: CABI Publishing, 2005. 360 p.
- KADO, C. I. **Plant bacteriology**. St. Paul: APS Press, 2010. 336 p.
- KAMOUN, S.; KADO, C. I. Phenotypic switching affecting chemotaxis, xanthan production, and virulence in *Xanthomonas campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3855-3860, 1990.
- KOROTKOV, K. V.; SANDKVIST, M.; HOL, W. G. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 336-351, 2013.
- LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature**, v. 411, p. 848-853, 2001.
- LINDGREN, P. B. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 129-152, 1997.
- LUCAS, G. C.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B.; LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; LELIS, F. M. V. Sistema secretório tipo III. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 18, p. 51-76, 2010.
- MATTHYSEE, A. G. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. **Journal of Bacteriology**, v. 154, p. 906-915, 1983.
- MELOTTO, M.; KUNKEL, B. N. Virulence strategies of plant pathogenic bacteria. In: ROSENBERG, E.; STACKEBRAND, E. F. D.; THOMPSON, S. L.; LORY, S. (Eds.). **The prokaryotes – prokaryotic physiology and biochemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2013. p. 61-82.

- MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review Microbiology**, v. 55, p. 165-199, 2001.
- MORRIS, C. E.; MONIER, J. M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 429-453, 2003.
- PRASANNATH, K. Pathogenicity and virulence factors of phyto bacteria. **Scholars Academic Journal of Biosciences**, v. 1, p. 24-33, 2013.
- RAMEY, B. E.; MATTHYSSE, A. G.; FUQUA, C. The FNR-type transcriptional regulator SinR control maturation of *Agrobacterium tumefaciens* biofilm. **Molecular Microbiology**, v. 52, p. 1495-1511, 2004.
- RODRIGUEZ-HERVA, J. J.; GONZALEZ-MELENDI, P.; CUARTAS-LANZA, R.; ANTUNEZ-LAMAS, M.; RIO-ALVAREZ, I.; LI, Z.; LOPEZ-TORREJON, G.; DIAZ, I.; DEL POZO, J. C.; CHAKRAVARTHY, S.; COLLMER, A.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P.; LOPEZ-SOLANILLA, E. A bacterial cysteine protease effector protein interferes with photosynthesis to suppress plant innate immune responses. **Cellular Microbiology**, v. 14, p. 669-681, 2012.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N.; DARDANELLI, M. S.; RUÍZ-SAÍNZ, J. E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 272, p. 127-136, 2007.
- SÁ, J.C. **Role of type IV secretion system T4SS on internalization and survival of *Brucella*, smoothan drought strain: infection in vitro and in vivo**. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís.
- SCHOLZ-SCHROEDER, B. K.; HUTCHISON, M. L.; GRGURINA, I.; GROSS, D. C. The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of sypA and syrB1 biosynthesis mutant analysis. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 14, p. 336-348, 2000.
- THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways secretion across the bacterial outer membrane. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 420-430, 2000.
- VAN DER HOORN, R. A.; KAMOUN, S. From guard to decoy, a new model for perception of plant pathogen effectors. **Plant Cell**, v. 20, p. 2009-2017, 2008.
- WANDERSMAN, C. Secretion across the bacterial outer membrane. In: NEIDHART, F. C.; CURTIS, R. III; INGRAHAM, L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W. S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, M. E. (Eds.). **Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular biology**. 2. ed. Washington: ASM Press, 1996. p. 905-918.

Detecção e Identificação Rápida de Fitobactérias

Adriano Márcio Freire Silva

Jéssica Rodrigues da Silva

Greecy Mirian Rodrigues Albuquerque

Marco Aurélio Siqueira da Gama

1. Introdução

A diagnose de muitas doenças de plantas é realizada, inicialmente, por meio da identificação de sintomas e sinais específicos de cada doença. Contudo, para confirmação precisa da causa da doença é necessário que seja realizada a detecção e identificação do seu agente causal (Rezende et al., 2011). Para confirmar a identidade de fitobacterioses conhecidas realiza-se testes rápidos de detecção, mas a diagnose de bactérias desconhecidas requer observação em campo, exame dos tecidos vegetais, isolamento do patógeno, caracterização e comprovação da causa da doença através dos postulados de Koch (Alvarez, 2004).

Além disso, muitas vezes é necessário detectar e identificar fitopatógenos localizados sobre a superfície de órgãos vegetais ou em infecções latentes, ou seja, sem a presença de sintomas.

A detecção é a confirmação da presença, dentro ou sobre a planta, do agente causal de uma doença, especialmente quando se trata de infecções latentes. Por sua vez, a identificação é um processo comparativo para determinação da posição taxonômica de bactérias desconhecidas com aquelas conhecidas, o que implica na caracterização da fitobactéria. Interessantemente, algumas técnicas

podem ser utilizadas tanto para detecção quanto para identificação de fitobactérias.

As técnicas de detecção e identificação de fitobactérias podem ser divididas em clássicas e moleculares. As técnicas de detecção clássicas envolvem protocolos para detecção rápida da presença de fitobactérias nos tecidos vegetais, isolamentos, microscopia do tecido infectado e indexações em plantas indicadoras, por sorologia e em meios de cultura seletivos ou semi-seletivos. Por sua vez, as técnicas clássicas de identificação são baseadas em caracterizações morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e por meio de bacteriófagos (Jansen, 2005).

As técnicas moleculares de detecção e identificação se baseiam na interação entre moléculas, geralmente DNA e RNA. No entanto, considerando que na sorologia também ocorre interações entre moléculas (antígeno-anticorpo), esta também é considerada como uma técnica molecular (Jansen, 2005). Contudo, visto que esta técnica começou a ser utilizada muito antes das técnicas moleculares de detecção e identificação por meio de ácidos nucleicos, atualmente a sorologia vem sendo considerada como uma técnica convencional.

2. Técnicas convencionais de detecção e identificação de fitobactérias

A sintomatologia de fitobacterioses é muitas vezes similar àquela causada por fungos e vírus. No entanto, algumas características marcantes como anasarca, exsudatos bacteriano e desprendimento de odor desagradável, como no caso de podridões moles, podem servir como um indício de infecções bacterianas. Alguns testes preliminares podem ser utilizados para detecção rápida da presença de fitobactérias no tecido de plantas, tais como o teste da câmara super-úmida de J. F. do Amaral, do copo, teste da lâmina (exame microscópico de exsudato bacteriano) e o teste da eosina (Mariano & Souza, 2016).

O **teste da câmara super-úmida** é utilizado para detecção de *Ralstonia solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* em solanáceas e outros hospedeiros. O teste é realizado pela imersão do caule (cortado em forma de bisel aos 10 cm acima do colo da planta) com raízes em um beaker com água, cobrindo-se o caule cortado com uma proveta ou tubo de ensaio, o qual formará uma câmara super-úmida. O resultado positivo é observado a partir de 12 h, podendo-se observar o exsudato bacteriano na superfície cortada do caule (Mariano & Silveira, 2005).

O **teste do copo** é utilizado para deteção da mesma bactéria. Nesse caso, corta-se um fragmento do caule escurecido em função da infecção. O fragmento é colocado na parede interna do copo, ficando aderido à parede pela força da tensão superficial da água entre o tecido e o copo. O fragmento deve ficar com uma metade acima da água e a outra metade imersa na água. Pode-se usar um clipe ou outro artifício para fixar o segmento do caule ao copo. O resultado positivo é dado pela ocorrência do fluxo de células bacterianas saindo do tecido em direção ao fundo do copo em forma de filetes brancos (Lopes & Rossato, 2013).

O **teste da lâmina ou teste de exsudação em gota** é utilizado para bactérias móveis em geral. Neste caso, corta-se com uma lâmina afiada parte do tecido lesionado e deposita-se o fragmento cortado sobre uma gota de água previamente depositada sobre a superfície de uma lâmina, cobrindo-se, em seguida, com uma lamínula. Neste caso, o resultado positivo é caracterizado pelo fluxo de células bacterianas do tecido em direção à água (Romeiro, 2001).

O **teste da eosina** é utilizado para deteção de infecções vasculares em folhas de crucíferas causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e consiste da imersão do pecíolo de folhas recém colhidas em solução do corante eosina Y a 0,1%. Dentro de 2 a 3 h, observa-se a absorção da eosina dentro dos vasos não colonizados pela bactéria, os quais apresentam coloração avermelhada, enquanto os vasos colonizados apresentam-se escurecidos com a coloração verde normal das folhas. Adicionalmente, por meio deste teste é possível detectar infecções latentes causadas pela bactéria (Assis et al., 1996).

O **isolamento** direto de fitobactérias em meio de cultura adequado é o método mais antigo e comum de deteção. Além de detectar a presença de fitobactérias nos tecidos do hospedeiro, o isolamento também permite a obtenção de cultura bacteriana pura, a qual é necessária para identificação do agente causal. Sua realização é indispensável para caracterizar certas espécies bacterianas, caracterizando-se como o primeiro passo dos postulados de Koch, o qual por sua vez é indispensável para comprovação da causa da doença. Os postulados de Koch, adaptados por Király et al. (1974), consistem em: I - reconhecimento da bactéria pelo exame microscópico do tecido infectado; II – isolamento da bactéria em meio de cultura, os quais podem ser não seletivos e seletivos; III – inoculação em plantas hospedeiras para obtenção dos sintomas originais; IV – reisolamento da bactéria a partir do hospedeiro inoculado e; V – comparação dos isolados e identificação da bactéria.

Para o isolamento convencional de fitobactérias de tecidos lesionados, o material coletado deve ser lavado e removido um pequeno fragmento do tecido

vegetal, contendo uma parte lesionada e uma parte sadia. Este fragmento é superficialmente esterilizado em álcool a 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio (3:1) por 1 minuto e, em seguida, duas lavagens em água destilada esterilizada (ADE) são realizadas. Posteriormente, os fragmentos são macerados em ADE e uma alíquota do macerado é transferida para placas de Petri contendo meio de cultura adequado (Romeiro, 2001). O isolamento também pode ser realizado por procedimentos nos quais fragmentos dos tecidos que são lavados (para detecção de populações epifíticas) ou macerados, filtrados e algumas vezes centrifugados, seguindo-se a transferência de pequenas alíquotas das suspensões para meios de cultura. Após a obtenção de colônias isoladas, estas são inoculadas em plantas teste (plantas hospedeiras) para confirmação dos sintomas e posterior reisolamento da fitobactéria (Mariano & Souza, 2016).

Os **meios de cultura** mais recomendados são o ágar nutritivo (AN) e o ágar nutritivo extrato de levedura dextrose (NYDA). No entanto, algumas fitobactérias fastidiosas, como *Xylella fastidiosa*, exigem meios mais complexos. Além disso, meios seletivos (deve-se levar em consideração que quase nunca um meio de cultura é completamente seletivo, sendo o termo semisseletivo mais adequado) desenvolvidos especificamente para determinadas fitobactérias são utilizados para detecção. O meios semisseletivos contém fontes de carbono e nitrogênio, inibidores (antibióticos, sais, compostos orgânicos, fungicidas, entre outros), sais, tampões ou indicadores de pH e ágar. Neste contexto, pode-se citar como exemplo o meio NYDAM (NYDA mais ampicilina), que se mostra altamente seletivo a *X. campestris* pv. *viticola* (Peixoto et al., 2006), o meio SMSA para o complexo *R. solanacearum* (Denny & Hayward, 2001), e os meios NSCAA, BSCAA e SX ágar que têm sido recomendados para detecção de *X. campestris* pv. *campestris* (Galli et al., 2001; Randhawa & Schaad, 1984; Tebaldi et al., 2007). Adicionalmente, meios semisseletivos apresentam um bom nível de detecção, variando de 10^3 – 10^5 células/ml (Jansen, 2005).

A observação dos tecidos infectados pode ser realizada por meio de **técnicas de microscopia ótica ou eletrônica**. Em ambos os casos, a presença de fitobactérias nos tecidos infectados indica que a doença está sendo causada pelo organismo em questão (Rezende et al., 2011). No entanto, deve-se levar em consideração que em alguns tipos de lesões a presença de fitobactérias pode não ocorrer, como por exemplo, no caso de hipertrofias.

As técnicas de microscopia óticas mais empregadas são microscopia de campo escuro e de contraste de fases, nas quais não se utilizam corantes (Bredt, 1983; Tully, 1983). Ambas as técnicas são úteis para detecção de espiroplasmas no tecido hospedeiro, embora não apresentem a mesma utilidade para

fitoplasmas devido ao pleomorfismo desses microrganismos que muitas vezes, assemelham-se a organelas e restos celulares sempre presentes na seiva das plantas (Mccoy et al., 1989). Além disso, para detecção de fitobactérias tanto em tecido quanto na suspensão obtida a partir do macerado, são utilizados métodos de coloração para evidenciar as células bacterianas ou de suas estruturas. Neste caso, os corantes mais utilizados são o azul de anilina e o diene, os quais são úteis para detecção de fitoplasmas e espiroplasmas nos elementos do tubo crivado (Dienes et al., 1948; Hiruki & Shukla, 1973). Quanto à microscopia eletrônica, tanto a de transmissão como a de varredura são utilizadas para detecção de fitobactérias, especialmente fitoplasmas e espiroplasmas (Rezende et al., 2011).

A **sorologia**, embora seja considerada por alguns autores como uma técnica molecular, é um método convencional de detecção de fitobactérias. Algumas técnicas sorológicas são utilizadas em conjunto com as técnicas moleculares clássicas, ou seja, as que envolvem a detecção de DNA e RNA. As técnicas sorológicas são baseadas em reações específicas entre antígeno e anticorpo. Os anticorpos são obtidos quando um antígeno (exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos, flagelina e glicoproteínas da cápsula) é introduzido na corrente sanguínea de um animal, o qual irá produzir anticorpos durante a resposta de imunidade (Shanmugam et al., 2013).

As técnicas sorológicas mais comuns empregadas tanto na identificação quanto na detecção de fitobactérias são precipitação (imunodifusão simples ou dupla), aglutinação, imunofluorescência e ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay). As vantagens dessas técnicas em relação às anteriores é que elas são menos dispendiosas, consomem menos tempo, são mais simples, robustas e algumas apresentam um nível de detecção relativamente alto (imunofluorescência 10^3 - 10^4 células/ml) e diversas amostras podem ser processadas ao mesmo tempo. Por sua vez, a desvantagem das técnicas sorológicas é que muitas vezes podem ocorrer reações cruzadas, ou seja, resultados falsos positivos com certa frequência. Adicionalmente, alguns testes, como ELISA, podem apresentar um nível de detecção razoavelmente baixo (10^5 - 10^6 células/ml) (Jansen, 2005).

Os métodos convencionais de identificação de fitobactérias são realizados por meio da caracterização morfológica, fisiológica, bioquímica e por meio de bacteriófagos (Mariano & Souza, 2016).

A caracterização morfológica é realizada por meio de características da colônia e das células bacterianas. Neste contexto, são observadas formas, cores e texturas das colônias. Quanto à morfologia celular, são observadas as

características das células, tais como formato da célula, tipos e disposição de flagelos, espessura da parede celular (reação de Gram), entre outros (Mariano & Silveira, 2005).

As características fisiológicas observadas são temperaturas de crescimento, ponto de morte térmica (50-55 °C), crescimento em diferentes concentrações de sais e níveis de pH e padrões de resistência ou suscetibilidade a antibióticos. Por sua vez, as características bioquímicas são observadas pela expressão do material genético dos diversos sistemas enzimáticos encontrados nas fitobactérias. Geralmente, as bactérias são cultivadas em placas ou tubos de ensaio com diferentes nutrientes para determinar se a bactéria é capaz de decompor diferentes fontes de C (açúcares, álcool, ácidos orgânicos, glicosídeos, entre outros) e N (aminoácidos). No entanto, alguns testes podem ser realizados em placas de Petri, sendo o teste positivo quando ocorre crescimento bacteriano. Estes testes geralmente são realizados pela inoculação de tubos contendo fontes de C ou N em meios mínimos comum indicador de pH. Se a bactéria é capaz de decompor a fonte de C ou N a produtos ácidos ou alcalinos, o indicador de pH irá mudar a coloração do meio (Mariano & Souza, 2016). Atualmente, diversas fontes de C e N podem ser testadas simultaneamente pelo uso de sistemas como o BIOLOG (em placas de ELISA contendo diferentes fontes de C e N) (Agrios, 2005).

Outros testes bioquímicos determinam a formação de certos produtos finais da bactéria, tais como a formação de H₂S a partir da cisteína, formação de indol a partir do triptofano, entre outros. Os efeitos de enzimas também podem ser visualizados diretamente ou depois de repicagens em placas de Petri contendo substratos da enzima. Como exemplo tem-se a hidrólise de amido, gelatina, caseína, entre outros (Mariano & Silveira, 2005).

Ao final da coleta das diversas características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, estas são utilizadas para identificação do isolado bacteriano por meio de chaves de identificação, onde são encontradas as características peculiares de cada gênero e espécie. No entanto, é importante mencionar que a identificação de fitobactérias por meio de características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas não é suficiente para determinar relacionamentos filogenéticos e também pode levar a identificação imprecisa do organismo em questão (Mariano & Silveira, 2005).

Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam bactérias sendo seus parasitas obrigados. Bacteriófagos específicos também podem ser utilizados para identificação de fitobactérias. Geralmente, os fagos são altamente específicos ou não apresentam especificidade (Jansen, 2005). No caso de fagos específicos,

estes são colocados em contato com a bactéria que se deseja identificar. A formação de placas de lise em meio de cultura confirma a identidade da fitobactéria (Mariano & Silveira, 2005).

3. Técnicas moleculares de detecção e identificação de fitobactérias

Os métodos moleculares para detecção e identificação de fitobactérias se baseiam no uso de sequências específicas (oligonucleotídeos iniciadores/sondas) e são bastante sensíveis, específicos e permitem a determinação de relacionamentos genéticos (Palacio-Bielsa et al., 2009). Diferentes técnicas baseadas na análise do DNA possibilitam a diferenciação entre espécies de patógenos e sua detecção em uma dada amostra (Louws et al. 1999), além de produzirem *fingerprintings* que revelam a variabilidade intraespecífica do patógeno (Versalovic et al., 1994).

As técnicas moleculares de detecção e identificação podem ser divididas grosseiramente em técnicas independentes de PCR (Polymerase Chain Reaction) e técnicas dependentes de PCR (Louws et al., 1999).

As técnicas de detecção e identificação **independentes de PCR** são baseadas na hibridação DNA-DNA ou na cinética da reassociação DNA-DNA para detectar, identificar e caracterizar fitobactérias (Louws et al., 1999). Nestas técnicas, o DNA bacteriano é extraído, purificado e submetido à clivagem em baixo pH para separação das fitas de DNA, as quais são fixadas em membranas de nylon ou nitrocelulose. Posteriormente, a membrana é tratada com uma sonda de DNA marcada na qual será detectado o DNA alvo. Por sua vez, as sondas são sequências de DNA marcadas (radioativamente ou com substratos cromogênicos, tais como a biotina) que apresentam homologia a fragmentos de DNA da bactéria a ser detectada ou identificada. A sonda se associa ao DNA complementar da bactéria previamente desnaturado podendo ser observado por meio de filmes de raios-X ou reações químicas apropriadas no caso da presença da bactéria em questão (Wolska & Szveda, 2012).

São várias as técnicas de biotecnologia que utilizam a hibridação como princípio do método, como por exemplo, o **Northern Blot** (descrito acima) e **Southern Blot**, os quais detectam fragmentos de DNA e RNA imobilizados em membranas, respectivamente (Passaglia & Zaha, 2014). Estes métodos são bastante específicos, no entanto, são demorados e requerem grande quantidade de ácidos nucléicos purificados (Brioso et al. 2001).

Outra técnica utilizada para detecção de fitobactérias é a técnica de **Dot Blot**, a qual se baseia na transferência de colônias, cultivos puros ou amostras vegetais para membranas de nitrocelulose, onde as células são rompidas e o DNA bacteriano fica imobilizado na membrana. Em seguida, a sonda é depositada na membrana para detecção da sequência homóloga. A grande vantagem desta técnica é sua facilidade de execução, no entanto, frequentemente são observados problemas quanto à especificidade e o nível de radioatividade da sonda ser relativamente baixo (Lima & Assunção, 2001).

A hibridação também pode ser realizada por fluorescência *in situ* para detecção de fitobactérias, uma técnica conhecida como **FISH** (Fluorescent *in situ* Hybridization). Nesta técnica, pequenas sondas oligonucleotídicas que hibridizam com a região 16S ou 23S do rRNA são utilizadas. Essas sondas podem ser utilizadas para hibridação *in situ* devido à capacidade de difusão através da parede celular de microrganismos que estão presentes em finas seções de tecido, ou em extratos de plantas ou solo fixados em lâminas microscópicas. A sensibilidade desta técnica depende da atividade metabólica das células, embora células mortas apresentem reações positivas por um período de tempo considerável. As sondas utilizadas nesta técnica geralmente são marcadas com corantes fluorescentes ou ouro, sendo as fitobactérias detectadas por meio de microscopia de fluorescência. A especificidade desta técnica é bastante alta, geralmente muito maior do que os métodos sorológicos, no entanto, reações falsos positivos podem ocorrer devido a homologia de RNA de organismos não alvo com a sequência específica da sonda (Brioso et al., 2001).

Outra técnica utilizada para identificação de fitobactérias é a análise do DNA por meio de **padrões de digestão com enzimas de restrição** (Mondal et al., 2004). Dessa forma, os padrões obtidos por meio de RFLP são baseados em mutações na sequência de DNA que modificam a sequência de reconhecimento da enzima de restrição (enzima que corta o DNA em locais específicos). Neste caso, o DNA é digerido com enzimas de restrição e, posteriormente, separado por meio de eletroforese, comparando-se os padrões de restrição pela observação das bandas resultantes (Mondal & Shanmugam, 2013). Adicionalmente, para análise de grandes moléculas de DNA (mais de 50 kb) pode-se utilizar a eletroforese de **campo pulsado (Pulse Field Gel Electrophoresis – PFGE)**. Contudo, os fragmentos obtidos por esta técnica são numerosos e se sobrepõem (Basim & Basim, 2001; Herschleb et al. 2007).

Por sua vez, na análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição (**Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP**) são utilizadas sondas, as quais podem ser específicas ou clonadas aleatoriamente. Neste caso, o DNA é

fragmentado pelo uso das enzimas de restrição e submetido à eletroforese, sendo posteriormente transferido para uma membrana, a qual pode ser de nylon ou nitrocelulose, onde ocorre a hibridação. Após a hibridização, os resultados são analisados através do padrão individual das bandas, visíveis à película de raio-X ou fluorescente, dependendo da forma de marcação da sonda (Mondal & Shanmugam, 2013). É importante mencionar que há limitações nesta técnica: 1) existe a necessidade da obtenção de uma quantidade suficiente (pelo menos 50 ng) de DNA de alto peso molecular para análises RFLP; 2) os marcadores das sondas, que normalmente requerem materiais radioativos, necessitam de infraestrutura laboratorial adequada podendo impedir a transferência da tecnologia de RFLP para laboratórios sem infraestrutura; 3) a análise por RFLP é laboriosa consumindo um tempo relativamente longo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Diversas técnicas utilizando **PCR** podem ser aplicadas para detecção e identificação de fitobactérias (Schaad et al., 2002). O princípio da técnica de PCR envolve três etapas básicas: **desnaturação** térmica do DNA molde (geralmente a 95 °C), **anelamento** dos oligonucleotídeos sintéticos (*primers* – artificialmente produzidos e consistem de uma sequência conhecida específica para determinada fitobactéria, sendo a temperatura mais comumente utilizada em torno de 68 °C, no entanto, esta varia em função do *primer*), os quais funcionam como iniciadores da reação de polimerização a cada um das fitas do DNA molde e; polimerização (**extensão**, geralmente a 72 °C) das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, utilizando cada um dos quatro dNTP (adenina, citosina, guanina e timina) como substrato da reação de polimerização (Mariano & Souza, 2016).

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), o processo de amplificação envolve repetidos ciclos de desnaturação térmica do DNA molde, anelamento dos iniciadores as suas sequências complementares e extensão dos nucleotídeos anelados por uma DNA polimerase altamente resistente a desnaturação em temperaturas elevadas. Os iniciadores se anelam as fitas opostas da sequência alvo e são orientados de tal forma que a síntese de DNA ocorra através da região compreendida entre estes. Tem-se então a duplicação desses seguimentos de DNA a cada ciclo da reação. Uma vez que os produtos recém-sintetizados também são complementares e capazes de se ligar aos iniciadores, após a desnaturação térmica, cada ciclo sucessivo essencialmente dobra a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior. O resultado é o acúmulo exponencial do fragmento específico de DNA, aproximadamente a 2^n , onde n é igual ao número de ciclos realizados.

Após a amplificação, os produtos da PCR são corados com brometo de etídio ou Syber e submetidos a corridas eletroforéticas para separação dos fragmentos amplificados. Posteriormente, os géis são depositados em equipamento adequado com luz ultravioleta, onde as bandas geradas podem ser visualizadas e fotografadas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os *primers* utilizados na técnica de PCR, quando empregada para detecção e identificação de fitobactérias, podem ser específicos para amplificação de uma sequência alvo, aleatórios ou complementares a sequências repetitivas do DNA. Nos dois últimos casos, são gerados *fingerprints* do DNA genômico, os quais são analisados por meio de programas computacionais para identificação da fitobactéria (Brioso et al., 2001).

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para o desenho de *primers* para detecção específica e identificação de fitobactérias. O desenho de *primers* requer o conhecimento da sequência alvo e, neste contexto, para alcançar a especificidade adequada é importante que a região a ser amplificada esteja presente apenas na fitobactéria a ser detectada. Dessa forma, os *primers* desenhados para fitobactérias tem se originado principalmente de genes de patogenicidade/virulência, ribossomal e plasmídeos (Lopez et al., 2009).

Segundo Lopez et al. (2009) a sequência de diversos *primers* específicos para detecção de genes de patogenicidade e virulência estão disponíveis, os quais podem ser encontrados em diversas publicações. Nesse sentido, Palacio-Bielsa et al. (2009) compilou publicações de mais de 200 protocolos de PCR para detecção e identificação de mais de 50 espécies bacterianas, nove subespécies e mais de 40 patovares. Como exemplo, tem-se *primers* específicos para detecção do gene *pel* (gene da pectatoliase) de subespécies de *Pectobacterium carotovorum*, o qual gera um fragmento de 434 pb (Galleli et al., 2009) e *primers* específicos para detecção do gene *virD2* (gene da endonuclease) de *Rhizobium radiobacter* (Haas et al., 1995).

Algumas modificações das técnicas de PCR também podem ser utilizadas para detecção e identificação de fitobactérias, tais como **Multiplex PCR** e **Nested-PCR** (Bertolini et al. 2003a, 2003b). A técnica de Multiplex PCR consiste na amplificação de mais de um segmento genômico numa única reação, cada um com seu par de *primers* específico. Esta vantagem pode simplificar alguns experimentos, como a detecção de fitobactérias diferentes ao mesmo tempo. Por sua vez, a Nested-PCR é utilizada para melhorar a especificidade e a eficiência da reação, sendo realizado por meio de uma amplificação preliminar usando um par de *primers* universal, seguindo-se uma segunda amplificação

utilizando um segundo par de *primers* universal. Posteriormente, a PCR é realizada com *primers* específicos (Mondal & Shanmugam, 2013).

A Multiplex PCR tem sido útil na detecção e identificação de diferentes fitobactérias, como *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* e *R. syzigii* (Fegan & Prior, 2005; Safni et al., 2014). Como também, a Nested-PCR na detecção ultra-sensível de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Lee et al., 1997), *Erwinia amylovora* (Lopes et al., 2000) e *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Bertolini et al., 2003b).

Embora a nested-PCR seja uma técnica extremamente sensível, sendo capaz de detectar populações bacterianas da ordem de 10^2 UFC/ml, alguns resultados do tipo falso positivo podem ser obtidos (Lopez et al., 2009). No entanto, a utilização de PCR em tempo real pode contornar este problema devido à alta sensibilidade deste método bem como devido à leitura direta do resultado, a qual reduz o risco de contaminações e da necessidade de análise do gel pós-PCR (Mondal & Shanmugam, 2013).

Diversas técnicas de *fingerprinting* (genotipagem) também podem ser realizadas por meio de PCR e utilizadas para detecção e identificação de fitobactérias. Neste contexto, as principais técnicas utilizadas são polimorfismo de DNA amplificados randomicamente (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA), análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism) e rep-PCR (Mondal & Shanmugam, 2013). Para detecção e identificação de fitobactérias por estes métodos é importante ter isolados tipo da espécie em questão para comparação dos padrões gerados após as amplificações. No caso da técnica de rep-PCR, alguns laboratórios possuem livrarias genômicas onde estão depositados os perfis de *fingerprint* de diversas espécies de fitobactérias.

Com a técnica de **RAPD**, são obtidos padrões pela amplificação de DNA genômico com *primers* pequenos e aleatórios (10 pb), os quais são não específicos e se ligam randomicamente ao DNA em temperaturas de 36-45°C. O padrão dos produtos de amplificação são geralmente discriminativos em baixo nível taxonômico (frequentemente a nível de isolado). Como a sequência de cada iniciador é determinada de modo aleatório, este pode encontrar várias regiões complementares à sua sequência e, por isso, revelar vários locos (Lopez et al., 2002). Contudo, esta técnica vem caindo em desuso visto que os *primers* utilizados são bastante vulneráveis a pequenas diferenças nas condições da PCR, o que resulta em baixa reprodutibilidade desta técnica (Perez et al., 1998; Skorić et al., 2012).

Outra técnica de análise genômica amplamente utilizada em procariotos é **rep-PCR**, que se tem mostrado extremamente confiável, reproduzível, de simples e rápida realização e altamente discriminatória, mesmo entre populações de uma mesma espécie (Louws et al., 1999; Rademaker & Bruijin, 1997; Versalovic et al., 1994). Rep-PCR utiliza *primers* que são complementares a sequências repetitivas no DNA, altamente conservadas, que se apresentam em múltiplas cópias no genoma da maioria das bactérias Gram-negativas e em várias Gram-positivas, podendo desta forma ser utilizado para produzir *fingerprints* em diversos organismos. O uso desses *primers* leva a amplificação seletiva de regiões genômicas distintas localizadas entre as regiões repetitivas, o que gera padrões de bandas referentes às regiões entre esses elementos repetitivos (Rademaker & Bruijin, 1997).

As sequências “rep” correspondem aos elementos REP, ERIC e BOX (Versalovic et al. 1994) e pertencem a famílias de sequências repetitivas intergênicas encontradas em procariotos, sendo primeiramente identificadas em bactérias entéricas como *Escherichia coli* (Higgins et al., 1982). As três famílias de regiões repetitivas são: os elementos REP (*repetitive extragenic palindromic*) de 35-40 bp, ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) de 124-127 bp e o elemento BOX (BOX elemento) de 154 bp (Mondal & Shanmugam, 2013). O uso de rep-PCR tem a vantagem dos *primers* possuírem sequência conhecida e já terem sido utilizados em estudos com várias bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Desta forma, é dispensada uma seleção inicial de *primers* desenhados a partir da estrutura genômica de uma determinada espécie, como é necessário para a análise de RAPD, e com isso, gera resultados em um menor período de tempo (Lima et al., 2002). Adicionalmente, o tipo de amostra utilizada para rep-PCR depende do objetivo do estudo, podendo se obter padrões de bandas a partir de DNA purificado, células inteiras, culturas em placas ou lesões em plantas. Portanto, esta técnica pode ser utilizada tanto para detecção quanto para identificação de fitobactérias (Rademaker & Bruijin, 1997; Rademaker et al., 1998).

A técnica de *fingerprinting* por meio de **AFLP** é baseada na amplificação, via PCR, de um subconjunto de fragmentos gerados a partir da digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição tipo II, que clivam o DNA em sítios específicos, de corte raro (reconhecem sítios de 6-8 bases, ex. *ApaI*, *EcoRI*, *HindIII* e *PstI*) e de corte frequente (reconhecem sítios de 4 bases, ex. *MseI* e *TaqI*). A utilização de duas enzimas de restrição é importante para geração de um grande número de fragmentos. É fundamental que a digestão do DNA seja completa, pois a digestão parcial pode revelar falsos polimorfismos

(Lopes et al., 2002; Vos et al., 1995). Para obtenção da digestão total é necessário usar DNA de alta pureza. Portanto, é preciso prestar atenção no método de extração e quantificação usado. A técnica baseia-se na propriedade de certas enzimas de restrição de deixar, após a clivagem do DNA, extremidades coesivas de sequência conhecida. Assim, é possível construir sequências de nucleotídeos de fita dupla que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição, denominadas “adaptadores”. Uma vez que a sequência dos adaptadores e a do sítio de restrição é conhecida, é possível construir iniciadores específicos a essas sequências para pré-amplificação dos fragmentos de restrição. Os *primers* são constituídos por uma sequência complementar ao adaptador seguida de outra específica do sítio de restrição da enzima, e uma extensão de nucleotídeos seletivos no terminal 3' (Lopes et al., 2002; Vos et al., 1995). Adicionalmente, esta técnica permite a discriminação a um baixo nível taxonômico, ou seja, permite a detecção de variações genéticas entre espécies estreitamente relacionadas ou entre indivíduos da mesma espécie (Wolska & Szweda, 2012). Portanto, esta técnica é mais útil para identificação de fitobactérias do que para detecção.

Outra técnica que pode ser utilizada para detecção e identificação de fitobactérias é a **PCR em tempo real** (Mirmajlessi et al., 2015). A PCR convencional não apresenta valores quantitativos, por isso, foi desenvolvida a PCR em tempo real, que consegue realizar a avaliação do número de moléculas produzidas a cada ciclo (Passaglia & Zaha, 2014). As características relevantes da PCR em tempo real são rapidez, especificidade, sensibilidade e quantificação, além de possibilitar a detecção simultânea de diferentes microrganismos (Okubara et al., 2005; Postollec et al., 2011). A amplificação é dividida em três fases: a linha basal na qual não há produtos de PCR suficientes para detectar fluorescência, a fase log em que a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo e a fase platô onde não há mais aumento no número de produtos (Novais et al., 2004).

Na PCR em tempo real existem dois métodos de quantificação: a detecção não-específica e a específica. O Syber Green é o exemplo mais utilizado de detecção não-específica, no qual fluoróforos se ligam à fita-dupla de DNA, emitindo fluorescência (Novais et al., 2004). O TaqMan e o Molecular Beacon são sondas altamente específicas a sequência alvo, liberando fluorescência apenas na presença do produto de PCR de interesse. Eles são capazes de realizar reações múltiplas, detectando diferentes fitobactérias em uma mesma reação, por exemplo (Novais et al., 2004; Mirmajlessi et al., 2015).

Nos últimos anos, diversos protocolos foram desenvolvidos para detecção de fitobactérias por qPCR, tais como: *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. chrysanthemi* em batata e solo (Wu et al., 2011), “*Candidatus Phytoplasma mali*” em maçã e insetos vetores (Baric, 2012), *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato* e *P. syringae* pv. *phaseolicola* em tomate e feijoeiro (Xu & Tambong, 2011), *E. amylovora* em maçã e pera (Kaluzna et al., 2013) e através de qPCR multiplex, a detecção e diferenciação de isolados de *R. solanacearum* sequevares IIB-1 e IIB- 2 (Stulberg & Huang, 2015).

Os métodos moleculares têm uma importante colocação na detecção e identificação de fitobactérias. No entanto, os métodos convencionais são extremamente importantes e possivelmente não cairão em desuso. Além disso, para identificação e classificação de fitobactérias é importante que as características fenotípicas e genotípicas sejam avaliadas para refletir a composição geral do microrganismo.

4. Bibliografia

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 948 p.
- ALVAREZ, A. M. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. **Annual Review Phytopathology**, v. 42, p. 339-366, 2004.
- ASSIS, S. M. P.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; COELHO, R. S. B. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: WENHUA, T.; COOK, R. J.; ROVIRA, A. (Eds.). **Advances in biological control of plant diseases**. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p. 347-353.
- BARIC, S. Quantitative real-time PCR analysis of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ without external standard curves. **Erwerbs-Obstbau**, v. 54, p. 147-153, 2012.
- BASIM, E.; BASIM, H. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. **Turkish Journal Biology**, v. 25, p. 405-418, 2001.
- BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; L’OPEZ, M. M.; CAMBRA, M. Multiplex nested RT-PCR in a single closed tube for sensitive and simultaneous detection of tour RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. **Phytopathology**, v. 93, p. 286-292, 2003a.
- BERTOLINI, E.; PENYALVER, R.; GARCÍA, A.; OLMOS, A.; Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. **Journal Microbiological Methods**, v. 52, p. 261-266, 2003b.
- BREDT, W. Phase-contrast microscopy. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Eds.). **Methods in mycoplasmaology**: mycoplasma characterization. New York: Academic Press, 1983. p. 31-33.
- BRIOSIO, P. S. T.; POZZER, L.; MONTANO, H. G.; PIMENTEL, J. P. Uso atual e futuro da Biologia molecular na fitopatologia. Parte I- Aplicações em fitopatógenos e vetores. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 9, p. 79-118, 2001.
- DENNY, T. P.; HAYWARD, A. C. *Ralstonia*. In: SHAAD, N. W.; JONES, J. B. CHUN, W. (Eds.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: APS Press, 2001. p. 151-174.

- DIENES, L.; ROPES, M. W.; SMITH, W. E.; MADOFF, S. BAUER, W. The role of pleuropneumonia-like organisms in genitourinary and joint diseases. **New England Journal Medicine**, v. 238, p. 509-515, 1948.
- FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St Paul: APS Press, 2005. p. 449-461.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CERNARGEN, 1998. 220 p.
- GALLI, J. A.; PANIZZI, R. C.; SADER, R.; CAMARGO, M. Efeito de *Xanthomonas campestris*pv. *campestris* na germinação de sementes de couve-flor e eficiência de meios de cultura na detecção do patógeno em sementes de repolho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p. 171-176, 2001.
- HAAS, J. H.; MOORE, L. W.; REAM, W.; MANULIS, S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2879-84, 1995.
- HERSCHLEB, J.; ANANIEV, G.; SCHWARTZ, D. C. Pulsed-field gel electrophoresis. **Nature Protocols**, v. 2, p. 677-684, 2007.
- HIGGINS, C. F.; AMES, G. F. L.; BARNES, W. M.; CLEMENT, J. M.; HOFNUNG, M.A novel intergenic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature**, v. 298, p. 760-762, 1982.
- HIRUKI, C.; SHUKLA, P. Mycoplasma-like bodies associated with witches' broom of leeding heart. **Phytopathology**, v. 63, p. 88-92, 1973.
- JANSE, J. D. **Phytopacteriology: principles and practice**. Wallingford: CABI Publishing, 2005. 360 p.
- KALUZNA, M.; PULAWSKA, J.; MIKICINSKI, A. Evaluation of methods for *Erwinia amylovora* detection. **Journal of Horticultural Research**, v. 21, p. 65-71, 2013.
- KIRÁLY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYMOSY, F.; VÖRÖS, J. **Methods in plant pathology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1974. 509 p.
- LEE, I. M.; BARTOSZYK, I. M.; GUNDERSEN, D. E.; MOGEN, B.; DAVIS, R. E. Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2625-2630, 1997.
- LIMA, A. S. G.; GUIDELLI, A. M.; ABREU, I. L.; LEMOS, M. V. F. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 225-229, 2002.
- LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P. Biologia molecular como ferramenta na detecção de fitopatógenos. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.) **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, 2001. p. 291-310.
- LOPES, C. A.; ROSSATO, M. **Diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro**. Brasília: EMBRAPA, 2013. 10 p. (Comunicado Técnico, 92).
- LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. O. CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, p. 56-60, 2002.
- LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUJIN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytopathogenic bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, v. 37, p. 81-125, 1999.
- MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. (Eds.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 3. ed. Recife: EDUFRPE, 2016. 200 p.

- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. (Rs.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: EDUFPRPE, 2005. 184 p.
- MCCOY, R. E.; CAUDWELL, A.; CHANG, C. J.; CHEN, T. A.; CHIYKOWSKI, L. N.; COUSIN, M. T.; DALE, J. L.; DE LEEUW, G. T. N.; GOLINO, D. A.; HACKETT, K. J.; KIRKPATRICK, B. C.; MARWITZ, R.; PETZOLD, H.; SINHA, R. C.; SUGIURA, M.; WHITCOMB, R. F.; YANG, I. L.; ZHU, B. M.; SEEMÜLLER, E. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: WHITCOMB, R. F.; TULLY, J. G. (Eds.). **The Mycoplasmas**. New York: Academic Press, 1989. p. 545-560.
- MIRMAJLESSI, S. M.; LOIT, E.; MAND, M.; MANSOURIPOUR, M. Real-Time PCR Applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis – a review. **Plant Protect Science**, v. 51, p. 177–190, 2015.
- MONDAL, K. K.; BHATTACHARYA, R.C.; KAUNDAL, K. R. Biotechnological strategies in the detection, characterization and management of fungal diseases in plant. **The Botanica**, v. 54, p. 1-20, 2004.
- MONDAL, K. K.; SHANMUGAM, V. Advancements in the diagnosis of bacterial plant pathogens: An overview. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 8, p. 1-11, 2013.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 7, p. 10-13, 2004.
- OKUBARA, P. A.; SCHROEDER, K. L.; PAULITZ, T. C. Real-time polymerase chain reaction: applications to studies on soilborne pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 27, p. 300-313, 2005.
- PALACIO-BIELSA, A.; CAMBRA, M. A.; LÓPEZ, M. M. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). **Journal of Plant Pathology**, v. 91, p. 249-297, 2009.
- PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnicas de biologia molecular. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Org.). **Biologia molecular básica**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 331-362.
- PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, v. 36, p.1317-1320, 2006.
- PEREZ, T.; ALBORNOZ, J.; DOMÍNGUEZ, A. Na evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1347-1357, 1998.
- POSTOLLEC, F. FALENTIN, H.; PAVAN, S.; COMBRISSE, J.; SOHIER, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, p. 848-861, 2011.
- RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; DE BRUIJN, F. J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKERMANS, A. D. L.; ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F. J. **Molecular microbial ecology manual**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 1-27.
- RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: ANOLLES, G. G.; GRESSHOFF, P. M. (Eds.). **DNA markers: protocols, applications & overviews**. New York: J. Willey & sons, 1997. p. 151-171.
- RANDHAWA, P. S.; SCHAAD, N. W. Seletive isolatios of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. **Phytopathology**, v. 74, p. 268-272, 1984.
- REZENDE, J. A. M.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BEDENDO, I. P.; KRUGNER, T. L. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN

- FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p. 37-58.
- ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279 p.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: APS Press, 2002. 398 p.
- SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L.; KAPPLER, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *Celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3087-3103, 2014.
- SKORIĆ, M.; ŠILER, B.; BANJANAK, T.; ŽIVKOVIĆ, J.; DMITROVIĆ, S.; MIŠIĆ, D.; GRUBIŠIĆ, D. The reproducibility of RAPD profiles: effects of PCR components on RAPD analysis of four *Centaureum* species. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, p. 191-199, 2012.
- STULBERG, M. J.; HUANG, Q. H. A TaqMan-based multiplex qPCR assay and DNA extraction method for phylotype IIB sequevars 1&2 (select agent) strains of *Ralstonia solanacearum*. **PLoSOne**, v. 10, p. 1-20, 2015.
- TEBALDI, N. D.; PANIZZI, R. C.; SADER, R. Detecção, transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolis. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 290-293, 2007.
- TULLY, J. G. Dark-field microscopy. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Eds.). **Methods in Mycoplasmology: mycoplasma characterization**. New York: Academic Press, 1983. p. 35-37.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIGTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.
- WOLSKA, K.; SZWEDA, P. Genotyping techniques for determining the diversity of microorganisms. In: CALISKAN, M. (Ed.). **Genetic diversity in microorganisms**. Croatia: In Tech, 2012. p. 53-94.
- WU, J.; DIAO, Y.; GU, Y.; HU, Z. Molecular detection of *Pectobacterium* species causing soft rot of *Amorphophallus konjac*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 613-618, 2011.
- XU, R.; TAMBONG, J. T. A TaqMan real-time PCR assay targeting the cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II gene for detection of several pathogens of *Pseudomonas syringae*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 33, p. 318-331, 2011.

Quantificação de Fitobacterioses

Fábio Junior Araújo Silva
Sami Jorge Michereff

1. Introdução

Bactérias são importantes patógenos de plantas, não somente pela alta incidência em culturas de valor econômico, mas também pela facilidade com que se disseminam e pelas dificuldades encontradas para o controle das enfermidades causadas. Os principais sintomas causados por bactérias fitopatogênicas incluem: anasarca ou encharcamento, mancha, podridão mole, murcha, hipertrofia, cancro, morte das pontas, talo oco e canela preta. Esses sintomas estão associados a fatores de virulência e patogenicidade produzidos pelas bactérias fitopatogênicas durante a interação com o hospedeiro (Kado, 2010).

A quantificação das doenças causadas por fitobactérias é essencial para a comparação de tratamentos, descrição de padrões de epidemias no tempo e no espaço, determinação das relações entre níveis de doenças e perdas de rendimento, bem como para o estabelecimento de estratégias de manejo visando a prevenção ou redução das perdas de produção. Nesse contexto, a importância da quantificação das doenças de plantas tem sido frequentemente comparada à importância da diagnose, pois de nada adiantaria conhecer o agente causal (patógeno) de uma doença se não fosse possível quantificar os sintomas por ele causados (Amorim, 1995).

Embora a importância da quantificação de doenças seja amplamente reconhecida, existe falta de padronização nos métodos utilizados na avaliação de doenças. O problema da desuniformidade de métodos começa pela própria terminologia utilizada, uma vez que os termos prevalência, incidência e severidade, que representam as variáveis a serem medidas, são muitas vezes

utilizadas de formas inadequadas. Prevalência é utilizada para descrever a frequência relativa, em porcentagem ou proporção, que uma doença ocorre em uma área geográfica definida, ou seja, o número de campos em que a doença está presente dividido pelo número total de campos amostrados. Incidência descreve a porcentagem ou proporção de plantas (ou partes de plantas) doentes em uma amostra ou população, ou seja, o número de unidades doentes em relação ao número total de unidades avaliadas. Severidade descreve a porcentagem ou proporção da área ou do volume de tecido coberto por sintomas da doença em uma unidade amostral, por exemplo, uma folha (Campbell & Madden, 1990; Madden et al. 2007; Nutter et al. 1991).

Os métodos de quantificação de doenças podem ser agrupados em métodos diretos, onde a estimativa da quantidade de doença é feita diretamente através dos sintomas, ou métodos indiretos, onde a quantidade de doença é estimada pela população do patógeno ou variáveis associadas à doença. A escolha do método de quantificação a ser utilizado dependerá do patossistema e dos objetivos do estudo, bem como da disponibilidade de um método previamente utilizado.

2. Métodos diretos de avaliação de doenças

Entre os métodos diretos de avaliação de doenças encontram-se as estimativas da incidência e da severidade, índices de doenças e contagem do número de lesões por área, bem como outras técnicas mais sofisticadas, como análise de imagens digitais e sensoriamento remoto.

2.1. Quantificação da incidência da doença

A incidência é uma variável discreta, de natureza binária, ou seja, existe ou não existe a doença (Madden et al., 2007). A contagem do número de plantas de tomateiro com murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), do número de plantas de alface e couve-chinesa com podridão mole (*Pectobacterium carotovorum*) ou do número de frutos de melão com mancha aquosa (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) é fácil de ser obtida, sem nenhuma subjetividade. Com a contagem do número de plantas doentes em determinada parcela da área de plantio, a incidência da doença (ID) pode ser calculada como:

$$ID (\%) = (NPD/NTP) \times 100$$

onde NPD = número de plantas (ou suas partes) doentes e NTP = número total de plantas (ou suas partes) avaliadas.

A quantificação da incidência é simples para ser obtida e propicia elevados níveis de precisão nas estimativas. No entanto, muitas vezes a avaliação da doença baseada na incidência fornece dados alarmantes e não reflete a intensidade real da doença no campo, pois leva em consideração somente a presença do sintoma e não a intensidade deste. Além disso, do ponto de vista da quantificação de danos, a utilização da incidência está sujeita a algumas limitações, uma vez que deve ser usada para aquelas doenças que atacam a planta toda, como as murchas vasculares, ou para aquelas em que uma única infecção é suficiente para impedir a comercialização do produto, como as podridões de frutos, raízes e tubérculos. No entanto, na quantificação de bacterioses foliares pode ser utilização da incidência. Como exemplo, em estudo envolvendo a podridão negra do repolho (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) a expressão dos sintomas foi avaliada em cada planta pela quantificação da incidência de folhas doentes (expressa como a proporção de folhas doentes por parcela) (Kocks et al., 1998).

2.2. Quantificação da severidade da doença

A severidade da doença pode ser obtida através de dois processos: estimação, quando a doença é quantificada visualmente; ou mensuração, quando a doenças é quantificada através da análise de imagens ou por reflectância da copa. Apesar dos avanços nos sistemas baseados em imagens e nas ferramentas disponíveis para auxiliar na mensuração da severidade (Barbedo, 2014; Lamari, 2008; Pethybridge & Nelson, 2015), avaliações visuais qualitativas ou quantitativas ainda são comumente usadas (Bock et al., 2010; Del Ponte et al., 2016).

A severidade é a mais apropriada para a quantificação de doenças foliares, como bacterioses causadoras de manchas e crestamentos. Nestes casos, a porcentagem da área de tecido foliar coberto por sintomas retrata melhor a intensidade da doença do que a incidência. A forma mais simples de estimar a severidade é a quantificação direta da intensidade da doença. No entanto, esse procedimento está sujeito a um elevado nível de erro. Para facilitar a avaliação da severidade de doenças, várias estratégias têm sido propostas, dentre as quais se destacam a utilização de escalas descritivas, de escalas diagramáticas e da análise de imagens digitais. Qualquer que seja a estratégia adotada, é

fundamental que o estágio de desenvolvimento da cultura e o órgão da planta amostrado sejam bem definidos.

2.2.1. Escalas descritivas

Escalas descritivas utilizam chaves com certo número de graus para quantificar a severidade das doenças. Cada grau da escala deve ser apropriadamente descrito ou definido. São numerosos os exemplos de utilização de escalas descritivas. Algumas são bastante úteis e largamente empregadas, pois representam uma metodologia uniforme de coleta de dados. Muitas, por outro lado, são mal elaboradas e não permitem uma avaliação sistemática de doenças.

A escala de notas mais utilizada em Fitopatologia é a desenvolvida por Horsfall & Barrat (1945), que apresenta 12 classes de severidade (Tabela 1). As classes, que representam a porcentagem de tecido vegetal doente, têm intervalos variáveis, espaçados logaritmicamente. Como exemplo, suponha que durante a avaliação de determinada doença no campo, uma folha seja incluída na classe 4, correspondendo entre 12 e 25% de severidade. Entretanto, na fase de processamento dos dados, esse valor será tabulado como 18,5%.

Tabela 1. Escala de notas de Horsfall & Barrat (1956) para quantificação de doenças de plantas.

Classe	Severidade (%)	Severidade média (%)
0	0	0
1	0-3	1,5
2	3-6	4,5
3	6-12	9,0
4	12-25	18,5
5	25-50	37,5
6	50-75	62,5
7	75-87	81,5
8	87-94	91,0
9	94-97	96,5
10	97-100	98,5
11	100	100

Um aspecto importante na quantificação com escalas descritivas é a precisão dos limites dos níveis de severidade da doença. Um exemplo de grande precisão nos limites da severidade da doença é a escala descritiva utilizada para quantificação da sarna em tubérculos de batata (*Streptomyces turgidiscabies*) (Tabela 2).

Tabela 2. Escala descritiva para quantificação da severidade da sarna em tubérculos de batata (*Streptomyces turgidiscabies*) (Sakuma et al., 2011).

Classe	Número de lesões/tubérculo
0	0
1	1 a 3
2	4 a 10
3	11 a 20
4	>21

Outro exemplo de escala descritiva com elevada precisão na descrição dos limites da intensidade da doença é a utilizada para quantificação do fogo selvagem em flores de macieira (*Erwinia amylovora*) (Tabela 3).

Tabela 3. Escala descritiva para quantificação da severidade do fogo selvagem em flores de macieira (*Erwinia amylovora*) (Mikiciński et al., 2016).

Classe	Limites
0	flor aparentemente sadia
1	necrose visível no nectarífero da flor
2	necrose em todo o ovário
3	necrose cobrindo, pelo menos, metade do comprimento do pedúnculo
4	necrose cobrindo a flor, incluindo todo o pedúnculo

Nos dois casos anteriores (Tabelas 2 e 3), os limites de severidade das doenças estão claramente estabelecidos, propiciando elevadas precisões nas estimativas da severidade. Por outro lado, escalas descritivas mal elaboradas são frequentes na literatura. Um exemplo desse tipo pode ser ilustrado pela escala descritiva destinada à quantificação da mancha bacteriana do pessegueiro e da nectarina (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) (Tabela 4). Nessa escala são

definidos oito graus de intensidade da doença e as estimativas de porcentagem de área foliar lesionada são baseadas na quantificação direta. Qual o grande problema dessa escala: baseado em que os avaliadores vão estimar os valores de áreas foliares lesionadas para definir os graus da escala? Conforme destacado anteriormente, a quantificação direta dos níveis de doença está sujeito a um elevado nível de erro.

Tabela 4. Escala descritiva para quantificação da severidade da mancha bacteriana do pessegueiro e da nectarina (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) (Bardsley & Ngugi, 2013).

Classe	Área foliar lesionada (%)
1	0
2	1-3
3	4-8
4	9-15
5	16-25
6	26-45
7	>45

Existem muitas escalas descritivas utilizadas para quantificação da severidade de fitobacterioses semelhantes à apresentada na Tabela 4. No entanto, o uso dessas escalas descritivas sem precisão nos limites dos níveis de severidade das doenças deve ser evitado, pois poderão induzir os graves erros nas estimativas.

2.2.2. Escalas diagramáticas

As escalas descritivas podem ser efetivas em situações que não necessitem de exatidão. A estimativa direta da área foliar lesionada pode apresentar alta subjetividade, com risco de baixa precisão e, ou, exatidão, além de baixa reprodutibilidade, principalmente com avaliadores inexperientes. Excetuando-se os estágios iniciais de epidemias, a contagem do número de lesões é pouco aplicável em condições de campo, pois demanda longo tempo para execução e, frequentemente, requer amostragem destrutiva, o que nem sempre é indicado em estudos epidemiológicos. Para contornar esses inconvenientes, a avaliação da severidade com o auxílio de escalas diagramáticas pode constituir uma excelente opção em estudos de campo.

Escalas diagramáticas são representações ilustradas de uma série de partes de plantas ou de plantas inteiras com sintomas em diferentes níveis de severidade. Atualmente, essas escalas se constituem na principal ferramenta de avaliação da severidade para muitas doenças.

Diversas escalas diagramáticas estão disponíveis na literatura em periódicos especializados para os mais variados patossistemas. No entanto, o número de escalas diagramáticas para quantificação de fitobacterioses é reduzido quando comparados às doenças fúngicas. Como exemplos de escalas diagramáticas para quantificação de fitobacterioses podem ser destacadas as escalas da clorose variegada em folhas de citros (*Xylella fastidiosa*) (Figura 1), do cancro bacteriano em folhas de videira (*X. campestris* pv. *viticola*) (Figura 2), da bacteriose em folhas de maracujazeiro (*X. axonopodis*) (Figura 3), da sarna comum em tubérculos de batateira, causada por *Streptomyces scabies* (Figura 4), do crestamento bacteriano em vagens de feijoeiro comum, causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Figura 5), do cancro cítrico em frutos de laranja, (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) (Figura 6) e da murcha bacteriana em planta de tomateiro (*R. solanacearum*) (Figura 7). Esses são apenas alguns exemplos de escalas diagramáticas com representações ilustradas dos níveis de severidade de bacterioses em partes de plantas (Figuras 1-6) ou plantas inteiras (Figura 7). Vários outros exemplos de escalas diagramáticas para quantificação da severidade de fitobacterioses são apresentados na Tabela 5.

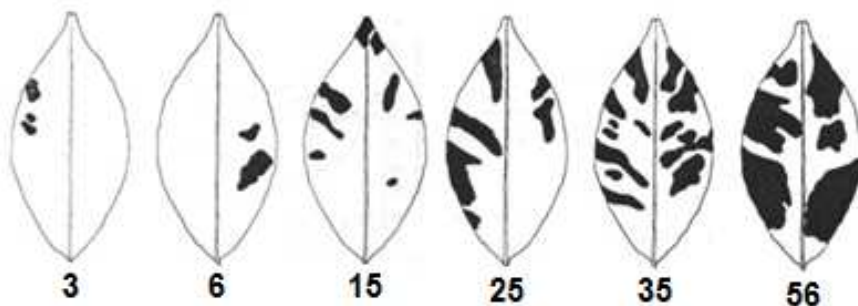


Figura 1. Escala diagramática para quantificação da severidade da clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*), indicando níveis de 3, 6, 15, 25, 35 e 56% da área foliar com sintomas da doença (Amorim et al., 1993).

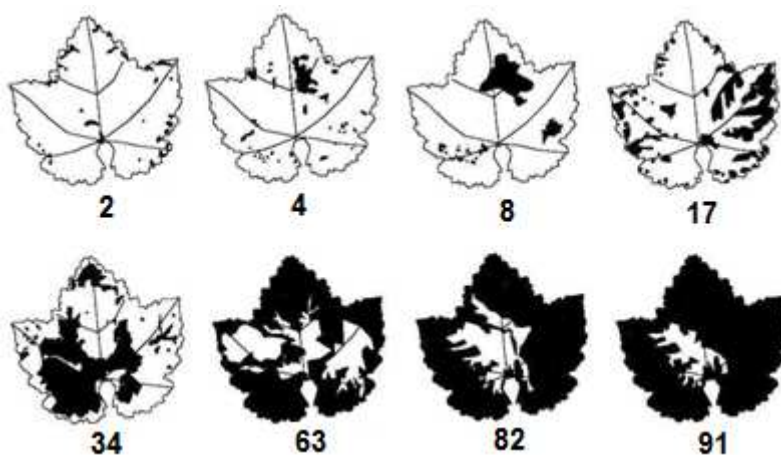


Figura 2. Escala diagramática para quantificação da severidade do cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*), indicando níveis de 2, 4, 8, 17, 34, 63, 82 e 91% da área foliar com sintomas da doença (Nascimento et al., 2005).

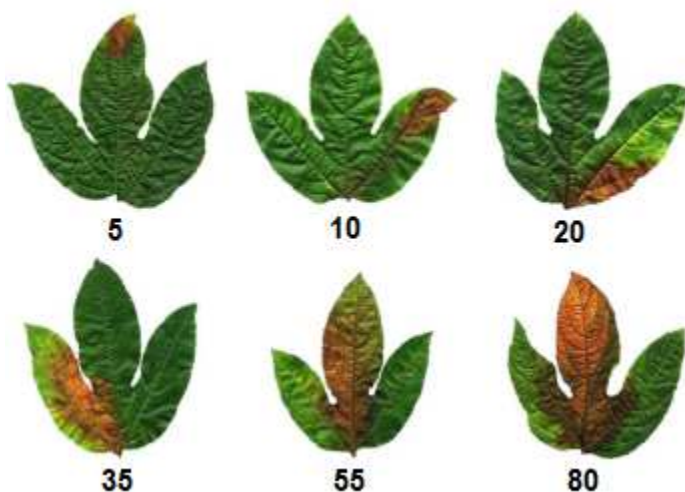


Figura 3. Escala diagramática para quantificação da severidade da bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) do maracujazeiro, indicando níveis de 5, 10, 20, 35, 55 e 80% da área foliar com sintomas da doença (Castillo et al., 2010).

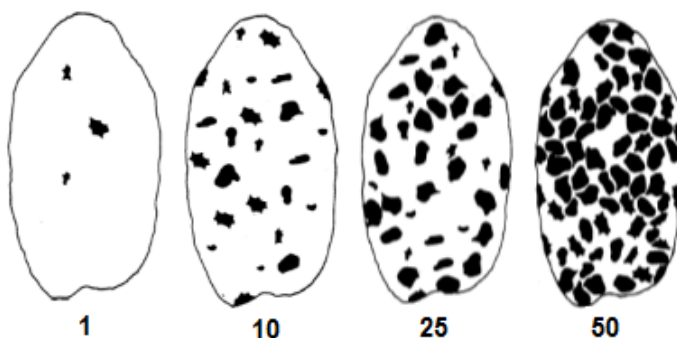


Figura 4. Escala diagramática para quantificação da severidade da sarna comum (*Streptomyces scabies*) da batateira, indicando níveis de 1, 10, 25 e 50% da área do tubérculo com sintomas da doença (James, 1971).



Figura 5. Escala diagramática para quantificação da severidade do crestamento bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) em vagens de feijoeiro comum, indicando níveis de 1, 10, 25 e 50% da área da vagem com sintomas da doença (James, 1971).

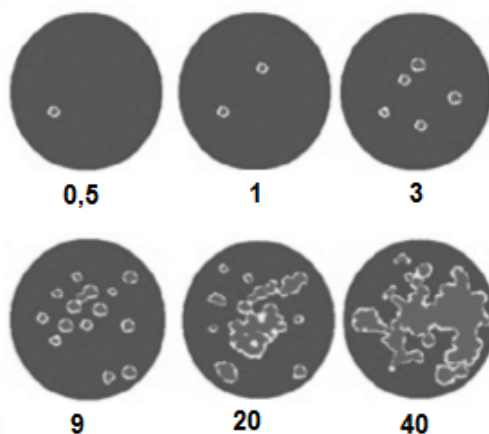


Figura 6. Escala diagramática para quantificação da severidade do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) em frutos de laranjeira, indicando níveis de 0,5, 1, 3, 9, 20 e 40% da área do fruto com sintomas da doença (Braido et al., 2014).

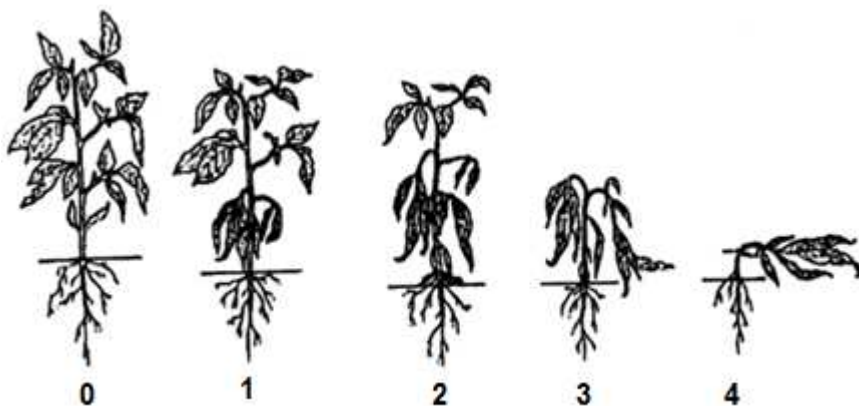


Figura 7. Escala diagramática para quantificação da severidade da murcha bacteriana do tomateiro (*Ralstonia solanacearum*), onde: 0 = ausência de sintomas; 1 = planta com 1/3 das folhas murchas; 2 = planta com 2/3 das folhas murchas; 3 = planta totalmente murcha; 4 = planta morta (Gomes, 1997).

Tabela 5. Exemplos de escalas diagramáticas para quantificação da severidade de fitobacterioses.

Hospedeiro	Órgão	Doença	Patógeno	Referência
Alface	Raiz	Podridão de cortiça	<i>Sphingomonas suberifaciens</i>	O'Brien & van Bruggen (1992)
Alfafa	Caule	Murcha bacteriana	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	Harvey (1982)
Cafeeiro	Folha	Crestamento bacteriano	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	Belan et al. (2014)
Citros	Folha	Cancro cítrico	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Belasque Jr. et al. (2005)
Couve-flor	Folha	Podridão negra	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Cassanello et al. (1989)
Caupi	Folha	Mancha bacteriana	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vignicola</i>	Lima et al. (2013)
Feijoeiro comum	Folha	Crestamento bacteriano	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	James (1971), Díaz et al. (2001)
Laranjeira	Fruto	Cancro cítrico	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Braido et al. (2015)
Milho	Folha	Mancha branca	<i>Pantoea ananatis</i>	Capucho et al. (2010)
Pessegueiro	Folha	Mancha bacteriana	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Citadin et al. (2008)
Repolho	Folha	Podridão negra	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Azevêdo et al. (2000)
Tomateiro	Folha	Mancha bacteriana	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>	Duan et al. (2015)
Tomateiro	Folha	Mancha bacteriana	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Mello et al. (1997)
Trigo	Folha	Estria da folha	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>translucens</i>	Duveiller (1994)

Embora algumas críticas tenham sido feitas com relação à rigidez dos níveis das escalas diagramáticas, seu uso tem sido bem sucedido, principalmente nos trabalhos de levantamento e avaliação do progresso de doenças, bem como na

seleção de materiais resistentes em programas de melhoramento. A utilização de escalas diagramáticas serve, na verdade, como guia para o avaliador que vai determinar a severidade de uma doença e, sempre que possível, o avaliador deve ser treinado previamente (Amorim & Bergamin, 2011).

Caso não haja uma escala diagramática para a quantificação de uma determinada doença de interesse no estudo, a mesma poderá ser elaborada e validada seguindo diferentes métodos. Na elaboração de escalas diagramáticas devem ser considerados alguns aspectos, destacando-se: a) os limites inferiores e superiores da escala devem corresponder à intensidade mínima e máxima de doença observada no campo; b) a determinação da intensidade real de doença no campo deve ter alta precisão; c) o padrão dos sintomas representados na escala deve ser o mais próximo possível dos observados nas plantas; d) os intervalos de severidade da doença devem ser espaçados linearmente (Bock et al., 2010; Nutter & Esker, 2006). Poucas são as escalas diagramáticas publicadas seguindo intervalos lineares, mas a tendência é que elas sejam cada vez mais comuns (Duarte et al., 2014). Até o momento, nenhuma escala diagramática publicada para quantificação da severidade de fitobacterioses seguiu intervalos lineares. Por outro lado, tem sido comum o uso de intervalos predominantemente logarítmicos, como nas escalas diagramáticas para cancro bacteriano da videira (Nascimento et al., 2005), cretamento bacteriano do cafeeiro (Belan et al., 2014) e mancha bacteriana do caupi (Lima et al., 2013). Pelo método de validação é determinado se uma escala diagramática desenvolvida é útil ou não para a obtenção de estimativas de severidade das doenças (Duarte et al., 2014). Detalhes sobre os procedimentos de elaboração e validação de escalas diagramáticas são disponíveis na literatura especializada (Duarte et al., 2014; Madden et al., 2007).

2.2.3. Erros na avaliação da severidade de doenças

Em muitos casos, a severidade da doença estimada por um avaliador pode ser muito diferentes da real e esta diferença entre o valor estimado e o real é o que denominamos de erro de quantificação. Os erros são variáveis em função de características da doença, do avaliador, da planta, bem como da interação entre esses múltiplos fatores (Lopes et al., 2014). Nesse contexto, vários fatores podem afetar a avaliação da severidade de doenças de plantas (Lopes et al., 2014; Souza et al., 2014), com destaque para:

- Número e tamanho das lesões: o número e o tamanho das lesões podem variar de acordo com o patossistema, as condições climáticas e a fenologia da

cultura, dentre outros fatores. Geralmente, maiores erros de estimativa ocorrem quando o órgão possui baixos valores de severidade da doença com muitas lesões pequenas, enquanto as estimativas de severidade de doenças com lesões maiores ou agregadas são menos sujeitas a erros.

- Complexidade de sintomas: alguns sintomas de doenças podem ser confundidos com a senescência natural dos tecidos do hospedeiro, sendo importante que o avaliador conheça bem os sintomas da doença. Outra situação é no caso de manchas foliares que apresentam área clorótica, motivo pelo qual deve estar bem definido o que será avaliado, se somente a área necrosada ou a área necrosada e clorótica.

- Habilidade intrínseca do avaliador: cada avaliador possui uma maior ou menor capacidade de quantificar doenças. O treinamento dos avaliadores, muitas vezes, melhora significativamente a qualidade das estimativas realizadas.

- Tendência nas estimativas: um dos erros mais comuns nas avaliações é a tendência dos avaliadores em superestimar ou subestimar a intensidade da doença, ou ambos.

- Valores preferidos: os valores de severidade mostrados na escala diagramática servem para balizar as estimativas, no entanto, alguns avaliadores tendem a repetir determinados valores durante o procedimento de avaliação da doença.

- Tempo para avaliação da doença: de modo geral, os avaliadores que levam mais tempo para estimar a quantidade de doença tendem a fazer estimativas mais precisas do que avaliadores que levam menos tempo.

- Tipo de folha: em folhas compostas é mais difícil a estimativa da porcentagem de área foliar com sintomas.

- Fadiga e dificuldade de concentração: a qualidade da estimativa é influenciada por estímulos e respostas psicológicas.

Em estudos de campo, os métodos de quantificação da severidade necessitam ser de fácil e rápida utilização para uma ampla gama de condições, mas também adequadamente confiáveis e reproduzíveis, acurados e precisos (Campbell & Madden, 1990). Acurácia refere-se à proximidade de uma estimativa da amostra (por exemplo, média) em relação a um valor real de quantidade de doença avaliada. Portanto, numa avaliação com elevada acurácia os valores da estimativa são muito próximos dos valores reais, havendo baixa tendência de superestimativas ou subestimativas. Precisão refere-se à repetibilidade e reprodutibilidade das estimativas. Repetibilidade refere-se à variabilidade dos valores estimados por cada avaliador em diferentes tempos de avaliação, enquanto reprodutibilidade refere-se à variabilidade dos valores

estimados entre os diferentes avaliadores combinados aos pares (Nutter & Schultz, 1995). Uma analogia aos conceitos de acurácia e precisão na quantificação de doenças de plantas pode ser visualizada quando um arqueiro tem como objetivo colocar todas as flechas no círculo central do alvo (Figura 8). O círculo central corresponde às quantidades reais de doença. Se as flechas são colocadas como na Figura 8.A, o arqueiro é acurado e preciso. Se as flechas são colocadas como na Figura 8.B, o arqueiro é preciso (baixa variabilidade), mas inacurado. Na Figura 8.C, os resultados evidenciam que o arqueiro é inacurado e impreciso, enquanto na Figura 8.D o arqueiro é acurado, mas impreciso.

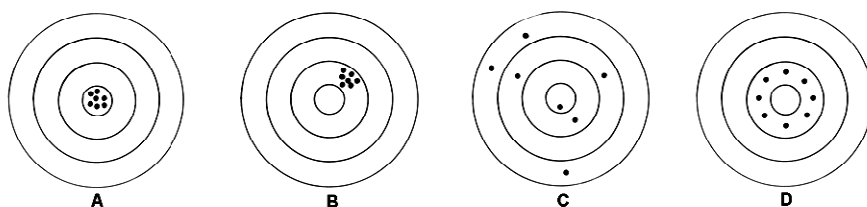


Figura 8. Acurácia e precisão de um arqueiro quando o objetivo é colocar todas as flechas no círculo central. A = acurado e preciso; B = inacurado, mas preciso; C = inacurado e impreciso; D = acurado, mas impreciso (adaptado de Campbell & Madden, 1990).

Os graus de acurácia e precisão necessitam ser obrigatoriamente considerados na escolha de um método de quantificação de doença. O melhor método de estimativa da severidade da doença deve possibilitar ao avaliador obter o máximo de acurácia e precisão em sua quantificação (Figura 8.A). Vários estudos demonstraram que avaliadores, ao utilizarem escalas diagramáticas, variam grandemente em sua habilidade de estimar a severidade de doença com acurácia e precisão. No entanto, na maioria das situações, o uso de escalas diagramáticas propicia reduções significativas nos níveis de erro, com melhorias na acurácia e precisão das estimativas (Del Ponte et al., 2016). Como exemplos de reduções significativas dos erros das estimativas com a utilização de escalas diagramáticas podem ser destacados os constatados nas quantificações da severidade do cancro cítrico em frutos de laranjeira (Braido et al., 2014, 2015), cancro bacteriano da videira (Nascimento et al., 2005), crestamento bacteriano do cafeeiro (Belan et al., 2014), bacteriose do maracujazeiro (Castillo et al., 2010), mancha bacteriana do caupi (Lima et al., 2013), mancha bacteriana do pessegueiro (Citadin et al., 2008), mancha branca do milho (Capucho et al.,

2010) e mancha bacteriana do tomateiro (Duan et al., 2015). Uma ilustração da importância do uso de escala diagramática para a melhoria das estimativas de severidade de doenças é apresentada na Figura 9, que representa os erros (resíduos) dos avaliadores sem e com a utilização da escala diagramática para quantificação da severidade do cancro em folhas de videira. Sem a escala diagramática a maioria dos avaliadores tendeu a superestimar a severidade da doença. As diferenças (resíduos) entre os valores estimados visualmente e os reais obtidos eletronicamente na quantificação da severidade sem a utilização da escala diagramática foram muito elevadas, chegando a atingir 73,8%. Por outro lado, com a utilização da escala os resíduos se concentraram na faixa de 10% e poucas vezes atingiram o valor de 20% (Nascimento et al., 2005).

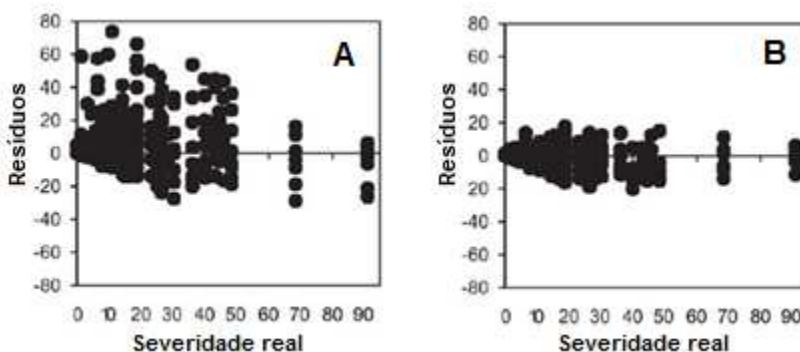


Figura 9. Resíduos (severidade estimada - severidade real) das estimativas do cancro bacteriano da videira realizadas sem o auxílio da escala diagramática (A) e com auxílio da escala diagramática (B). (Nascimento et al., 2005).

2.2.4. Treinamento de avaliadores

Para a maioria dos métodos de quantificação de severidade de doenças baseado no uso de escalas diagramáticas está sujeito a certo grau de subjetividade, o qual pode ser minimizado desde que os avaliadores sejam treinados. Os avaliadores podem ser treinados com diagramas conhecidos, com material recém coletado ou preservado, fotografias, material fotocopiado, com a projeção de imagens, ou com programas de computador especificamente elaborados para o treinamento. Atualmente, o programa de computador mais utilizado no treinamento de avaliadores é o DiseasePro, que usa doenças foliares do amendoim como modelo (Nutter et al., 2015). Um exemplo da importância do

treinamento prévio dos avaliadores pode ser observado na Figura 10, que apresenta os resíduos (severidade estimada - severidade real) das estimativas do cancro cítrico em folhas de laranjeira realizadas com o auxílio da escala diagramática antes (A) e após (B) o treinamento com imagens de folhas doentes com níveis de severidade conhecidos (Belasque Jr. et al., 2005). Os níveis de erros apresentados pelos avaliadores submetidos ao treinamento prévio são muito inferiores aos apresentados pelos avaliadores sem treinamento.

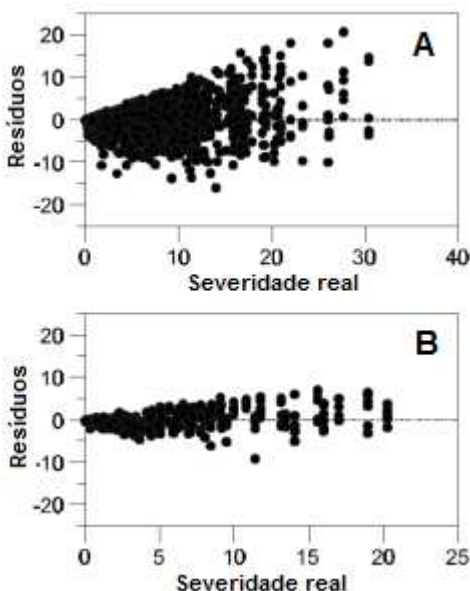


Figura 10. Resíduos (severidade estimada - severidade real) das estimativas do cancro cítrico em folhas de laranjeira realizadas com o auxílio da escala diagramática antes (A) e após (B) o treinamento com imagens de folhas doentes com níveis de severidade conhecidos (Belasque Jr. et al., 2005).

O treinamento é essencial, particularmente se vários avaliadores trabalham conjuntamente em um projeto. Entretanto, apenas o treinamento pode não eliminar todas as fontes de erro, mesmo quando são usadas escalas diagramáticas. Treinamentos específicos, baseados em testes realizados previamente, podem melhorar significativamente o desempenho nas mensurações, desde que os avaliadores sejam orientados quanto aos aspectos particulares a serem corrigidos. Além disso, o efeito benéfico do treinamento de

avaliadores na quantificação de doenças limita-se a um curto período, sendo necessária a realização dessa atividade de forma regular e imediatamente antes de cada avaliação.

2.3. Índices de doença

Em alguns casos, as escalas descritivas ou diagramáticas empregadas na avaliação de certas doenças não são de natureza percentual, já que os graus das escalas são arbitrários e estão indicando uma complexidade crescente dos sintomas em vários órgãos da planta. Para obter o valor integrado de uma parcela ou cultura, pode-se empregar vários índices de doença, que possibilitam a determinação de valores variando de 0 (nenhuma doença) a 100% (nível máximo de doença). Dentre estes, o índice de McKinney (1923) é um dos mais utilizados, sendo calculado pela equação:

$$\text{Índice de Doença (ID)} = \frac{\sum(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{(\text{no. total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})}$$

Exemplo: A severidade da murcha bacteriana do tomateiro foi estimada em cinco parcelas, com 12 plantas cada parcela, com o auxílio de uma escala diagramática de 0 a 4, onde: 0 = ausência de sintomas; 1 = planta com 1/3 das folhas murchas; 2 = planta com 2/3 das folhas murchas; 3 = planta totalmente murcha; 4 = planta morta (Gomes, 1997). Utilizando o índice de doença (ID) de McKinney, quais os níveis de doença nas parcelas?

Parcela	Planta/Severidade												ID (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	2	3	1	1	3	4	4	0	2	4	2	1	56,3
2	3	4	4	3	4	4	4	0	2	1	1	4	70,8
3	4	3	3	3	4	2	0	0	0	0	2	0	43,8
4	3	4	0	0	0	3	3	2	1	0	2	3	43,8
5	0	0	0	0	2	3	2	3	4	2	1	0	35,4

Parcela 1: ID = $[(0 \times 1) + (1 \times 3) + (2 \times 3) + (3 \times 2) + (4 \times 3)] \times 100 / (12 \times 4) = 56,3\%$

Parcela 2: ID = $[(0 \times 1) + (1 \times 2) + (2 \times 1) + (3 \times 2) + (4 \times 6)] \times 100 / (12 \times 4) = 70,8\%$

Parcela 3: ID = $[(0 \times 5) + (1 \times 0) + (2 \times 2) + (3 \times 3) + (4 \times 2)] \times 100 / (12 \times 4) = 43,8\%$

Parcela 4: ID = $[(0 \times 4) + (1 \times 1) + (2 \times 2) + (3 \times 4) + (4 \times 1)] \times 100 / (12 \times 4) = 43,8\%$

Parcela 5: ID = $[(0 \times 5) + (1 \times 1) + (2 \times 3) + (3 \times 2) + (4 \times 1)] \times 100 / (12 \times 4) = 35,4\%$

2.4. Contagem do número de lesões por área

A contagem do número de lesões em uma determinada área da folha (cm^2 , por exemplo), ou unidade de fruto ou tubérculo, pode ser utilizada na quantificação da severidade de algumas fitobacterioses, principalmente quando os tamanhos das lesões são uniformes. Essas contagens podem ser efetuadas diretamente no órgão da planta ou com o auxílio de programas computacionais. No entanto, esse procedimento não tem sido utilizado na quantificação de fitobacterioses em condições de campo.

2.5. Análise de imagens digitais

A precisão da avaliação por análise de imagens digitais é muito elevada e não está sujeita aos problemas inerentes à acuidade visual humana. Há vários programas computacionais capazes de avaliar a severidade de doenças de plantas (Barbedo, 2014; Bock et al., 2010). Dentre estes, o programa Assess 2.0 (The American Phytopathological Society, St. Paul, EUA; Lamari, 2008) é um dos mais utilizados. Com esse programa podem ser obtidas estimativas não subjetivas da quantidade de doenças, mesmo com amostras de folhas compostas ou com bordas recortadas, de frutos e de raízes. As imagens podem ser obtidas por máquinas digitais ou scanners, no primeiro caso possibilitando a amostragem não destrutiva do objeto a ser avaliado, o que constitui uma grande vantagem quando é necessária a quantificação da doença num mesmo objeto em diferentes períodos. Como exemplo, o programa Assess 2.0 foi utilizado para quantificação da severidade da mancha bacteriana em folhas de cajueiro (*Xanthomonas* spp.) (Gama et al., 2011), bem como para quantificação do cancro em folhas de citros (Bock et al., 2009, 2015).

Recentemente, pesquisadores de Fitopatologia dos Estados Unidos (Pethybridge & Nelson, 2015) desenvolveram um aplicativo para iPhone, iPad e iPod, denominado Leaf Doctor (Figura 12), que permite a quantificação da severidade de doenças foliares com elevada acurácia e precisão. Esse aplicativo é disponível no iTunes Store. Até o momento, não existem registros da utilização desse aplicativo na quantificação de fitobacterioses.

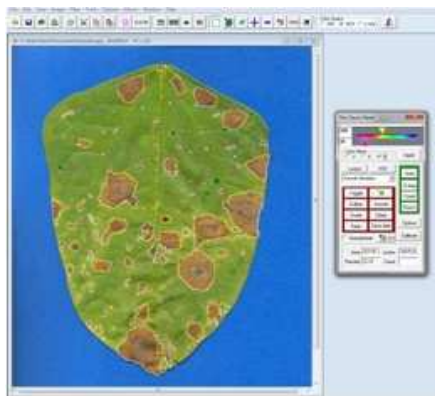


Figura 11. Representação do programa Assess 2.0 para quantificação da severidade de doenças de plantas pela análise de imagens digitais (Lamari, 2008).

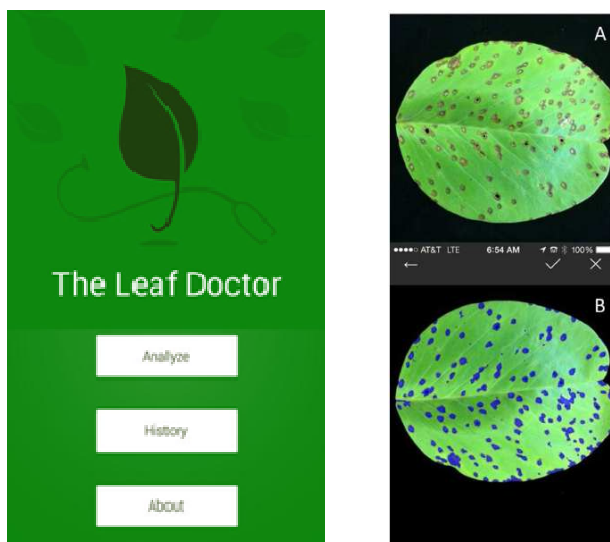


Figura 12. Representação do aplicativo Leaf Doctor, para iPhone, iPad e iPod, desenvolvido por pesquisadores dos Estados Unidos (Pethybridge & Nelson, 2015) para quantificação da severidade de doenças foliares.

2.6. Sensoriamento remoto

Por sensoriamento remoto entende-se um conjunto de técnicas capaz de propiciar informações de um objeto sem que haja contato físico com este objeto (Amorim & Bergamin, 2011). As propriedades radiantes de tecido de plantas sadias diferem daquelas de tecidos de plantas doentes. Em geral, tecidos infectados apresentam menor reflectância na região do infravermelho (comprimento de onda maior que 0,7 μm) quando comparados com tecidos sadios. Assim a avaliação de doenças pode ser realizada com qualquer instrumento capaz de quantificar as diferenças de reflectância desta faixa do espectro (Prabhakar et al., 2012).

As técnicas disponíveis para quantificação de doenças incluem fotografia aérea, onde podem ser utilizados diferentes combinações de filmes, filtros e câmeras, e radiômetros. O uso de filmes coloridos infravermelhos tem fornecido o maior número de resultados promissores na avaliação de doenças por fotografia aérea, embora esta técnica tenha a desvantagem de não ser específica para doenças, uma vez que a reflectância do infravermelho pode ser afetada por outros fatores, como estresse hídrico e maturidade dos tecidos das plantas. A utilização de radiômetros na quantificação de doenças teve início na década de 80, sendo que estudos mais recentes têm utilizado radiômetros portáteis de múltiplo espectro para medir a reflectância das folhagens (Amorim & Bergamin, 2011). Até o momento, não existem registros da utilização de sensoriamento remoto e reflectância por espectro radiômetro na quantificação de fitobacterioses.

3. Métodos indiretos de avaliação de doenças

A avaliação direta de doenças é difícil de ser realizada quando os sintomas observados na planta envolvem apenas redução de vigor, diminuição de produção ou enfezamento. As principais estratégias utilizadas para a quantificação desse tipo de doença são: a) estimativa da população do patógeno, como o número de unidades formadoras de colônias bacterianas em amostras de solo ou vegetais; e b) mensuração de variáveis associadas à doença, como redução do crescimento do hospedeiro e da produção. Nos últimos anos, o uso de PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real (qPCR) tem propiciado grandes avanços na quantificação indireta de fitobacterioses pela especificidade das detecções e precisão das estimativas (Martinelli et al., 2015; Narayanasamy, 2011).

4. Considerações finais

A quantificação de fitobacterioses em condições de campo continua sendo um grande desafio, pois a disponibilidade de métodos padronizados é muito pequena comparada aos métodos disponíveis para doenças fúngicas. Essa deficiência de métodos padronizados de quantificação pode ser decorrente do reduzido número de estudos envolvendo levantamento, epidemiologia e manejo de fitobacterioses em condições de campo. Portanto, com o aumento do número de estudos nessas áreas, a demanda por métodos padronizados se elevará, impulsionando o desenvolvimento da quantificação de fitobacterioses.

5. Bibliografia

- AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 647-671.
- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Fenologia, patometria e quantificação de danos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p. 517-542.
- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; PALAZZO, D. A.; BASSANEZI, R. B.; GODOY, C. V.; TORRES, G. M. Clorose variegada dos citros: uma escala diagramática para avaliação da severidade da doença. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 174-180, 1993.
- AZEVEDO, S. S.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Levantamento da intensidade da podridão negra e da alternariose do repolho no Agreste de Pernambuco e determinação do tamanho da amostra para sua quantificação. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 299-306, 2000.
- BARBEDO, J. G. A. An automatic method to detect and measure leaf disease symptoms using digital image processing. **Plant Disease**, v. 98, p. 1709-1716, 2014.
- BARDSLEY, S. J.; NGUGI, H. K. Reliability and accuracy of visual methods to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. **Plant Pathology**, v. 62, p. 460-474, 2013.
- BELAN, L. L.; POZZA, E. A.; FREITAS, L. L. O.; SOUZA, R. M.; JESUS JUNIOR, W. C.; OLIVEIRA, J. M. Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. **Journal of Phytopathology**, v. 162, p. 801-810, 2014.
- BELASQUE JR., J.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; RIBEIRO, L. M.; JESUS JUNIOR, W. C.; AMORIM, L. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 387-393, 2005.
- BOCK, C. H.; COOK, A. Z.; PARKER, P. E.; GOTTWALD, T. R. Automated image analysis of the severity of foliar citrus canker symptoms. **Plant Disease**, v. 93, p. 660-665, 2009.
- BOCK, C. H.; EL JARROUDI, M.; KOUADIO, L. A.; MACKELS, C.; CHIANG, K.-S.; DELFOSSE, P. Disease severity estimates - effects of rater accuracy and assessment methods for comparing treatments. **Plant Disease**, v. 99, p. 104-1112, 2015.
- BOCK, C. H.; POOLE, G. H.; PARKER, P. E.; GOTTWALD, T. R. 2010. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 29, p. 59-107, 2010.

- BRAIDO, R.; GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; JANEIRO, V.; CARVALHO, S. A.; BELASQUE JR., J.; BOCK, C. H.; NUNES, W. M. C. Development and validation of standard area diagrams as assessment aids for estimating the severity of citrus canker on unripe oranges. **Plant Disease**, v. 98, p. 1543-1550, 2014.
- BRAIDO, R.; GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; NOCCHI, P. T. R.; BELASQUE JR., J.; JANEIRO, V.; BOCK, C. H.; NUNES, W. M. C. A standard area diagram set to aid estimation of the severity of Asiatic citrus canker on ripe sweet orange fruit. **European Journal of Plant Pathology**, v. 141, p. 327-337, 2015.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. Monitoring epidemics: disease. In: CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. p. 107-128.
- CAPUCHO, A. S.; ZAMBOLIM, L.; DUARTE, H. S. S.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, P. A.; LANZA, F. E.; COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; COTA, L. V. Influence of leaf position that correspond to whole plant severity and diagrammatic scale for white spot of corn. **Crop Protection**, v. 29, p. 1015-1020, 2010.
- CASSANELLO, M. E.; FRANCO, J.; MENDOZA, R. Escalas visuales para la evaluación de enfermedades en frutilla y coliflor. **Fitopatología**, v. 25, p. 58-64, 1989.
- CASTILLO, S. Y.; RIVERA, J. F.; HOYOS, L. M. Escala diagramática para evaluar la severidad de la bacteriosis de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims). **Fitopatología Colombiana**, v. 34, p. 41-45, 2010.
- CITADIN, I.; ASSMANN, A. P.; MAZARO, S. M.; GOUVÊA, A.; DANNER, A. M.; MALAGI, G. escala diagramática para avaliação da severidade de bacteriose em pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 327-330, 2008.
- DEL PONTE, E.; PETHYBRIDGE, S. J.; MACHADO, F. J.; MICHEREFF, S. J. Standard area diagrams for aiding disease severity estimation: systematic review and meta-analysis of the gains in precision. **Phytopathology**, 2016. (submetido).
- DÍAZ, C. G.; BASSANEZI, R. B.; BERGAMIM FILHO, A. Desenvolvimento e validação de uma escala diagramática para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 35-39, 2001.
- DUAN, J.; ZHAO, B.; WANG, Y.; YANG, W. Development and validation of a standard area diagram set to aid estimation of bacterial spot severity on tomato leaves. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, p. 665-675, 2015.
- DUARTE, H. S. S.; CAPUCHO, A. S.; LOPES, U. P.; ZAMBOLIM, L. Elaboração e validação de escala diagramática. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JR., W. C.; RODRIGUES, F. A. (Eds.). **O essencial da Fitopatologia: epidemiologia de doenças de plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2014. p. 81-97.
- DUEILLER, E. A pictorial series of disease assessment keys for bacterial leaf streak of cereals. **Plant Disease**, v. 78, p. 137-141, 1994.
- GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, F. M. P.; FERREIRA, M. A. S. V.; SOUZA, E. B. Polyphasic characterization of pigmented strains of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. **Plant Disease**, v. 95, p. 793-802, 2011.
- GOMES, A. M. A. **Identificação de progênies de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) industrial resistentes à *Ralstonia solanacearum* (Smith.) Yabuuchi et al. e progresso da murcha bacteriana**. 1997, 96 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- HARVEY, I. C. Assessment keys for some crown and root diseases of lucerne (*Medicago sativa* L.). **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v. 10, p. 317-322, 1982.

- HORSFALL, J. G.; BARRATT, R. W. An improved grading system for measuring plant disease. **Phytopathology**, v. 35, p. 655, 1945.
- JAMES, W. C. **A manual of assessment keys of plant diseases**. Ottawa: Canada Department of Agriculture, 1971. 74 p. (Canada Department of Agriculture. Publication, 1458).
- KADO, C. I. **Plant Bacteriology**. St. Paul: APS Press, 2010. 336 p.
- KOCKS, C. G.; ZADOKS, J. C.; RUISSSEN, T. A. Response of black rot in cabbage to spatial distribution of inoculum. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 713-723, 1998.
- LAMARI, L. **Assess 2.0**: image analysis software for plant disease quantification. St. Paul: APS Press, 2008. 125 p.
- LIMA, H. E.; NECHET, K. L.; VIEIRA, B. A. H.; OLIVEIRA, J. R.; DUARTE, H. S. S.; QUEIROZ, E. S.; OLIVEIRA, F. L. Elaboração e validação de escalas diagramáticas para avaliação da severidade da mancha-bacteriana do feijão-caupi em cultivares com trifólios morfológicamente distintos. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1735-1743, 2013.
- LOPES, U. P.; DUARTE, H. S. S.; CAPUCHO, A. S.; ZAMBOLIM, L. Quantificação de doenças de plantas. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JR., W. C.; RODRIGUES, F. A. (Eds.). **O essencial da Fitopatologia: epidemiologia de doenças de plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2014. p. 49-77.
- MADDEN, L. V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. Measuring plant diseases. In: MADDEN, L. V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. **The study of plant disease epidemics**. St. Paul: APS Press, 2007. p. 11-31.
- MARTINELLI, F.; SCALENGHE, R.; DAVINO, S.; PANNO, S.; SCUDERI, G.; RUISI, P.; VILLA, P.; STROPPIANA, D.; BOSCHETTI, M.; GOULART, L. R.; DAVIS, C. E.; DANDEKAR, A. M. Advanced methods of plant disease detection: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, p. 1-25, 2015.
- MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, p. 195-218, 1923.
- MELLO, S. C. M.; TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 447-448, 1997.
- MIKICIŃSKI, A.; SOBICZEWSKI, P.; PUŁAWSKAJ.; MACIOROWSKI, R. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) by a novel strain 49M of *Pseudomonas graminis* from the phyllosphere of apple (*Malus* spp.). **European Journal of Plant Pathology**, v. 145, p. 265-276, 2016.
- NARAYANASAMY, P. **Microbial plant pathogens - detection and disease diagnosis: bacterial and phytoplasmal pathogens**. Dordrecht: Springer, 2011. 265 p.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; GOMES, A. M. A. Elaboração e validação de escala diagramática para cancro bacteriano da videira. **Summa Phytopathologica**, v. 31, p. 59-64, 2005.
- NUTTER JR., F. W.; EGGENBERGER, S. K.; STREIT, A. J. Disease severity training using DiseasePro. STEVENSON, K. L.; JEGER, M. J. (Eds.). **Exercises in plant disease epidemiology**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 2015. p. 189-195.
- NUTTER JR., F. W.; ESKER, P. D. The role of psychophysics in phytopathology: the Weber-Fechner law revisited. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, p. 199-213, 2006.
- NUTTER JR., F. W.; SCHULTZ, P. M. Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 17, p. 174-184, 1995.
- NUTTER JR., F. W.; TENG, P. S.; SHOKES, F. M. Disease assessment terms and concepts. **Plant Disease**, v. 75, p. 1187-1188, 1991.

- O'BRIEN, R. D.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Accuracy, precision, and correlation to yield of disease severity scales for corky root of lettuce. **Phytopathology**, v. 82, p. 91-96, 1992.
- PETHYBRIDGE, S. J.; NELSON, S. C. Leaf Doctor: a new portable application for quantifying plant disease severity. **Plant Disease**, v. 99, p. 1310-1316, 2015.
- PRABHAKAR, M.; PRASAD, Y. G.; RAO, M. N. Remote sensing of biotic stress in crop plants and its applications for pest management. In: VENKATESWARLU, B.; SHANKER, A. K.; SHANKER, C.; MAHESWARI, M. (Eds.). **Crop stress and its management: perspectives and strategies**. Dordrecht: Springer, 2012. p. 517-545.
- SAKUMA, F.; MAEDA, M.; TAKAHASHI, M.; HASHIZUME, K.; KONDO, N. Suppression of common scab of potato caused by *Streptomyces turgidiscabies* using lopsided oat green manure. **Plant Disease**, v. 95, p. 1124-1130, 2011.
- SILVA, A. M. F.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; SILVEIRA, E. B.; MEDEIROS, F. H. Levantamento da intensidade da podridão-mole em alface e couve-chinesa em Pernambuco. **Revista Caatinga**, v. 20, p. 134-139, 2007.
- SILVA, V. A. V.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Levantamento da intensidade da mancha-aquosa do meloeiro em Juazeiro, Bahia. **Revista Caatinga**, v. 18, p. 41-46, 2005.
- SOUZA, A. F.; JESUS JUNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. Epidemiologia de doenças de plantas: conceitos gerais. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JR., W. C.; RODRIGUES, F. A. (Eds.). **O essencial da Fitopatologia: epidemiologia de doenças de plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2014. p. 3-31.
- TAVARES, L. A.; MICHEREFF, S. J.; SOUZA, R. M.; MARIANO, R. L. R. Plano de amostragem para quantificação da murcha bacteriana do tomateiro no campo. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 306-310, 2000.

Amostragem de Fitobacterioses

Tamiris Joana dos Santos Rêgo

Kamila Câmara Correia

Sami Jorge Michereff

1. Introdução

O manejo de doenças de plantas se baseia no conhecimento epidemiológico, iniciando, em geral, com levantamentos nas áreas de produção. Levantamentos fitopatológicos têm como objetivos fornecer informações sobre a importância relativa das doenças, monitorar as flutuações em intensidade destas ao longo da estação de cultivo e dos anos, e verificar a eficácia e a aceitação das medidas de controle recomendadas (Campbell & Madden, 1990; Holderness, 2002; Madden et al., 2007). No entanto, para que os dados obtidos nos levantamentos sejam confiáveis, há necessidade da padronização nos métodos de amostragem das plantas no campo e na quantificação da doença (Campbell & Madden, 1990; Holderness, 2002). Aspectos relacionados à quantificação de fitobacterioses foram abordados no capítulo anterior (Silva & Michereff, 2016), enquanto nesse capítulo serão abordados aspectos gerais sobre amostragem de doenças de plantas e suas aplicações envolvendo fitobacterioses.

2. Amostra e amostragem

Uma amostra é uma coleção de n -unidades que possuem em comum um ou mais atributos mensuráveis e se obtém com o propósito de estimar os parâmetros da população N sobre a qual foi retirada a referida amostra. Uma população pode ser definida como a totalidade do universo de n -unidades com determinado atributo presente em determinado tempo e espaço. Estas duas dimensões, tempo

e espaço, conferem às populações um caráter dinâmico, sendo a razão para considerar a variabilidade do tamanho ótimo da amostra. Uma população tem pelo menos um atributo mensurável com dois parâmetros estatísticos associados: uma média μ e uma variância σ^2 . Portanto, se um subconjunto de unidades da população é extraído com um critério estatístico definido, então é possível estimar a μ e a σ^2 com certo grau de precisão e exatidão. Pode-se afirmar que este subconjunto, a amostra, é suficiente para caracterizar a população em relação a um atributo específico. Os estimadores de μ e σ^2 são denominados média e variância da amostra, porém são representados como $\bar{X}$ e S^2 , respectivamente. Por essa razão se considera que a média e a variância constituem a base da amostragem (Cochran, 1977).

A necessidade da realização de inferência a partir de uma amostra é importante, pois raramente há recursos financeiros e humanos suficientes para a realização de um censo completo do estado fitopatológico de um conjunto de plantas de interesse em um campo ou em todos os campos de uma região (Campbell & Madden, 1990; Holderness, 2002; Madden et al., 2007; Parnell et al., 2011). A amostragem constitui uma das mais importantes atividades no estudo de epidemias de doenças de plantas e permite a obtenção de estimativas representativas das características da epidemia a um custo reduzido, com a maior exatidão e precisão possível (Campbell & Madden, 1990; Madden & Hughes, 1999; Madden et al., 2007). Por isso, o objetivo principal da amostragem para avaliações de doenças de plantas é obter um número mínimo de indivíduos que represente as características da epidemia de uma população determinada, com um custo razoável (Neher & Campbell, 1997). Além de reduzir os custos, a amostragem propicia economia no tempo de realização das atividades, permitindo a execução de levantamentos em mais áreas. Outro aspecto a considerar é que a amostragem de pequenas partes da população pode propiciar valores mais confiáveis devido ao trabalho e ao volume de avaliações serem reduzidos (Cochran, 1977).

O desenvolvimento de um plano de amostragem requer o conhecimento minucioso do patossistema a ser amostrado, um claro conceito de como os dados obtidos serão avaliados e uma mensuração realista do tempo e/ou dos recursos financeiros disponíveis. Um plano de amostragem deve representar um acordo entre o que é biologicamente e estatisticamente razoável. Nesse sentido, para sucesso com um plano de amostragem é requerido que (Campbell & Duthie, 1989):

- Os objetivos sejam definidos de forma clara e concisa.

- A unidade amostral seja claramente definida e a população amostral seja razoável sob o ponto de vista biológico.
- O método de amostragem permita a obtenção de estimativas de níveis de doença que são exatos, precisos e reproduzíveis para toda a população.
- A amostragem seja efetuada eficientemente dentro de custo e tempo determinados.

Um plano de amostragem é constituído de três etapas essenciais (Kranz, 1993):

- a) Definição do método de amostragem.
- b) Determinação do tamanho ideal da amostra.
- c) Execução da amostragem.

3. Métodos de amostragem

Muitos métodos de amostragem têm sido desenvolvidos e podem ser aplicados no estudo de epidemias de doenças de plantas, com destaque para (Campbell & Madden, 1990; Kranz, 1993):

- Amostragem aleatória simples
- Amostragem sistemática
- Amostragem estratificada
- Amostragem multi-estágio
- Amostragem sequencial

3.1. Amostragem aleatória simples

Amostragem aleatória simples é um método de seleção de n unidades sem reposição da população N , uma vez que cada uma das unidades tem igual chance de ser amostrada (Cochran, 1977). Como exemplo, as unidades na população são numeradas de 1 a N e uma série de números aleatórios entre 1 a N é depois tirada de uma tabela de números aleatórios ou determinada com um gerador de números aleatórios de um programa de computador. As unidades retiradas do total de n unidades constituirão a amostra. Raramente tem sido utilizada em trabalhos de amostragem de doenças de plantas, tendo em vista que a casualização requer o prévio conhecimento do número de plantas por unidade de área e seu padrão de espaçamento. Devido à distribuição das doenças não ser normalmente uniforme, amostragem aleatória pode ter pouca eficácia e não ser

representativa. Amostragem aleatória não deve ser confundida com amostragem arbitrária. Na amostragem aleatória cada unidade amostral tem igual probabilidade de ser selecionada. No entanto, se o avaliador caminha na linha de plantio de um campo, para e seleciona uma planta a ser avaliada, isto é amostragem arbitrária. Esse tipo de amostragem pode ser apropriado em algumas situações, mas constitui uma amostragem arbitrária e não deve ser erroneamente denominada de amostragem aleatória (Campbell & Madden, 1990).

3.2. Amostragem sistemática

Amostragem sistemática é comumente usada em estudos envolvendo doenças de plantas, pois é de fácil execução, propicia resultados suficientemente acurados e precisos, e normalmente é menos trabalhosa que amostragem aleatória (Campbell & Madden, 1990; Kranz, 1993). Na amostragem sistemática, se existem N unidades na população, depois de definidas n unidades a serem amostradas, é tomada aleatoriamente uma unidade das primeiras h unidades, e amostrada cada h_{th} unidade depois dessa (Cochran, 1977). Na prática, essa amostragem é realizada pela adoção de um padrão de caminamento e tomada das unidades amostrais a distâncias pré-fixadas ao longo do caminho. Por exemplo, se o comprimento do campo é de 500 metros e o tamanho da amostra é de 25, a planta após 20 metros do início do campo será a próxima unidade amostral (Kranz, 1993).

Como muitas doenças de plantas e patógenos têm um padrão espacial agregado, a amostragem aleatória é realizada com a adoção de um padrão de caminamento apropriado, como diagonal, diagonal cruzada, diagonal paralela, forma de W, zigzague, diamante, perímetro, forma de M, aleatória e retangular (Figura 1) (Been & Schomaker, 2006; Campbell & Madden, 1990; Kranz, 1988, 1993). A adequação do padrão é testada pela comparação da precisão e acurácia das estimativas obtidas por vários padrões de amostragem-piloto. Simulação por computador pode ser usada para a comparação da precisão e acurácia das estimativas. Embora não exista um padrão específico de amostragem adequado a todas as situações, os padrões em forma de W e diamante têm sido adequados para muitas situações em que os propágulos e/ou a doença são agregados (Campbell & Madden, 1990).

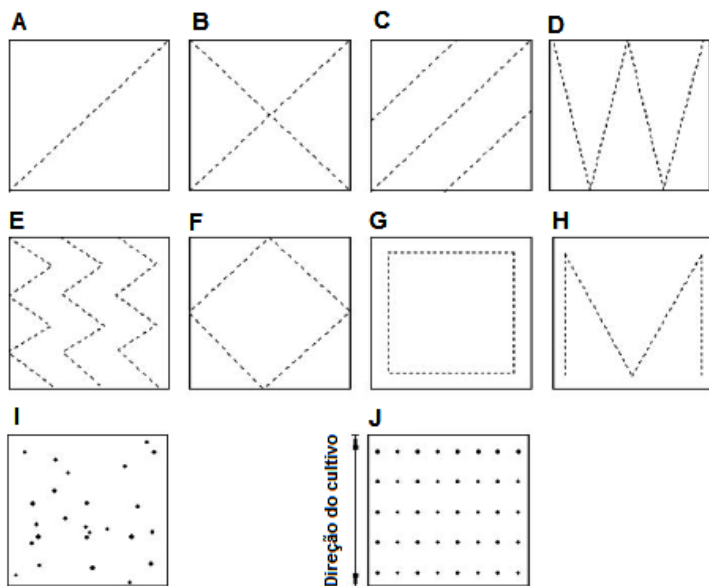


Figura 1. Diferentes padrões de amostragem de plantas em um campo. A, diagonal; B, diagonal cruzada; C, diagonal paralela; D, forma de “W”; E, ziguezague; F, diamante; G, perímetro; H, forma de “M”; I, aleatório; J, grade retangular (adaptado de Been & Schomaker, 2006).

Em algumas situações é impossível a realização da amostragem por um padrão pré-determinado, como diagonal ou forma de W, devido ao crescimento do hospedeiro que impossibilita a passagem dentro das linhas de plantio. Nessas situações, a amostragem sistemática pode ser realizada pela seleção aleatória do número de linhas de plantio e da seleção das plantas a serem avaliadas dentro da linha de plantio por um critério sistemático em função do comprimento das linhas. Por exemplo, se a linha de plantio tem 500 metros e precisam ser avaliadas 10 plantas na linha, as plantas para avaliação serão selecionadas a cada 50 metros de distância.

3.3. Amostragem estratificada

Na amostragem estratificada, a população de N unidades é primeiro dividida em subpopulações de $N_1, N_2, N_3, \dots, N_L$ unidades, respectivamente (Cochran, 1977). Essas populações não sobrepostas são chamadas de estratos. Na prática, esses estratos podem ser partes de um campo, níveis verticais da copa de uma

planta, partes de uma planta, tipos de solo ou profundidade de um solo (Campbell & Madden, 1990). Após os estratos terem sido estabelecidos, amostras aleatórias ou sistemáticas são tomadas dentro de cada extrato para um total de n amostras (Cochran, 1977). Esse procedimento pode propiciar a adequada representação de subdivisões existentes na população se a informação sobre isso é disponível previamente ao levantamento (ex. de amostragem-piloto). Estratificação permite somente estimativas de erros amostrais dentro do estrato. Se isto é requerido, pelo menos duas unidades por estrato ou a maioria do estrato pode ser selecionada. A população pode ser estratificada para duas ou mais características (múltipla estratificação) (Kranz, 1993).

3.4. Amostragem multi-estágio

Na amostragem multi-estágio existem unidades amostrais, mas alguns tipos de subunidades também são interessantes, e em alguns casos também subsubunidades são amostradas. Esse pode ser o caso em que uma parcela é a unidade amostral, plantas inteiras dentro da parcela são as subunidades e as folhas nas plantas são as subsubunidades (Campbell & Madden, 1990). O método de amostragem pode ser o mesmo ou diferente em cada estágio. Na prática, amostragem multi-estágio pode ser usada com planos de amostragem aleatória, sistemática ou estratificada. Amostragem multi-estágio introduz maior flexibilidade, permitindo a seleção de subdivisões naturais como unidades amostrais e a otimização do tamanho da amostra, mas é menos acurado que os métodos com um estágio. Amostragem multi-estágio é particularmente valorosa em levantamentos em áreas menos desenvolvidas onde somente a estrutura para o primeiro estágio necessita ser construída no início do levantamento (Kranz, 1993).

3.5. Amostragem sequencial

A amostragem sequencial é um método para facilitar a decisão sobre tratar ou não tratar, sendo mais adaptado a doenças quantificadas pela incidência. O racional para amostragem sequencial é obter uma decisão sim ou não, isto é, controle justificado, não justificado, a baixo custo e com o menor risco de tomar uma decisão errada.

Para o desenvolvimento de um plano de amostragem sequencial, certas informações básicas são necessárias: a) o arranjo espacial da doença é uniforme, aleatória ou agregada; b) uma estimativa da perda econômica ou limiar de dano econômico; c) probabilidades têm que ser associadas a dois erros: alfa, para

quando dizemos que a incidência é baixa e na realidade é alta, e beta, para quando dizemos que a incidência é alta e na realidade é baixa. Com esses três requisitos um plano de amostragem sequencial pode ser desenvolvido baseado na hipótese alternativa H_1 (para a incidência causando baixas perdas ou danos) e H_2 (a incidência causando elevadas perdas ou danos). Amostras consecutivas são tomadas e o número de 1 (para infectada/infestada) ou 0 (para não infectada/infestada) são acumuladas até o limite máximo ou mínimo (que são pré-determinados a um grau de probabilidade para alfa e beta) ser atingido. A decisão para o tratamento pode ser baseada no limite superior ou nenhum tratamento pelo limite inferior (Kranz, 1993).

4. Tamanho da amostra

O tamanho da amostra em um experimento ou levantamento de campo normalmente determina a qualidade ou a confiabilidade dos dados de quantificação da doença obtidos e o custo da iniciativa. Poucas amostras poderão resultar em dados não confiáveis e não representativos, enquanto muitas amostras poderão oferecer dados de melhor qualidade, mas desperdiçar recursos valiosos. Consequentemente, o objetivo da amostragem é alocar os recursos sabiamente e, ao mesmo tempo, determinar o número de amostras que pode ser tomado para atingir um determinado nível de confiabilidade e precisão (Campbell & Madden, 1990).

Todos os métodos utilizados na determinação do tamanho de amostras se baseiam em amostragens-piloto, que consistem na avaliação da intensidade da doença numa pequena parcela da população, normalmente entre 30 e 100 plantas. Preferencialmente, devem ser efetuadas amostragens-piloto em cultivos em diferentes estádios fenológicos e níveis de intensidade da doença (Campbell & Madden, 1990). Outro aspecto importante a considerar, é que o tamanho da amostra para quantificação da doença necessita ser dinâmico, uma vez que pode variar com o progresso da doença (Duthie et al., 1991; Kranz, 1988) e com as mudanças do padrão espacial de plantas doentes no campo durante o desenvolvimento da epidemia (Campbell & Duthie, 1989; Jeger, 1990).

4.1. Arranjo espacial de doenças de plantas

Considerando que a confiabilidade da estimativa de uma doença é relacionada diretamente ao tamanho da amostra e à sua heterogeneidade espacial, os métodos de determinação do tamanho da amostra podem estar associados a distribuições, que representam diferentes padrões espaciais da doença no campo

(Perry, 1994). Nesse contexto, o conhecimento do arranjo espacial das plantas doentes é um pré-requisito para a determinação do tamanho da amostra (Kranz, 1993; Madden et al., 2007).

Em doenças de plantas, o padrão espacial é definido como o arranjo ou posicionamento das plantas doentes, umas em relação às outras, podendo apresentar três classificações: aleatório, agregado e uniforme (Figura 2). No padrão uniforme a variância é menor do que a média ($S^2 < \bar{X}$), indicando subdispersão; no padrão aleatório, a variância e a média são iguais ($S^2 = \bar{X}$), indicando dispersão ou distribuição independente ou aleatória das plantas doentes; no padrão agregado, a variância é maior do que a média ($S^2 > \bar{X}$), indicando superdispersão (Campbell & Madden, 1990; Kranz, 1993; Madden et al., 2007). O arranjo espacial das plantas doentes é resultado de múltiplas e complexas interações entre os processos de dispersão e fatores ambientais (Madden et al., 2007). O padrão aleatório em doenças cujos patógenos são veiculados pelo ar significa que a probabilidade de um esporo cair sobre uma planta hospedeira é igual para todas as plantas hospedeiras. Padrão espacial aleatório está intimamente relacionado a iguais oportunidades de infecção. Portanto, a ocorrência da doença não é influenciada pela distância da fonte de inóculo, seja a fonte localizada na mesma planta ou na vizinhança próxima. Por outro lado, se o patógeno for disperso apenas a curtas distâncias (por respingos de chuva, por exemplo), a probabilidade de uma planta ser infectada é maior para aquelas plantas situadas próximas à fonte de inóculo do que para aquelas situadas longe da fonte de inóculo. Nesse caso, o padrão espacial será agregado, com focos visíveis ao redor das fontes primárias de inóculo. O arranjo espacial uniforme ou regular é pouco frequente em condições naturais de infecção (Jeger, 1990).

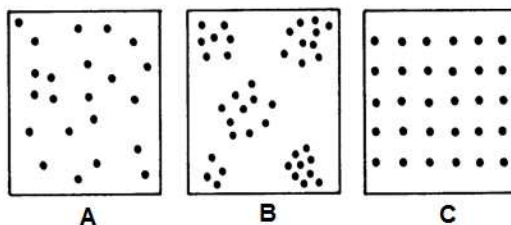


Figura 2. Arranjos espaciais de plantas doentes numa parcela: aleatório (A), agregado (B) e regular (C). Cada ponto representa uma planta doente.

Vários métodos podem ser utilizados para determinar o arranjo espacial de plantas doentes, com destaque para análise de doublets, análise de sequências ordinárias, mapeamento, ajuste a distribuições discretas, índices de dispersão, variância em quadriláteros, análise de autocorrelação espacial, análises baseadas em distância e geoprocessamento (Campbell & Madden, 1990).

A análise do padrão espacial da doença deve ser realizada e inferências sobre esse aspecto podem ser determinadas a partir dos dados das amostragens-piloto (Parnell et al., 2011). O método baseado em índices de dispersão é o mais utilizado em estudos envolvendo amostragem de doenças de plantas com a utilização de dados das amostragens-piloto. Dentre estes, o índice de agregação de Loyd (LIP) pode ser utilizado para indicar o grau de agregação relativa, sendo calculado como:

$$LIP = [(\bar{X} + (S^2 / \bar{X}) - 1)]\bar{X} \quad \text{Equação 1}$$

em que $\bar{X}$ é a intensidade média da doença (incidência ou severidade) nas plantas submetidas à amostragem-piloto e S^2 é a variância da amostra. Valores de LIP menor, igual ou maior que 1 indica padrão espacial regular, aleatório e agregado, respectivamente (Campbell & Madden, 1990). A significância ($P=0,05$) dos valores pode ser testada usando o teste de qui-quadrado (χ^2) com $(n-1)$ graus de liberdade (Silva et al., 2008).

4.2. Determinação do tamanho da amostra

A acurácia e a precisão das estimativas de uma população são, em geral, diretamente proporcionais ao número de unidades n em uma amostra, ou seja, o tamanho da amostra, motivo pelo qual determinar o número ótimo das n -unidades resulta em um dos aspectos analíticos fundamentais da amostragem (Cochran, 1977).

Os dados obtidos nas amostragens-piloto são utilizados nas análises de tamanho de amostras. Há pelo menos três métodos para estimar tamanho de amostra, os quais dependem da definição operacional da confiabilidade e dos custos impostos na coleta das amostras (Campbell & Duthie, 1989; Campbell & Madden, 1990):

- a) Confiabilidade é definida pelo coeficiente de variação da média ou erro padrão.
- b) Confiabilidade é definida por equações de probabilidade.

- c) Componentes da variância e funções de custo são usados para otimizar o número de amostras, considerando que cada tipo de amostra tem um custo associado.

4.2.1. Análises baseadas no coeficiente de variação da média

As análises baseadas no coeficiente de variação da média podem ser realizadas pelos métodos gráfico, e especificando a confiabilidade associada a distribuições (Campbell & Madden, 1990).

4.2.1.1. Método gráfico

O coeficiente de variação da média ($CV_{\bar{x}}$) é utilizado como um indicador gráfico para determinar o tamanho da amostra (n). A média ($\bar{x}$) e a variância (S^2), calculadas para amostras incrementando em tamanho, devem ser utilizadas para obter o coeficiente de variação da média pela equação:

$$CV_{\bar{x}} = \frac{S_x}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

em que S_x (erro padrão da média) é obtido pela fórmula:

$$S_x = \sqrt{\frac{S^2}{n}} \quad \text{Equação 3}$$

Os valores obtidos para os coeficientes de variação da média são plotados contra números crescentes de amostras, sendo o tamanho ideal indicado pelo ponto em que a curva tende à estabilização.

4.2.1.2. Método especificando a confiabilidade

O tamanho da amostra (n) é estimado para uma confiabilidade pré-estabelecida (Por ex., 5 e 10%), determinada pelo coeficiente de variação da média ($CV_x = 0,05$ e $0,1$), utilizando-se a equação:

$$n = \frac{S^2}{\bar{x}^2 \cdot CV_{\bar{x}}^2} \quad \text{Equação 4}$$

A escolha do nível de erro aceitável (confiabilidade pré-estabelecida) a ser utilizado depende do propósito da amostragem (Cochran, 1977; Kranz, 1988). Assim, em levantamentos de campo, um nível de até 10% de erro é considerado normal, enquanto que em estudos mais precisos utilizam-se níveis de 5% ou 3% (Southwood, 1978).

4.2.1.3. Método especificando a confiabilidade associada a distribuições

Numa aplicação mais sofisticada do método acima, as distribuições de Poisson e binomial negativa, que representam respectivamente casos de arranjo espacial aleatório e agregado de plantas doentes, são introduzidas no cálculo do número de amostras. Considerando a distribuição de Poisson, em que $x = S^2$, o tamanho da amostra (n) é calculado como:

$$n = \frac{1}{\bar{x} \cdot CV_{\bar{x}}^2} \quad \text{Equação 5}$$

Para a distribuição binomial negativa, em que $S^2 = \bar{x} + (\bar{x}^2/k)$, cujo parâmetro k pode ser estimado das estimativas de variância e média da amostra como que $k = \bar{x}^2 / (S^2 - \bar{x})$, o tamanho da amostra (n) é calculado como:

$$n = \frac{k + \bar{x}}{\bar{x} \cdot k \cdot CV_{\bar{x}}^2} \quad \text{Equação 6}$$

4.2.2. Análises baseadas em equações de probabilidade

As análises baseadas em equações de probabilidade podem ser realizadas pelos métodos fixando probabilidades e fixando probabilidades associadas a distribuições (Campbell & Madden, 1990).

4.2.2.1. Método fixando probabilidades

O tamanho da amostra (n) é estabelecido para obter uma estimativa em torno da média da população (Por ex., 5 e 10%; ou seja, $D = 0,05$ e $0,1$), a níveis de probabilidade estabelecidos (Por ex., 5 e 10%; ou seja, $P = 0,05$ e $0,1$), utilizando a fórmula:

$$n = \frac{S^2 \cdot Z_{p/2}^2}{D^2 \cdot \bar{x}^2} \quad \text{Equação 7}$$

em que $Z_{p/2}$ é o valor tabelado de Z da distribuição normal padrão, considerando $P/2$ e os graus de liberdade $(n-1)$ da amostra. Para $P = 0,05$; $Z_{\text{tabelado}} = 1,96$ e para $P = 0,1$; $Z_{\text{tabelado}} = 1,64$.

4.2.2.2. Método fixando probabilidades associadas a distribuições

Numa aplicação mais sofisticada do método acima, o tamanho da amostra (n) é estimado conforme as distribuições especificadas previamente. Considerando a distribuição de Poisson, o número de amostras é calculado como:

$$n = \frac{Z_{p/2}^2}{D^2 \cdot \bar{x}} \quad \text{Equação 8}$$

Enquanto para a distribuição binomial negativa, o número de amostras é calculado como:

$$n = \frac{(k + \bar{x}) \cdot Z_{p/2}^2}{D^2 \cdot k \cdot \bar{x}} \quad \text{Equação 9}$$

4.2.3. Análise baseada na variância e no custo

Esse método de análise utiliza os dados gerados por amostragem multi-estágio. O procedimento é baseado, em parte, na análise de variância aninhada com efeitos aleatórios. Se estimativas da variância e custo associado com cada unidade e subunidade são disponíveis ou podem ser calculadas, depois o tamanho ótimo da amostra pode ser calculado (Campbell & Madden, 1990).

Numa amostragem em dois estágios (ex. ramos e folhas), a variância total da média [$V(\bar{x})$] pode ser calculada como:

$$V(\bar{x}) = \frac{\sigma_u^2}{n_u} + \frac{\sigma_e^2}{n_u n_s} \quad \text{Equação 10}$$

onde σ_u^2 é a variância entre as unidades (= ramos) com n_u unidades e σ_e^2 é a variância entre os elementos (= folhas) dentro de unidades com n_s elementos. Neste caso, $\bar{x}$ representa a média geral da amostra (ramos x folhas).

Para cada nível de amostragem existe um custo associado para obtenção e avaliação do material. Custo pode ser mensurado em diferentes unidades como dinheiro ou tempo. A função de custo para amostragem em dois estágios pode ser escrita como:

$$C_T = c_u n_u + c_e n_u n_s \quad \text{Equação 11}$$

em que c_u , c_e e C_T são os custos por unidade (ramo), por elemento (folha) e

custo total, respectivamente.

O número ótimo de elementos ($n_{s(opt)}$), por ex. folhas, como função dos componentes de variância e função de custo pode ser calculado como:

$$n_{s(opt)} = \left(\frac{\sigma_e}{\sigma_u} \right) \sqrt{\frac{c_u}{c_e}} \quad \text{Equação 12}$$

O número ótimo de unidades ($n_{u(opt)}$), por ex. ramos, pode ser calculado como:

$$n_{u(opt)} = \left(\frac{1}{V(\bar{x})} \right) \left(\sigma_u^2 + \frac{\sigma_e^2}{n_{s(opt)}} \right) \quad \text{Equação 13}$$

Outros métodos passíveis de serem utilizados na determinação dos tamanhos ideais das amostras para quantificação de doenças de plantas, como amostragem binomial, amostragem inversa e amostragem sequencial, são apresentados por Madden et al. (2007).

5. Execução da amostragem

Nessa fase, o plano de amostragem precisa ser minuciosamente detalhado, com a definição de aspectos relevantes como:

- a) Unidade amostral: folha bandeira, folhas basais, ramos, frutos, etc.
- b) Método de amostragem: sistemático, estratificado, multi-estágio, etc.
- c) Tamanho da amostra: número de campos, parcelas, subparcelas, quadriláteros, plantas, folhas, ramos, etc.
- d) Tecnologia de amostragem: unidade amostral fixada ou removida; escalas diagramáticas ou descritivas, etc.
- e) Datas de amostragem: se apropriado, relacionado ao estágio do hospedeiro, eventos climáticos, etc.
- f) Procedimento de amostragem: o que fazer com amostras, para onde enviar, etc.

Uma vez aprovado, esse plano de amostragem precisa ser observado por todos os participantes do levantamento, bem como a logística para o processamento dos dados e a supervisão do trabalho precisa ser assegurada nesse estágio.

6. Amostragem de fitobacterioses tropicais: resultados de pesquisas

Estudos envolvendo o desenvolvimento de planos de amostragem para quantificação de doenças de plantas são escassos e a maioria envolve amostragem de doenças fúngicas. Em seguida, serão apresentados os resultados obtidos em algumas pesquisas de desenvolvimento de planos de amostragem para quantificação de fitobacterioses tropicais.

6.1. Podridão negra em repolho

O repolho é uma olerícola folhosa de grande expressão econômica para a região Agreste do estado de Pernambuco, onde sua produção é reduzida devido a ocorrência de doenças, destacando-se a podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Como não existiam estudos sobre o tamanho ideal das amostras para quantificação da severidade da doença em levantamentos de campo, um dos objetivos do trabalho foi determinar o tamanho ideal das amostras para quantificação da podridão negra em repolho na região Agreste do estado de Pernambuco (Azevêdo et al., 2000). Foram conduzidos levantamentos da severidade da podridão negra em 39 plantios comerciais de repolho na região, em dois anos de cultivo. Em cada área, utilizando amostragem sistemática com padrão de caminhamento em diagonal cruzada, 15 sulcos de plantio com 8 plantas/sulco foram selecionados aleatoriamente em cada diagonal. A severidade foi determinada em 5 folhas basais por planta, pela porcentagem de área foliar lesionada, com o auxílio de escala diagramática apresentando níveis de 0 a 32% de severidade da podridão negra. Os dados de severidade obtidos nos levantamentos foram utilizados como amostragens-piloto e os tamanhos ideais das amostras foram estimados para cada área, considerando extratos de 4, 6 e 8 plantas por sulco, pela análise baseada no coeficiente de variação da média especificando a confiabilidade (Equação 4). Os níveis de confiabilidade (erros aceitáveis) pré-estabelecidos foram de 3%, 5% e 10% ($CV_x = 0,03; 0,05; 0,1$).

A severidade da podridão negra variou de 0,02 a 6,1%. O número de sulcos a serem amostrados reduziu com a elevação do erro aceitável e do número de plantas avaliadas por sulco (Tabela 1). Considerando cinco folhas basais avaliadas por planta, uma amostra composta de 1.891 sulcos com 4 plantas/sulco deve ser utilizada para quantificar a severidade da podridão negra quando o erro aceitável é de 3%, enquanto esse valor reduz para 681 e 170 sulcos quando os

erros aceitáveis se elevam para 5 e 10%, respectivamente. Com a elevação de 4 para 8 no número de plantas avaliadas por sulco, ocorreu uma redução superior a 50% no número de sulcos a serem amostrados, ou seja, considerando um erro de 10%, ocorreu a redução do número de sulcos a serem amostrados de 170 para 84. Não foram constatadas correlações significativas entre os níveis de severidade da doença e os tamanhos das amostras. Como o nível de erro a ser adotado depende do propósito da amostragem, os autores consideraram o nível de 10% adequado em levantamentos de campo, motivo pelo qual recomendaram que em levantamentos futuros, utilizando o caminhamento em diagonal cruzada, em cada área fossem amostrados 84 sulcos, com 8 plantas/sulco e 5 folhas basais/planta.

Tabela 1. Tamanho da amostra, em número de sulcos, para quantificação da severidade da podridão negra do repolho, considerando cinco folhas avaliadas por planta, com a confiabilidade definida pelo coeficiente de variação da média (erro) para três níveis de plantas amostradas por sulco (Azevêdo et al., 2000).

Número de plantas/sulco	Erro (%) / Tamanho da amostra		
	3	5	10
4	1.891 ^a	681	170
6	1.383	498	124
8	170	124	84

^aMédia de 39 áreas de plantio.

6.2. Murha bacteriana em tomateiro

A produção do tomateiro apresenta expressiva importância na região Agreste do estado de Pernambuco, onde a incidência da murcha bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*, constitui um fator limitante. Apesar da importância mundial, não existiam estudos envolvendo a determinação de planos de amostragem para quantificação da murcha bacteriana do tomateiro no campo. Nesse sentido, o estudo teve como objetivo determinar um plano de amostragem, envolvendo padrões de caminhamento e tamanhos de amostra, para quantificação da incidência da murcha bacteriana em plantios de tomateiro tutorado no Agreste de Pernambuco (Tavares et al., 2000a).

Os experimentos foram realizados em áreas de plantio de tomateiro tutorado (cv. Santa Clara), localizadas no município de Camocim de São Félix, Agreste de Pernambuco. Inicialmente foi determinado o padrão de caminhamento para

quantificação da murcha bacteriana. Para isso, duas áreas de plantio (C-1 e C-6), com aproximadamente 1 ha e plantas no estágio de floração-frutificação, foram submetidas a amostragem para avaliação da incidência da murcha bacteriana. Em cada área, a incidência da doença foi avaliada numa parcela de 50 linhas contíguas e 10 sulcos por linha, com 12 plantas/sulco, considerando a porcentagem de plantas com sintomas no sulco em relação ao total avaliado. No interior dessa parcela, foram testados os padrões de caminhamento aleatório, diagonal, diagonal cruzada e forma de “V”, sendo avaliados 50 sulcos por caminhamento, com 12 plantas/sulco. A seleção do melhor padrão de caminhamento foi efetuada pelo teste t para amostras independentes, comparando os valores de incidência de murcha obtidos na parcela integral (geral) com os verificados pelos diferentes caminhamentos.

Posteriormente, foi determinado o tamanho ideal da amostra para quantificação da murcha bacteriana. Foram efetuados levantamentos da incidência de murcha bacteriana em 15 áreas de plantio (C-1 a C-15), quando as plantas se encontravam no estágio vegetativo ou de floração-frutificação. Em cada área, utilizando o padrão de caminhamento em diagonal cruzada, a incidência da murcha bacteriana foi avaliada em 40 sulcos com 12 plantas/sulco, totalizando uma população de 480 plantas. Os dados obtidos nos levantamentos foram utilizados como amostragens-piloto, sendo estimados os tamanhos ideais das amostras para cada área, baseado no coeficiente de variação da média especificando a confiabilidade e em equações de probabilidade. Na análise baseada no coeficiente de variação da média, o tamanho da amostra (n) foi estimado para confiabilidades (erros aceitáveis) pré-estabelecidas de 3%, 5%, 8% e 10% ($CV_x = 0,03; 0,05; 0,08; 0,10$), utilizando a *Equação 4*. Na análise baseada em equações de probabilidade, o tamanho da amostra foi determinado para obter estimativas em torno de 3%, 5%, 8% e 10% ($D = 0,03; 0,05; 0,08; 0,10$) da média populacional, a 5% e 10% de probabilidade ($P = 0,05$ e $0,10$), utilizando a *Equação 7*. Apenas o caminhamento em diagonal cruzada propiciou estimativas da incidência da murcha bacteriana em tomateiro que não diferiram significativamente das constatadas no levantamento integral das parcelas nas duas áreas (Tabela 2).

Tabela 2. Incidência da murcha bacteriana em duas áreas de plantio de tomateiro tutorado, estimada na parcela inteira e com a utilização de vários padrões de caminhamento (Tavares et al., 2000a).

Tratamento	Área	
	C-1	C-6
Caminhamento aleatório	42,6 ^{a*}	33,4
Caminhamento diagonal	23,3	42,9*
Caminhamento diagonal cruzada	14,0	38,2
Caminhamento V	33,6*	40,6
Levantamento geral	20,4	33,3

^aMédia de 50 sulcos nos caminhamentos e 500 sulcos na parcela integral (geral), considerando a porcentagem de plantas com sintomas no sulco em relação ao total de 12 plantas avaliadas. Médias seguidas de asterisco (*) no sentido vertical diferem significativamente da obtida pelo levantamento geral, considerando o teste *t* para amostras independentes ($P \leq 0,05$).

O propósito de um plano de amostragem é aumentar a precisão de uma amostra com o mínimo de custo. Cada padrão de amostragem tem seus benefícios específicos e pode ser apropriado sob uma gama de circunstâncias. As boas estimativas da incidência da murcha bacteriana do tomateiro propiciadas pelo padrão de caminhamento em diagonal cruzada, nas duas áreas de plantio, podem ter sido associadas ao grau de agregação das plantas doentes. Embora a escolha do padrão de amostragem dependa da distribuição espacial da doença no campo, esse aspecto não foi considerado neste estudo, pois em outro trabalho realizado no Agreste de Pernambuco, foi constatado que o arranjo espacial das plantas de tomateiro com murcha bacteriana variava conforme a área de plantio e o progresso da doença (Silveira et al., 1998). A adequação do padrão de caminhamento em diagonal cruzada na avaliação de doenças de plantas, principalmente quando considerada a incidência e/ou condições de arranjo agregado de plantas doentes, tem sido evidenciada em vários patossistemas.

Na estimativa do tamanho da amostra baseada no coeficiente de variação da média com confiabilidades pré-estabelecidas, considerando a média das 15 áreas de plantio, uma amostra de 130 sulcos com 12 plantas/sulco parece ser apropriada para quantificar a incidência da murcha bacteriana quando o erro aceitável é de 10%. No entanto, esse valor aumenta para 208, 533 e 1.484 sulcos quando os erros aceitáveis reduzem para 8%, 5% e 3%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Tamanho da amostra, em número de sulcos, para quantificação da incidência da murcha bacteriana em tomateiro, com a confiabilidade definida pelo coeficiente de variação da média (erro), em 15 áreas de plantio (Tavares et al., 2000a).

Área	Incidência ^a (%)	Erro (%) / Tamanho da amostra			
		3	5	8	10
C-1	14,0	4.182 ^b	1.505	588	376
C-2	18,6	1.630	587	229	147
C-3	49,2	729	262	102	66
C-4	16,6	421	151	59	38
C-5	7,2	1.565	563	220	141
C-6	38,2	930	335	131	34
C-7	4,0	2.760	993	388	248
C-8	51,3	430	155	60	39
C-9	6,6	2.074	746	292	187
C-10	29,7	1.390	500	195	125
C-11	68,8	141	51	20	13
C-12	14,2	1.344	484	189	121
C-13	10,3	1.979	712	278	178
C-14	32,1	1.483	534	208	133
C-15	36,0	1.205	424	169	108
Média	26,2	1.484	533	208	130

^aMédia de 40 sulcos, considerando a porcentagem de plantas com sintomas no sulco em relação ao total de 12 plantas avaliadas.

Na análise baseada em equações de probabilidade, o número de sulcos a ser amostrado foi superior ao estimado quando a análise foi efetuada somente pelo coeficiente de variação da média e aumentou com a redução dos níveis de probabilidade. Portanto, considerando a média das 15 áreas avaliadas, uma amostra de 284 sulcos parece ser apropriada quando um erro de 10% e uma probabilidade de 90% são aceitáveis na quantificação da murcha bacteriana do tomateiro. No caso do erro ser reduzido para 5%, mantendo-se o mesmo nível de probabilidade, seria necessário a amostragem de 1.115 sulcos (Tabela 4).

Tabela 4. Tamanho da amostra, em número de sulcos, para quantificação da incidência da murcha bacteriana em tomateiro, com a confiabilidade definida por equações de probabilidade ($P=0,05$ e $0,01$) e pelo coeficiente de variação da média (erro), em 15 áreas de plantio (Tavares et al., 2000a).

Área	Erro (%) / Probabilidade (P) / Tamanho da amostra							
	3		5		8		10	
	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1
C-1	6.517	4.182	2.346	1.505	917	588	587	376
C-2	6.260	4.017	2.254	1.116	880	565	563	362
C-3	2.799	1.796	1.008	647	394	253	252	162
C-4	1.515	1.036	582	373	227	146	145	93
C-5	6.011	3.857	2.164	1.389	845	542	541	347
C-6	1.450	930	522	335	204	131	130	84
C-7	10.596	6.799	3.815	2.448	1.490	956	954	612
C-8	1.651	1.059	594	381	232	149	149	95
C-9	7.966	5.111	2.868	1.840	1.120	719	717	460
C-10	5.339	3.425	1.922	1.233	751	482	481	308
C-11	541	347	195	125	76	49	49	31
C-12	5.162	3.312	1.858	1.192	726	466	465	298
C-13	7.599	4.876	2.736	1.755	1.069	686	684	439
C-14	5.695	3.654	2.050	1.316	801	514	512	329
C-15	4.630	2.971	1.667	1.070	651	418	417	267
Média	4.915	3.158	1.772	1.115	692	444	443	284

A determinação do tamanho de amostras com o uso de diferentes níveis de probabilidade, além da definição do erro aceitável, possibilita estimativas mais precisas, o que foi evidenciado pelo incremento no número de sulcos a ser amostrado com a elevação dos níveis de probabilidade. No entanto, esse aumento da precisão pode necessitar a amostragem de um número muito elevado de unidades, impossibilitando muitas vezes que a amostragem seja realizada devido às limitações de tempo, recursos humanos ou recursos financeiros. Diante disso, baseado nos resultados obtidos pelos dois métodos de cálculo do tamanho ideal da amostra e na executabilidade da amostragem, os autores sugeriram que uma amostra de 130 sulcos com 12 plantas/sulco seria apropriada para quantificar a incidência da murcha bacteriana no Agreste de Pernambuco quando o erro aceitável é de 10%.

Em outro estudo realizado no Agreste de Pernambuco, o objetivo foi determinar planos de amostragem de solo para análise de riscos de infecção de

tomateiro por *R. solanacearum* (Tavares et al., 2000b). Os ensaios foram conduzidos em duas áreas (A-1 e A-2) que se encontravam sem plantio, localizadas no município de Camocim de São Félix. Essas áreas haviam sido cultivadas com tomateiro, quando foram submetidas ao levantamento da murcha bacteriana (Silveira et al., 1998), evidenciando níveis de 94,3% (A-1) e 75,0% (A-2) de incidência da doença. A área A-1 havia sido mantida em pousio desde a colheita até a realização do ensaio, enquanto a área A-2 havia sido cultivada sucessivamente com milho, repolho e tomate. Em cada área, foi estabelecida uma subárea de aproximadamente 1,0 ha, onde foram testados diferentes padrões de caminhamento e tamanhos de amostra. Foram testados os padrões de caminhamento em diagonal cruzada (“X”), formas de “<”, “V” e “W”, e aleatório. Para cada padrão de caminhamento, foram coletadas 10, 20, 40, 60 e 80 amostras de solo, com aproximadamente 300 g cada, retiradas à profundidade de 10-15 cm e acondicionadas em sacos plásticos. Posteriormente, as amostras foram peneiradas em malha de 0,8 cm e depositadas, individualmente, em copos plásticos descartáveis com fundos perfurados e capacidade de 300 ml. As amostras foram mantidas em casa de vegetação sob alta umidade, obtida pela manutenção dos copos dentro de pratos plásticos descartáveis contendo 40 ml de água. Para analisar o risco de infecção de tomateiro por *R. solanacearum* nas amostras de solo coletadas, foi utilizado o método do bioensaio com plantas indicadoras. Plântulas de tomateiro (cv. Santa Clara), com 21 dias de idade, cultivadas sob condições de casa de vegetação em substrato Plantmax®, foram removidas de bandejas tipo plantágio, submetidas à lavagem para remoção do substrato e ao corte das raízes com tesoura flambada. Em seguida, as plântulas foram transplantadas, individualmente, para os copos plásticos contendo as amostras de solo. As plantas foram observadas diariamente quanto ao aparecimento de sintomas externos da murcha bacteriana, até 28 dias após o transplântio, quando os caules das sobreviventes foram seccionados longitudinalmente desde o colo até o meristema apical, sendo avaliada a presença de descoloração vascular e retirados fragmentos para realização de corrida bacteriana pelo teste do copo, visando à confirmação do diagnóstico de murcha bacteriana. A seleção do melhor método de caminhamento e do tamanho ideal de amostra foi baseada nos valores de incidência verificados no bioensaio com plântulas de tomateiro em casa de vegetação, empregando o teste Z para diferença entre proporções.

Na área A-1, onde a incidência de murcha bacteriana havia sido de 94,3%, a coleta de amostras de solo utilizando o padrão de caminhamento em forma de “V” propiciou a detecção de 21,7% de incidência da doença pelo bioensaio com

plântulas de tomateiro quando considerada a média dos diferentes tamanhos de amostra, sem diferir significativamente ($P=0,05$) dos caminhamentos em “X”, “W” e aleatório. Na área A-2, onde a incidência de murcha bacteriana havia sido de 75,0%, a coleta de amostras pelo caminhamento em “W” propiciou a detecção de 41,6% de incidência da doença pelo bioensaio quando considerada a média dos diferentes tamanhos de amostra, sem diferir significativamente dos caminhamentos em “V” e “X”. Nas duas áreas, a coleta de amostras de solo pelo caminhamento em “<” propiciou a detecção dos menores valores de incidência da doença, diferindo significativamente do obtido pelos caminhamentos em “V” e “X” na área A-1 e “V” e “W” na área A-2 (Tabela 5). Considerando a média dos caminhamentos, com os tamanhos de 10, 20, 40, 60 e 80 amostras de solo, foram detectados valores de incidência de murcha bacteriana pelo bioensaio entre 10% e 22,5% na área A-1 e entre 29,0% e 40,0% na área A-2, sem diferirem significativamente entre si dentro da mesma área. Os elevados níveis de incidência de murcha bacteriana verificados nas áreas na safra anterior à amostragem, indicavam que a densidade do inóculo de *R. solanacearum* apresentava-se igualmente elevada, refletindo num arranjo espacial próximo ao uniforme, o que se assemelhava ao relatado em relação a outros fitopatógenos habitantes do solo (Benson, 1994). Em virtude da semelhança dos resultados obtidos para os padrões de caminhamento utilizados na coleta das amostras de solo visando a detecção de *R. solanacearum*, o caminhamento em “W” foi escolhido por ser considerado o mais seguro para estudos envolvendo amostragem de fitopatógenos habitantes do solo (Benson, 1994; Campbell & Neher, 1994).

A semelhança dos resultados obtidos em relação ao tamanho da amostra a ser considerada para detecção de *R. solanacearum* indicam que qualquer número de amostras testado é representativo nas condições em que o ensaio foi realizado. Entretanto, embora a precisão dos métodos de detecção de fitopatógenos habitantes do solo seja efetiva com o aumento do número de amostras avaliadas, os custos devem ser considerados na definição do nível de precisão aceitável para amostragem em larga escala (Benson, 1994). Nesse sentido, os autores (Tavares et al., 2000b) concluíram que 40 amostras de solo coletadas em 1,0 ha constituía uma boa escolha em termos de padronização da metodologia, representando um valor intermediário entre os tamanhos.

Tabela 5. Valores de Z para diferença entre proporções da incidência no bioensaio, para detecção de riscos de infecção por *Ralstonia solanacearum* em diferentes padrões de caminhamento e tamanhos de amostras (número de amostras de solo) (Tavares et al., 2000b).

Área	Padrão de caminhamento			
	<	V	W	Aleatório
A-1	X	2,3*	- 0,64	0,58
	<		- 1,72	- 1,20
	V		1,22	1,75
	W			0,52
	Número de amostras de solo			
	20	40	60	80
	10	- 0,68	- 1,48	- 1,04
	20		- 0,31	- 0,65
	40		0,75	0,37
	60			- 0,47
A-2	Padrão de caminhamento			
	<	V	W	Aleatório
	X	1,62	- 0,87	- 0,51
	<		- 3,54*	- 1,27
	V		- 1,05	1,19
	W			2,22*
	Número de amostras de solo			
	20	40	60	80
	10	1,32	0,97	1,15
	20		- 0,45	- 1,05
	40		0,25	- 0,49
	60			- 0,87

* Significativamente diferente pelo teste Z, para diferença entre proporções ($P \leq 0,05$).

Posteriormente, foi efetuada a análise de riscos de infecção de tomateiro por *R. solanacearum* em solos da região Agreste (Tavares et al., 2000b). Dezoito áreas destinadas ao cultivo comercial de tomateiro tutorado, localizadas no município de Camocim de São Félix, foram submetidas à análise de riscos de infecção por *R. solanacearum*, seis meses antes do plantio. Em cada área, foi estabelecida uma subárea de aproximadamente 1,0 ha, onde, utilizando o padrão de caminhamento em forma de “W”, foram coletadas 40 amostras de solo à profundidade de 10-15 cm, com aproximadamente 300 g cada. As amostras de

solo foram processadas e a análise efetuada pelo método da plântula indicadora, conforme descrito previamente. Durante a safra, foi efetuado o levantamento da incidência da murcha bacteriana nas 18 áreas cultivadas com tomateiro tutorado (cv. Santa Clara), analisadas previamente quanto aos riscos de infecção por *R. solanacearum*. Em cada área foi avaliada a incidência da doença em 130 sulcos com 12 plantas/sulco, utilizando o caminhamento em "X" (diagonal cruzada). Com os valores da incidência estimada pelo bioensaio (*IEB*) e da incidência real no campo (*IRC*) das 18 áreas amostradas, foi efetuada a análise de regressão, tendo a *IEB* como variável independente e *IRC* como variável dependente.

As amostras de solo provenientes de 18 áreas destinadas ao plantio de tomateiro e avaliadas quanto aos riscos de infecção por *R. solanacearum* pelo método do bioensaio, aos seis meses antes do plantio, evidenciaram níveis de incidência de murcha bacteriana entre 0% e 57,5%, mas a maioria (55,6%) apresentou incidência inferior a 10%. Na safra seguinte à amostragem, a incidência de murcha bacteriana nos plantios efetuados nessas áreas variou entre 0% e 70%, mas a maioria (61,1%) evidenciou incidência inferior a 10%. Quando aplicada a análise de regressão dos dados de incidência de murcha bacteriana estimada pelo bioensaio (*IEB*) versus os valores de incidência da doença no campo (*IRC*), foi determinada uma equação de previsão de risco de infecção por *R. solanacearum* [$IRC = 3,393 + \exp(1,338 + (0,051) \cdot IEB)$], indicando a possibilidade de estimativas com elevado nível de precisão ($R^2 = 98,68\%$) (Figura 3).

Nos dois estudos envolvendo a murcha bacteriana em tomateiro, o primeiro para determinação do padrão de caminhamento e do número de sulcos a ser amostrados para a quantificação da incidência da doença nos plantios, e o segundo para determinação do padrão de caminhamento e número de amostras de solo para detecção de riscos de infecção, a determinação de um plano de amostragem foi essencial para obtenção de elevada precisão nas estimativas da doença.

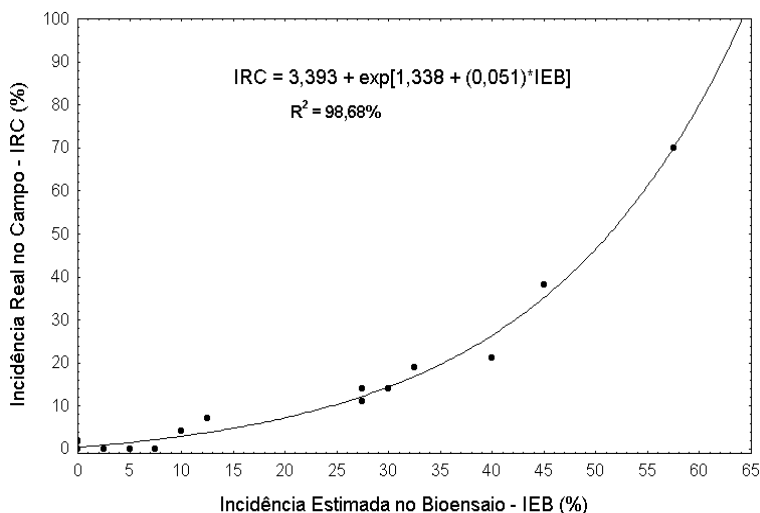


Figura 3. Relação entre incidência de murcha bacteriana estimada em bioensaio com plântulas de tomateiro aos seis meses antes do plantio e a incidência da doença em 18 áreas cultivadas do Agreste de Pernambuco (Tavares et al., 2000b).

6.3. Mancha aquosa em meloeiro

A mancha aquosa do meloeiro, causada pela bactéria *Acidovorax citrulli*, causa perdas de 40 a 50% na produção e depreciação no valor comercial do fruto no Rio Grande do Norte, principal pólo produtor e exportador no Brasil. Um dos objetivos do estudo foi determinar o tamanho das amostras para quantificação da incidência da doença nos campos de produção de melão (Silva et al., 2003). Foram conduzidos levantamentos da incidência da mancha aquosa em 18 áreas de plantio nos municípios de Mossoró e Baraúna. Em cada área, foram delimitadas quatro parcelas de 1,0 ha e demarcadas ao acaso 10 subparcelas de 100 m² (10x10 m). A incidência foi estimada em cada subparcela pela porcentagem de frutos com sintomas da doença em relação ao total de 20 frutos avaliados/subparcela, selecionados arbitrariamente ao longo de uma diagonal. Os dados obtidos nos levantamentos foram utilizados como amostragens-piloto e os tamanhos ideais das amostras para cada área foram obtidos pela análise baseada no coeficiente de variação da média especificando a confiabilidade (Equação 4). Os níveis de confiabilidade (erros aceitáveis) pré-estabelecidos foram de 5%, 10%, 15% e 20% ($CV_x = 0,05; 0,1; 0,15; 0,20$).

A incidência da mancha aquosa variou entre 4,3% e 47,3% nas áreas de plantio. Não foram constatadas correlações significativas ($P>0,05$) entre os níveis de incidência da mancha aquosa e os tamanhos das amostras. Considerando a média das 18 áreas de plantio, os autores recomendaram que em futuros levantamentos da incidência da mancha aquosa fosse utilizada uma amostra de 12 subparcelas com 100 m²/ha e 20 frutos avaliados por subparcela quando o erro aceitável for 10%, considerado ideal em levantamentos de campo. No entanto, caso houvesse a necessidade de uma precisão mais elevada nas estimativas, com erro aceitável de 5%, o tamanho da amostra se elevaria para 47 subparcelas. Por outro lado, com erros aceitáveis de 15% e 20% os tamanhos das amostras reduziriam para 5 e 3 subparcelas, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Tamanho da amostra, em número de subparcelas de 100 m² (10x10 m), para quantificação da incidência da mancha aquosa do melão, com a confiabilidade definida pelo coeficiente de variação da média (erro), em 18 áreas de plantio (Adaptado de Silva et al., 2003).

Área	Incidência ^a (%)	Erro (%) / Tamanho da amostra			
		5	10	15	20
VA-1	6,6	65	16	7	4
VA-2	14,3	19	5	2	1
VA -3	18,0	31	8	3	2
VA -4	8,6	60	15	7	4
VA -5	9,9	57	14	6	4
VA -6	4,3	67	17	8	4
VA -7	22,3	46	11	5	3
VA -8	13,0	34	9	4	2
VA -9	29,6	57	14	6	4
VA -10	19,2	31	8	3	2
VA -11	21,3	66	16	7	4
VA -12	13,6	56	14	6	3
VA -13	21,3	26	7	3	2
VA -14	28,0	69	17	8	4
VA -15	46,6	23	6	3	1
VA -16	47,3	38	10	4	2
VA -17	43,3	54	14	6	3
VA -18	26,0	39	10	4	3
Média	21,9	47	12	5	3

^aMédia de 10 subparcelas com 20 frutos avaliados/subparcela.

Os resultados obtidos neste estudo servem como base para futuros levantamentos da mancha aquosa do melão no Rio Grande do Norte, uma vez que os dados foram originados de campos sob diferentes condições e estimados considerando as necessidades crescentes de precisão.

6.4. Podridão mole em alface e couve-chinesa

A podridão-mole, causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, é uma das doenças mais destrutivas nas culturas da alface e da couve-chinesa. Diante disso, o objetivo do estudo foi determinar os tamanhos ideais das amostras para quantificação da incidência dessa doença em campos de produção de alface e couve-chinesa (Silva et al., 2008). Foram conduzidas amostragens da incidência da podridão-mole em oito áreas de plantio de alface e cinco de couve-chinesa, situadas nos municípios produtores do estado de Pernambuco. As áreas foram escolhidas aleatoriamente e as plantas se encontravam próximas à colheita, quando os sintomas da doença são mais evidentes. Em cada área foram demarcadas 20 parcelas de 4,5 m² (1,5 x 3,0 m) para alface e 20 parcelas de 10,5 m² (3,5 x 3,0 m) para couve-chinesa. A incidência da podridão mole foi estimada em cada parcela pela porcentagem de plantas com sintomas da doença em relação ao total de 20 plantas avaliadas/parcela, selecionadas ao longo de duas diagonais cruzadas (10 plantas/diagonal). Os dados de incidência da podridão mole obtidos nas amostragens foram utilizados na determinação dos tamanhos ideais das amostras baseado no coeficiente de variação da média especificando as confiabilidades (erros aceitáveis) pré-estabelecidas de 5%, 10% e 20%, associadas à distribuição binomial negativa (Equação 6), uma vez o índice de Lloyd (Equação 1) indicou que o arranjo espacial da doença nas parcelas era agregado.

A incidência da podridão mole em alface variou entre 1,5% e 10,5%, enquanto em couve-chinesa variou entre 10,0% e 37,8%. Caso existam limitações financeiras, de equipe técnica e de tempo para execução dos levantamentos, um nível de erro de 20% é aceitável e nesse caso em alface deveriam ser amostradas 32 parcelas/ha e 20 plantas por parcela de 4,5 m², enquanto em couve-chinesa deveriam ser amostradas 22 parcelas/ha e 20 plantas por parcela de 10,5 m². Caso não existam limitações para execução dos levantamentos, pode ser adotado um erro de 10%, situação em que os números das amostras para quantificação da doença em alface e couve-chinesa se elevariam para 130 parcelas/ha e 87 parcelas/ha, respectivamente (Tabela 7). Nas

duas culturas não foram constatadas correlações significativas entre os níveis de incidência da podridão mole e os tamanhos das amostras.

Tabela 7. Tamanho da amostra, em número de parcelas de alface (4,5 m²) e de couve-chinesa (10,5 m²), para quantificação da incidência da podridão mole, com a confiabilidade definida pelo coeficiente de variação da média (erro) associado à distribuição binomial negativa (Adaptado de Silva et al., 2008).

Cultura	Área	Incidência ^a (%)	LIP ^b	Erro (%) / Tamanho da amostra		
				5	10	20
Alface	A-1	1,5	2,79*	982	246	61
	A-2	2,0	2,08*	632	158	39
	A-3	3,7	1,65*	365	91	23
	A-4	4,0	2,16*	566	141	35
	A-5	5,5	1,59*	310	77	19
	A-6	6,2	1,64*	320	80	20
	A-7	9,8	2,35*	581	145	36
	A-8	10,5	1,93*	410	102	26
	Média	5,4	-	521	130	32
Couve-chinesa	C-1	10,0	2,37*	589	147	37
	C-2	15,5	1,43*	197	49	12
	C-3	17,8	2,52*	630	157	39
	C-4	26,8	1,39*	173	43	11
	C-5	37,8	1,38*	163	41	10
	Média	21,6	-	350	87	22

^aMédia de 20 arcelas com 20 plantas avaliadas/parcela.

^bÍndice de Lloyd. Valores seguidos por asterisco são significativamente maiores que 1,0 (P=0,05) e indicam que o arranjo da doença segue o padrão agregado.

7. Considerações finais

O desenvolvimento de planos de amostragem para quantificação de doenças de plantas é um grande desafio, particularmente em relação às fitobacterioses. Muitos levantamentos dessas doenças são realizados sem métodos padronizados de amostragem, o que pode resultar em dados com baixa confiabilidade. Um pressuposto básico para estimar o tamanho da amostra é que os dados dos locais analisados sejam representativos do que poderia ocorrer em outros campos. Para que esse pressuposto seja atendido, há necessidade da realização de amostragens-piloto em um número considerável de áreas de plantio, com diferentes

características de manejo cultural e níveis de doença. Essa exigência operacional desestimula a realização de estudos visando o desenvolvimento de planos de amostragem de doenças de plantas. No entanto, sem a realização de amostragens-piloto representativas, as estimativas de tamanhos de amostras podem não atingir os níveis de precisão desejados.

5. Bibliografia

- AZEVEDO, S. S.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Levantamento da intensidade da podridão negra e da alternariose do repolho no Agreste de Pernambuco e determinação do tamanho da amostra para sua quantificação. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 299-306, 2000.
- BEEN, T. H.; SCHOMAKER, C. H. Distribution patterns and sampling. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Eds.). **Plant nematology**. Wallingford: CAB International, 2006. p. 302-326.
- BENSON, D. M. Inoculum. In: CAMPBELL, C. L., BENSON, D. M. (Eds.). **Epidemiology and management of root diseases**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p. 1-33.
- CAMPBELL, C. L., NEHER, D. A. Estimating disease severity and incidence. In: CAMPBELL, C. L., BENSON, D. M. (Eds.). **Epidemiology and management of root diseases**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p. 117-142.
- CAMPBELL, C. L.; DUTHIE, J. A. Sampling for disease assessment. **Biological and Cultural Tests for Control of Plant Diseases**, v. 4, p. 5-8, 1989.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. Designing experiments and sampling. In: CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. p. 353-391.
- COCHRAN, W. G. **Sampling techniques**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1977. 428 p.
- DUTHIE, J. A.; CAMPBELL, C. L.; NELSON, L. A. Efficiency of multistage sampling for estimating of intensity of leaf spot diseases of alfalfa in field experiments. **Phytopathology**, v. 81, p. 959-964, 1991.
- FERRANDINO, F. J. Measuring spatial aggregation in binary epidemics: correlative analysis and the advantage of fractal-based sampling. **Phytopathology**, v. 94, p. 1215-1227, 2004.
- HOLDERNESS, M. Surveys and sampling. In: WALLER, J. M.; LENNÉ, J.; WALLER, S. J. (Eds.). **Plant pathologist's pocketbook**. 3. ed. Wallingford: CAB International, 2002. p. 545-640.
- JEGER, M. J. Mathematical analysis and modeling of spatial aspects of plant disease epidemics. In: KRANZ, J. (Ed.). **Epidemics of plant diseases: mathematical analysis and modeling**. 2. ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 1990. p. 53-95.
- KRANZ, J. Introduction to sampling in crop protection. In: KRANZ, J.; HOLZ, F. (Eds.). **Basics of decision-making and planning for integrated pest management (IPM): material for a course**. Feldafing: Zentralstelle für Ernährung und Landwirtschaft, 1993. p. 33-39.
- KRANZ, J. Measuring Plant Disease. In: KRANZ, J.; ROTEM, J. (Eds.). **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. p. 35-50. 1959.
- MADDEN, L. V.; HUGHES, G. Sampling for plant disease incidence. **Phytopathology**, v. 89, p. 1088-1103, 1999.
- MADDEN, L. V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. Estimating plant disease by sampling. In: MADDEN, L. V.; HUGHES, G.; VAN DEN BOSCH, F. **The study of plant disease epidemics**. St. Paul: APS Press, 2007. p. 279-318.

- NEHER, D. A.; CAMPBELL, C. L. Determining sample size. In: FRANCL, L. J.; NEHER, D. A. (Eds.). **Exercises in plant disease epidemiology**. St. Paul: APS Press, 1997. p. 12-15.
- PARNELL, S.; GOTTWALD, T. R.; IREY, M. S.; LUO, W.; VAN DEN BOSCH, F. A stochastic optimization method to estimate the spatial distribution of a pathogen from a sample. **Phytopathology**, v. 101, p. 1184-1190, 2011.
- PERRY, J. N. Sampling and applied statistics for pests and diseases. **Aspects of Applied Biology**, v. 37, p. 1-14, 1994.
- SILVA, A. M. F.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, A. J. Tamanho de amostras para quantificação da podridão-mole da alface e da couve-chinesa. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 90-92, 2008.
- SILVA, E. I.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; SALES JR., R.; OLIVEIRA, I. S. Levantamento da incidência da mancha-aquosa do melão no Rio Grande do Norte e determinação do tamanho das amostras para quantificação da doença. **Summa Phytopathologica**, v. 29, p. 172-176, 2003.
- SILVA, J. A. S.; MICHEREFF, S. J. Quantificação de fitobacterioses. In: GAMA, M. A. S.; NICOLI, A.; GUIMARÃES, L. M. P.; LOPES, E. P.; MICHEREFF, S. J. (Eds.). **Estado da arte em fitobacterioses tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2016. p. 93-118.
- SILVEIRA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Epidemiology of tomato bacterial wilt in Agreste region of Pernambuco State, Brazil, in 1996/1997. In: PRIOR, P. H.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (Eds.). **Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects**. Berlin: Springer-Verlag/INRA, 1998. p. 358-363.
- SOUTHWOOD, T. R. E. **Ecological methods**. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1978. 524 p.
- TAVARES, L. A.; MICHEREFF, S. J.; SOUZA, R. M.; MARIANO, R. L. R. Plano de amostragem para quantificação da murcha bacteriana do tomateiro no campo. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 306-310, 2000a.
- TAVARES, L. A.; MICHEREFF, S. J.; SOUZA, R. M.; MARIANO, R. L. R. Análise de solo para detecção de riscos de infecção de tomateiro por *Ralstonia solanacearum*. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 311-316, 2000b.

Manejo de Fitobacterioses

Kledson Mendes dos Santos

Ueder Pedro Lopes

Alessandro Nicoli

Marco Aurélio Siqueira da Gama

1. Introdução

As fitobactérias constituem um importante grupo de patógenos de plantas cultivadas, provocando perdas em diversas fruteiras, hortaliças, ornamentais, grandes culturas e espécies florestais de importância econômica no Brasil e no mundo (Kado, 2010; Kimati et al., 2011). Embora seja um grupo menor de fitopatógenos, quando comparado aos fungos, as fitobactérias causam danos desastrosos, podendo inviabilizar toda uma área de cultivo (Agrios, 2005).

No Brasil, assim como nas demais regiões de clima tropical, as fitobacterioses têm alcançado maior destaque, uma vez que as condições de alta temperatura e umidade favorecem o desenvolvimento destas doenças. Aliado a isto, a frequente ocorrência de chuvas é essencial para que haja a disseminação das fitobactérias. Além dos fatores climáticos, o cultivo de um número variado de culturas durante todo o ano, diferente do que acontece em ambientes temperados, favorece a ocorrência das doenças (Romeiro, 2005).

Dentre os sintomas mais comuns de fitobacterioses, podemos citar as podridões moles, murchas vasculares, manchas foliares, cancrios, morte dos ponteiros, crestamentos, galhas, talo oco e canela preta nas mais diversas culturas (Kado, 2010; Pontes & Lopes, 2012; Romeiro, 2005).

O manejo de fitobacterioses tem sido um grande desafio para os produtores, principalmente pela dificuldade de encontrar métodos de controle eficientes. Portanto, para realizar o manejo dessas doenças, é necessário o conhecimento

prévio do patógeno, entendendo como ocorre sua sobrevivência de uma safra a outra e a sua disseminação dentro e entre as lavouras (Kado, 2010; Romeiro, 2005). Além disso, é necessário entender como as variáveis climáticas afetam as fitobactérias. Desta forma, é possível realizar o manejo integrado de doenças, que consiste em conjunto de medidas de controle, baseado nas características do patógeno, visando reduzir a doença. Estas medidas atuam sobre o patógeno, o hospedeiro ou o ambiente, reduzindo a quantidade de inóculo inicial ou a taxa de progresso da doença, bem como alterando ou evitando condições favoráveis à sua ocorrência (Lopes & Duval, 2007).

Neste capítulo, serão discutidas as características gerais relacionadas ao ciclo das relações bactéria-planta, as medidas de controle que podem ser adotadas e o manejo geral de doenças, com exemplos de algumas fitobacterioses de importância no Brasil.

2. Ciclo das relações bactéria-planta

Cada fitopatógeno possui um ciclo de vida típico. No caso de fitobactérias, o ciclo de vida está condicionado ao contato com o hospedeiro. Este ciclo envolve todas as etapas de desenvolvimento da bactéria, iniciando com a sobrevivência, passando pela disseminação, até a chegada do inoculo ao ponto de infecção na superfície da planta hospedeira (Figura 1). Em seguida, a bactéria penetra o tecido da planta e entra em contato com as células, estabelecendo a infecção. Posteriormente, ocorre a colonização dos tecidos da planta e a reprodução, gerando mais inóculo, que poderá infectar novos tecidos ou sobreviver, na ausência do hospedeiro ou de condições favoráveis a novas infecções.

Entender o ciclo de vida de uma fitobactéria é o passo inicial para o sucesso do manejo integrado da doença. Dentre as diversas fases do ciclo de vida desses organismos, podemos destacar a sobrevivência, a disseminação e a penetração, uma vez que a maioria das medidas de controle atua diretamente sobre estas fases.

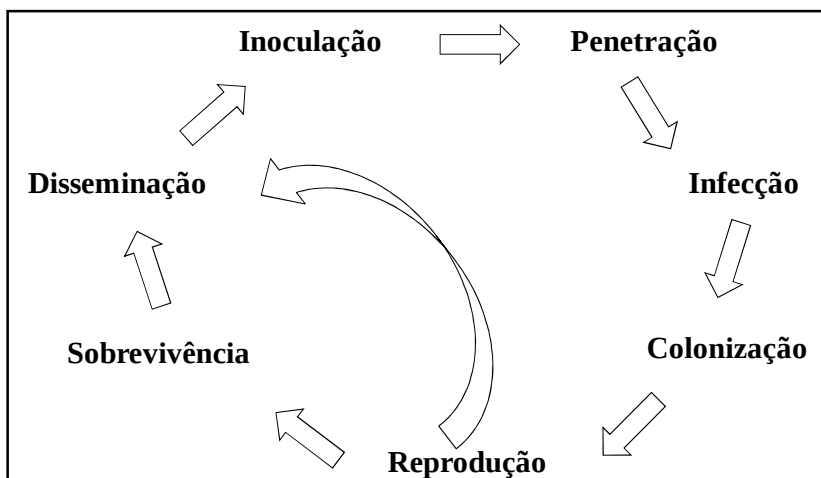


Figura1. Ciclo das relações bactéria-planta.

As fitobactérias podem sobreviver de uma safra a outra em sementes e outros materiais de propagação vegetativa, hospedeiros alternativos, restos de cultura, insetos vetores, ferramentas e utensílios utilizados na lavoura e no próprio solo. A disseminação pode ocorrer por meio de material propagativo contaminado (mudas, rizomas, tubérculos e sementes), por implementos e ferramentas agrícolas, pela água de irrigação por sulco, por respingos de água da chuva ou irrigação, chuva e vento (aerosol) e por insetos. A penetração, ou seja, o modo com que a bactéria alcança os tecidos da planta pode ser por meio de aberturas naturais (estômatos, nectários, hidatódios e lenticelas) ou ferimentos, que podem ser causados pelo atrito entre plantas, por insetos e por tratos culturais (Kado, 2010; Kimati et al., 2011; Romeiro, 2005).

3. Princípios e métodos de controle de fitobacterioses

As medidas de controle de doenças baseiam-se nos métodos de controle legislativo, cultural, físico, biológico, genético e químico, e podem ser organizadas dentro dos princípios da exclusão, erradicação, imunização, proteção, terapia, escape (evasão) e regulação (Whetzel, 1929; Kimatiet al., 2011). Tais medidas podem atuar sobre o patógeno, o hospedeiro ou o ambiente (Figura 2), tendo como objetivo final a redução da doença.

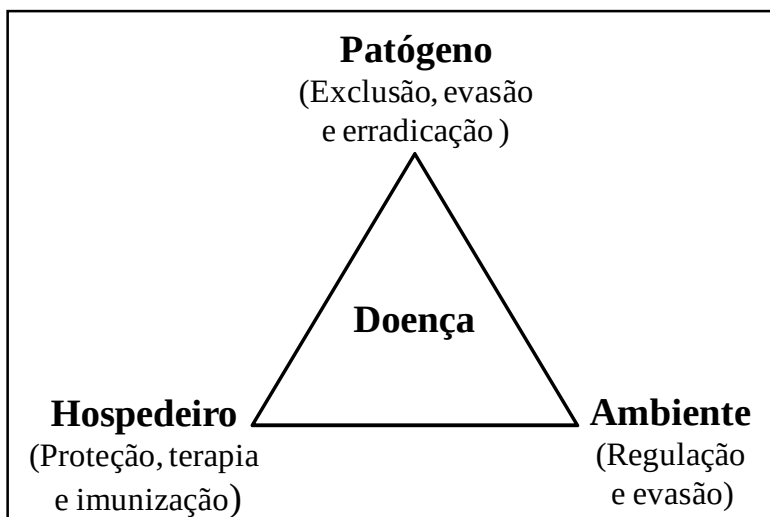


Figura 2. Esquema representando o triângulo de doenças e a forma de atuação dos diferentes princípios de controle.

Exclusão - As medidas de exclusão visam impedir a entrada de uma fitobactéria em determinada área agrícola (sementeira, propriedade, município, estado, país, etc.) e atuam impedindo a disseminação do patógeno. Dentre as medidas, podemos citar as leis quarentenárias, o uso de material propagativo sadio, a qualidade da água de irrigação, o tratamento de materiais propagativos e a desinfestação de implementos e ferramentas agrícolas. A eficiência das medidas de exclusão depende, principalmente, da capacidade de sobrevivência e disseminação da bactéria por meio de sementes, mudas, enxertos e órgãos de propagação vegetativa, bem como da distância entre a fonte de inóculo e a área onde se deseja evitar sua entrada.

Erradicação - São medidas que consistem em eliminar ou reduzir ao máximo a quantidade de inóculo da fitobactéria em uma área onde foi introduzida, geralmente impedindo a sua sobrevivência. A erradicação pode ser feita do ponto de vista absoluto, quando se deseja eliminar totalmente as bactérias da área (o que é extremamente difícil para fitobactérias) ou, ainda, visando apenas reduzir a quantidade de inóculo inicial a cada safra. Como exemplos de medidas de erradicação, podemos citar a eliminação de plantas vivas doentes (*roguing*), podas sanitárias com retirada de órgãos doentes, pousio,

preparo de solo, rotação de culturas, solarização e eliminação de restos de cultura e de plantas espontâneas.

Imunização - Consiste no desenvolvimento de plantas resistentes ou imunes, por meio da imunização genética ou química. As medidas de imunização genética, que incluem o uso de genótipos resistentes obtidos por transgenia ou melhoramento clássico, estão entre as mais desejáveis para o manejo de doenças de plantas. A imunização química pode ser alcançada com a aplicação de indutores de resistência, como o acibenzolar-S-metil.

Proteção - Medidas que visam proteger a planta contra novas infecções, principalmente utilizando barreira física ou química. É o caso da aplicação de antibióticos, fungicidas protetores e inseticidas (controle de vetor), além do uso de adubação adequada das plantas.

Terapia - Baseia-se no tratamento de plantas doentes, visando restabelecer sua sanidade. Dentre as medidas, podemos citar a retirada de partes de plantas doentes e o uso de produtos químicos, como alguns antibióticos que possuem movimento sistêmico. No entanto, para fitobacterioses, o uso de controle químico curativo é pouco eficiente. A termoterapia é outro bom exemplo para controle de bactérias em sementes ou órgãos de propagação vegetativa.

Evasão - Consiste na fuga de locais onde o patógeno está presente e/ou das condições ambientais mais favoráveis ao seu desenvolvimento. Como medidas, podemos citar a escolha do local de plantio dentro da propriedade ou da região geográfica, evitando-se áreas com histórico de fitobacterioses, evitar o plantio em épocas que favoreçam a ocorrência da doença e o plantio de variedades precoces.

Regulação - As medidas de regulação possibilitam a alteração do ambiente, de forma a torná-lo desfavorável à infecção e ao desenvolvimento da doença. Dentre estas medidas, estão o cultivo em ambiente protegido, o aumento do espaçamento de plantas, o sistema de irrigação e a quantidade de água aplicada, o sistema de condução da lavoura e a realização de podas de formação.

4. Fitobacterioses de importância no Brasil

As doenças bacterianas em plantas apresentam grande importância socioeconômica, causando prejuízos em diferentes espécies cultivadas. No Brasil, diversas fitobacterioses são responsáveis por elevados danos na produção e qualidade do produto, levando a perdas expressivas (Romeiro, 2005).

Em hortaliças, destacam-se a podridão negra das crucíferas, a podridão mole de hortaliças, a murcha bacteriana em solanáceas, a sarna da batata, a mancha, a

pinta e o cancro bacteriano do tomateiro, e a mancha aquosa do meloeiro. Em frutíferas, o cancro cítrico, o *greening* e a clorose variegada em citrus, o cancro bacteriano da videira, o moko da bananeira e a seca das ponteiros em goiabeira. Além disso, podemos citar o raquitismo das soqueiras da cana-de-açúcar, o crestamento bacteriano em mandioca, feijão e soja, a murcha do eucalipto e a galha-da-coroa em diversas culturas.

A maioria destas fitobacterioses tem se destacado por causar doenças importantes em todo o mundo (Mansfield et al., 2012).

5. Manejo integrado de fitobacterioses

O manejo de doenças causadas por bactérias tem sido um grande desafio para os produtores, sobretudo em condições tropicais que favorecem estas doenças. Dentre as diversas características que dificultam o manejo de fitobacterioses, podemos destacar a rápida multiplicação do patógeno e a pouca disponibilidade de medidas curativas para estas doenças. Por isso, a maioria das medidas de controle de fitobacterioses baseia-se na prevenção da doença ou de condições favoráveis à sua ocorrência (Lopes & Duval, 2007; Mariano, 2001; Romeiro, 2005).

No manejo integrado, as medidas de controle começam a sere implementadas antes mesmo da implantação da cultura, passando por todo o ciclo de cultivo e se estendendo até a pós-colheita. Estas medidas podem ser aplicadas em âmbito nacional, a exemplo das leis quarentenárias, ou em nível regional ou local.

A seguir, serão discutidas diversas medidas visando reduzir os danos causados pelas fitobacterioses.

Leis quarentenárias

Diversas fitobacterioses de potencial importância não ocorrem no território nacional e algumas, embora estejam estabelecidas no país, ainda não estão amplamente disseminadas em todos os estados. Estas fitobacterioses são conhecidas como “pragas quarentenárias” ausentes e presentes, respectivamente (Tabelas 1 e 2). Devido à importância destas doenças e à necessidade de impedir seu estabelecimento no território nacional, a entrada e o transporte de materiais de origem vegetal, que potencialmente contenham estes patógenos, são regulamentados por lei.

Tabela1. Lista de procariotos quarentenários ausentes no Brasil (MAPA, 2016).

Fitobactérias	Outros Procariotos
<i>Burkholderia glumae</i>	Apple chat fruit phytoplasma
" <i>Candidatus Liberibacter africanus</i> "	Apple proliferation phytoplasma
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	Grapevine flavescencedorée phytoplasma
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	Palm lethal yellowing phytoplasma
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Peach rosette phytoplasma
<i>Erwinia amylovora</i>	Peach X-disease phytoplasma
<i>Pantoea stewartii</i>	Peach rosette phytoplasma
<i>Pectobacterium rhapontici</i>	Peach yellows phytoplasma
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>atrovaciens</i>	Pear decline phytoplasma
<i>Rhodococcus fascians</i>	<i>Spiroplasma citri</i>
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i> raça B	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>axonopodis</i>	
<i>Xanthomonas cassavae</i>	
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	
<i>Xanthomonas populi</i>	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>musacearum</i>	
<i>Xylophilus ampelinus</i>	

Tabela 2. Lista de fitobactérias quarentenárias presentes no território nacional, seus hospedeiros e atual distribuição no Brasil (MAPA, 2016).

Bactéria	Hospedeiro	Estado
" <i>Candidatus Liberibacter</i> spp."	Citros Murta	Minas Gerais, Paraná e São Paulo
<i>Ralstoniasolanacearum</i> raça 2	Bananeira Helicônia	Amapá, Amazonas, Pará, Pernambuco, Rondônia, Roraima e Sergipe
<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	Citros	Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Roraima, Santa Catarina e São Paulo
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>	Videira	Bahia, Ceará, Pernambuco e Roraima

Escolha da época de plantio

As fitobactérias necessitam de condições específicas para seu desenvolvimento, principalmente em relação à temperatura e umidade. Assim, para a maioria das fitobacterioses, é primordial evitar o plantio em período chuvoso e de elevada umidade do solo, pois estas condições favorecem a infecção, multiplicação e disseminação das bactérias (Costa & Ventura, 2010; Lopes & Duval, 2007).

Escolha do local de plantio

Antes de iniciar o plantio, é importante conhecer o histórico da área, evitando o cultivo em local onde tenha ocorrido a infestação da fitobactéria. Esta medida é importante, sobretudo para bactérias que possuem a capacidade de se manter no solo, como *Pectobacterium carotovorum* (podridão mole e talo oco), *Ralstonia solanacearum* (murcha bacteriana) e *Rhizobium radiobacter* (galha em coroa em roseira e videira) (Czajkowskiet al., 2011; Elphinstone, 2005; Kado, 2010; Lopes & Duval, 2007). Nestes casos, é recomendado realizar o plantio em áreas cujo solo possua boa drenagem e que não esteja sujeito à inundação.

Evitar plantios escalonados

Quando possível, deve-se evitar novos plantios próximos a áreas mais velhas. Esta medida é importante, principalmente para as fitobactérias que infectam folhas, pois podem ser facilmente disseminadas para as lavouras novas por meio de respingos d'água, aerossóis e tratos culturais (Costa & Ventura, 2010).

Utilizar genótipos resistentes

Quando disponível, deve-se utilizar genótipos com resistência à doença predominante na região. Esta medida de controle é desejável, por ser de fácil implantação e não causar impacto ambiental. Diversas cultivares resistentes a fitobacterioses foram testadas (Araújo et al., 2012; Félix et al., 2014) e outras já estão disponíveis comercialmente (Tabela 3). O uso de porta-enxertos resistentes a *R. solanacearum* também vem sendo estudado (Lopes & Boiteux, 2015) e, inclusive, na região serrana do Espírito Santo, têm sido amplamente utilizados, devido à alta ocorrência destas bactérias em áreas de cultivo de tomate.

Tabela 3. Alguns genótipos comercializados no Brasil, apresentando resistência a bacterioses.

Hospedeiro	Doença	Cultivares e híbridos*
Brócolis	Podridão negra	Hanabai
Cenoura	Queima das folhas	Mariana
Couve-brócolis	Podridão negra	Bibou, Piracicaba precoce verão, Ramoso Santana, Saiteki, Yahto
Couve	Podridão negra	Atsui, Bella, Gaudina, Juliana, Sabrina, Sarah, Savana, Sharon, Top Bunch, Viena
Espinafre	Podridão negra	Hulk
Feijão	Crestamento bacteriano	BRS Esplendor, BRS Notável
Milho	Enfezamento	BRS 1001, AS 3466, PL 6880, BRS 3003, BRS 3150, BRS 1030, Bozn Amarelo, Sintético Flint, Al Piratininga, AlBianco, CPATC-4, Caatingueiro, CMS 47
Pepino	Mancha angular	Caramba, Calypso, Exocet, Darlington, Eureka, Encantador, Merengue
Pimentão	Mancha bacteriana	Anabell, Dahra RX, Gianni, Gladiador, Híbrido commandant, Impacto, Magistral, Shakira
Repolho	Podridão negra	Bobcat, Fênix, Fuyutoyo, Rubyqueen, Suki, Musashi, Taishita, Takami,
Soja	Crestamento bacteriano	BR 4, CAC 1, FT 7 (Tarobá), FT 103, FT Cometa, FT Maracaju, IAC 15, IAS 5
Tomate	Pinta bacteriana	Híbrido aP 533, Híbrido Sm 16, Híbrido cienaga, Liberty, Tyna
Tomate	Mancha bacteriana	Híbrido aP 533, Híbrido aP 533
Tomate	Cancro bacteriano	Barão vermelho AG-561, Jumbo AG-592, Príncipe Gigante AG-590, Roquessa AG-591
Porta-enxerto de tomate	Murcha bacteriana	Endurance, Hawaii 799, Híbrido Guardiã, Híbrido Magnet, Híbrido Muralha, Híbrido Protetor, Woodstock

* Informações obtidas junto às empresas Feltrin, Hortiteres, Sakata, Seminis, Syngenta e Takii, que comercializam cultivares resistentes, e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Rotação de culturas

Consiste no cultivo de plantas não hospedeiras (geralmente plantas botanicamente diferentes), em sucessão à cultura. Esta medida é eficiente para fitobactérias que sobrevivem em restos de culturas, a exemplo de *X. campestris* pv. *campestris* (Kocks et al., 1998), *Xanthomonas* e *Pseudomonas* em tomateiro (Costa & Ventura, 2010) e *Acidovorax citrulli* (Oliveira, 2008). No entanto, é de difícil implementação em culturas perenes, como no caso de fruteiras.

Manejo da irrigação

Deve-se atentar para o sistema de irrigação, a qualidade e a quantidade da água. O sistema de irrigação por gotejamento reduz fitobacterioses de parte aérea, pois a água é importante para a disseminação e penetração (Lopes & Duval, 2005; Romeiro, 2005). Em cultivos de tomate industrial no estado de Goiás, tem sido priorizada a substituição do sistema de irrigação de pivô central pelo gotejo, visando à redução, dentre outras doenças, da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.). A irrigação por sulco deve ser evitada, principalmente em áreas onde foi constatada a presença de bactérias no solo, pois favorece a sua disseminação (Pérombelon & Kelman, 1980). A irrigação excessiva no início da formação dos tubérculos de batata deve ser evitada, pois facilita a penetração de *Streptomyces scabies*, aumentando a incidência da doença (Bruehl, 1987).

Deve-se evitar a reutilização de água residuária de lavadores de hortaliças. Esta operação é comum, principalmente nas culturas da batata, tomate e cenoura, onde pode facilmente disseminar *Pectobacterium*, *Streptomyces* sp. e *R. solanacearum* (Costa & Ventura, 2010; Mariano et al., 2001). Em viveiros de eucalipto, o uso de ultrafiltros para tratar água de reuso se mostrou eficiente para reduzir a quantidade de inóculo de *R. solanacearum* (Machado et al., 2013).

Revolvimento do solo

Esta prática pode contribuir para diminuir a incidência de várias fitobacterioses, principalmente daquelas causadas por bactérias aeróbicas, uma vez que cria um ambiente com menor concentração de oxigênio. Por outro lado, é pouco eficiente para *Pectobacterium*, que é uma bactéria anaeróbica facultativa. O revolvimento do solo acelera a decomposição dos restos de cultura, dificultando a sobrevivência de algumas fitobactérias.

Uso de material propagativo sadio

Diversas fitobactérias podem sobreviver e ser disseminadas por meio de sementes, mudas ou materiais de propagação vegetativa (tubérculos, báculos, toletes, manivas, etc.) (Tabela 4) (Fundecitrus, 2016; Kado, 2010; Mariano, 2001; Oliveira et al., 2001; Romeiro, 2005). Por isso, deve-se utilizar sementes e materiais propagativos isentos de fitobactérias, pela aquisição de materiais certificados por empresas idôneas.

Tabela 4. Exemplos de fitobacterioses disseminadas por material propagativo.

Hospedeiro	Material propagativo	Patógeno
Batata	Tubérculos	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicum</i>
Cana-de-açúcar	Toletes	<i>Leifsonia xyli</i>
Citros	Gemas	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>
Citros	Gemas	“ <i>Candidatos Liberibacter</i> ”
Feijão	Sementes	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Goiabeira	Mudas	<i>Erwinia psidii</i>
Mandioca	Manivas	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
Melão	Sementes	<i>Acidovorax citrulli</i>
Tomateiro	Mudas	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>Xanthomonas</i> spp.
Videira	Mudas	<i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i>
Videira	Báculos	<i>X. campestris</i> pv. <i>viticola</i>

Calagem e nutrição adequada das plantas

É necessário realizar a análise de solo e a calagem e adubação, conforme a recomendação. A deficiência ou excesso de nutrientes pode acarretar no desequilíbrio da formação das camadas de proteção da planta, facilitando a penetração da bactéria, principalmente daquelas que penetram via ferimentos (Lopes & Guedes, 2012).

Outro fator importante é a correção do pH do solo, por meio da aplicação de calcário (calagem), que garantirá uma maior disponibilidade de nutrientes, sobretudo de cálcio, que dá maior rigidez à lamela média das células, reduzindo os danos causados por bactérias pectinolíticas, como *P. carotovorum* (Czajkowski et al., 2011; Lopes & Guedes, 2012). Em estudos com aplicação de cálcio no manejo de doenças, verificou-se redução da podridão mole em tubérculos de batata e da podridão mole em couve-chinesa (Ngadze, 2012; Park, 1969). A aplicação de fosfito de cálcio e fosfito de potássio demonstrou efeito

satisfatório no controle da podridão mole em pimentão (*P. carotovorum*) (Silva et al., 2014).

O pH também pode ter efeito direto sobre as fitobactérias. A sarna comum da batata (*S. scabies*) tem maior severidade em solos com pH acima de 5,2, enquanto a sarna ácida (*S. acidiscabies*) ocorre principalmente em solo com pH em torno de 4,5 (Lambert & Loria, 1989). Portanto, a regulação do pH do solo é de grande importância para diminuir estas doenças.

Deve-se também evitar adubações com excesso de nitrogênio, pois os tecidos da planta ficam mais tenros, favorecendo a ocorrência de bacterioses, sobretudo das podridões moles (Czajkowskiet al., 2011).

Eliminação de plantas vivas doentes (*Roguing*)

A retirada de plantas sintomáticas visa eliminar a fonte de inóculo dentro da área, sendo recomendada para fitobactérias que provocam murchas, como *R. solanacearum*. Após o *roguing*, é recomendado isolar a área, para evitar a disseminação do patógeno junto com o solo infestado (Costa & Ventura, 2010). O *roguing* também tem sido utilizado no manejo do cancro cítrico (*X. citri* subsp. *citri*) e do *greening* ("*Candidatus Liberibacter* spp.") em áreas de citros (Belasque-Júnior et al., 2009; Fundecitrus, 2016).

Retirada de partes de plantas doentes

Esta prática é recomendada para bacterioses de parte aérea e consiste na retirada de folhas e ramos doentes, mantendo a planta na área. No caso da clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*), é recomendada a retirada de ramos sintomáticos (Fundecitrus, 2016). Para hortaliças, essa prática só deve ser realizada em pequenas lavouras, devido ao custo elevado.

Sistema de condução da lavoura

Deve-se utilizar um sistema de cultivo e condução das plantas que facilite a secagem das folhas. No caso de lavouras de tomate, a condução em fileira única, ao invés do sistema de "V" invertido, pode reduzir a incidência de manchas foliares (mancha e pinta) e cancro bacteriano, por reduzir a umidade nas folhas (Costa & Ventura, 2010). Em fruteiras, a poda de formação tende a manter a copa mais aberta, favorecendo sua secagem.

Evitar ferimentos

É uma importante medida para a redução de fitobacterioses, pois muitas bactérias penetram via ferimento. Portanto, deve-se tomar cuidado ao realizar os tratos culturais, como capina, desbrota e poda. Ferimentos provocados pelas desbrotas e colheitas em cultivo de tomate podem aumentar a incidência de cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) e talo oco (*P. carotovorum*) (Costa & Ventura, 2010). Em cultivo de citros, os ferimentos provocados por insetos, como a larva minadora (*Phyllocnistis citrella*), aumentam a incidência de cancro cítrico (*X. citri* subsp. *citri*) (Christiano et al., 2007) e, por isso, sempre que possível, seu controle deve ser realizado. Evitar ferimentos em órgãos carnosos, como no caso de hortaliças, reduz a incidência de podridões moles causadas por *Pectobacterium* (Czajkowskiet al., 2011).

Eliminar hospedeiro alternativo

Várias fitobactérias podem infectar e sobreviver em plantas daninhas que ocorrem nas lavouras. As fitobactérias *R. solanacearum* (Lopes et al., 2002), *Xanthomonas perforans* e *X. gardneri* (Araújo et al., 2015), *X. campestris* pv. *viticola* (Peixoto et al., 2007; Santos et al., 2014) e *A. citrulli* (Nascimento & Mariano, 2004; Oliveira et al., 2003; Santos & Viana, 2000) foram relatadas infectando plantas daninhas. Nestes casos, a eliminação destas plantas daninhas, dentro e no entorno das lavouras, é a medida recomendada para redução destas doenças.

Limpeza de implementos e ferramentas

A limpeza de implementos usados para o preparo da área de cultivo evita a disseminação de bactérias que habitam o solo, como *R. solanacearum* (Hayward, 1991), *Pectobacterium* (Czajkowski et al., 2011), *Streptomyces* e *Rhizobium*.

A limpeza de ferramentas de poda, maquinários de corte e demais materiais utilizados na colheita (escadas e caixas) pode reduzir a disseminação de fitobactérias de parte aérea, como *X. campestris* pv. *viticola* na videira (Naue et al., 2014), *L. xyli* em cana-de-açúcar (Hoy et al., 1999), *X. citri* subsp. *citri* em citros (Fundecitrus, 2016), *R. solanacearum* raça 2 em bananeira e *Erwinia psidii* na goiabeira. A limpeza deve ser feita com uso de sanitizantes, como amônia quaternária (Fundecitrus, 2016; Gillaspie Júnior & Teakle, 1989; Naue et al., 2014).

Evitar a reutilização de material usado na condução da cultura

Deve-se, sempre que possível, evitar a reutilização de materiais (mourões, estacas, arames, madeiramentos para barracão, bandejas de semeadura e transporte) utilizados na cultura anterior, sobretudo se ocorreu alta incidência de bacterioses (Costa & Ventura, 2010). Esta recomendação se aplica tanto para bactérias de parte aérea, como *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Miguel-Wruck et al., 2006), quanto para aquelas que habitam o solo, pois ambas podem ser disseminadas por estes materiais. Em culturas tutoradas como tomate e pimentão, recomenda-se que os tutores de bambu sejam substituídos por fitilho, que é descartável (Costa & Ventura, 2010).

Tratamento térmico de sementes e órgãos propagativos

A termoterapia consiste em submeter o órgão infectado a determinada temperatura e tempo, suficiente para eliminar a fitobactéria, porém sem causar danos ao material tratado. Tratamentos de materiais propagativos vêm apresentando resultados positivos para o controle de diversas fitobacterioses (Damann Júnior & Benda, 1983; Romeiro, 2005). A Tabela 5 apresenta exemplos de tratamento térmico para algumas fitobactérias.

Tabela 5. Tratamento térmico de sementes para erradicação de fitobactérias.

Hospedeiro	Fitobacteriose	Fitobactéria	Tratamento
Brássicas	Podridão negra	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	50° C por 30 min
Feijão	Crestamento bacteriano aureolado	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	70° C por 12 h
Melão	Mancha aquosa	<i>Acidovorax citrulli</i>	60° C por 20 min
Tomate	Cancro do tomateiro	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	21° C por 96 h
	Mancha pequena	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	52° C por 60 min
Cana-de-açúcar	Raquitismo da soqueira	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	52°C por 30 min ou 50°C por 2 h

Solarização

Este método tem sido pouco utilizado nas condições brasileiras, mas se aplica a pequenas áreas onde se deseja eliminar bactérias que habitam o solo, como *R. solanacearum* (Baptista et al., 2007; Ioannou, 2001).

Refrigeração

Esta medida é importante para reduzir a podridão mole em pós-colheita, causada por *P. carotovorum*, que ocorre principalmente em hortaliças carnosas (Czajkowskiet al., 2011).

Controle de insetos

Além de serem vetores de bactérias, os insetos podem causar ferimentos em plantas, que servem como porta de entrada para várias fitobactérias. O controle da mosca das frutas, vespas e abelhas, que visitam o ponto de abscisão das flores, provoca a redução considerável da transmissão de *R. solanacearum* em bananeira. O controle de minadores, como *Phyllocnistis citrella*, reduz consideravelmente a incidência de *X. citri* subsp. *citri* em plantas de citros (Fundecitrus, 2016). Para controle do *greening*, considerada hoje a principal doença da citricultura, é de extrema importância o controle do inseto vetor, o psilídio (*Diaphorina citri*), para evitar a disseminação da doença para outras plantas (Bassanesiet al., 2013; Fundecitrus, 2016).

Controle biológico

Consiste na utilização de organismos vivos para reduzir o inóculo do patógeno. É uma técnica bastante estudada e que necessita do conhecimento da biologia do agente de controle biológico e da fitobactéria, bem como da sua interação com os fatores ambientais. Existe um número considerável de produtos biológicos comerciais que proporcionam resultados positivos no controle de diversas fitobacterioses. O controle biológico por meio do uso de *R. radiobacter* K84, a qual produz uma bacteriocina (agrocina 84), apresenta efeito sobre *R. radiobacter* patogênica para diversas culturas. A aplicação de leveduras também tem sido estudada e vem apresentando potencial de controle da podridão mole em couve-chinesa (Mello et al., 2011) e de *A. citrulli* na cultura do melão (Mello et al., 2015).

Controle químico

O controle químico de fitobacterioses baseia-se na aplicação de fungicidas com efeito bactericida e/ou bacteriostático, indutores de resistência, antibióticos e inseticidas (discutido no item ‘Controle de insetos’) (Romeiro, 2005). Estes diferentes produtos têm sido testados no controle de diversas fitobacterioses, como mancha aquosa do melão (Sales Júnio et al., 2005; Sales Júnior et al., 2007), mancha branca do milho (Manerba et al., 2013), mancha bacteriana do tomateiro (Pontes et al., 2016), pinta bacteriana do tomateiro (Andrade et al., 2013) e cancro cítrico (Behlau et al. 2010). Nos últimos anos, foram desenvolvidos diversos produtos para o controle de fitobacterioses foliares, principalmente daquelas com potencial de causar perdas em culturas economicamente importantes).

Fungicidas protetores, normalmente os cúpricos, apresentam efeito bacteriostático e/ou bactericida e são amplamente utilizados para o controle preventivo de várias fitobacterioses que afetam a parte aérea de plantas. Em algumas culturas, após as operações de podas, é comum a aplicação de cobre, visando proteger os tecidos feridos contra infecções bacterianas. No entanto, o uso de produtos no controle de bacterioses deve ser realizado com cautela, devido à possibilidade de surgimento de populações resistentes do patógeno, como relatado para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Silva & Lopes, 1995) e *X. campestris* pv. *viticola* (Marques et al., 2009).

O manejo de fitobacterioses constitui um grande desafio para produtores e técnicos da área, conforme abordado neste capítulo. Por isso, o manejo integrado é fundamental para o sucesso na redução destas doenças, sobretudo nas condições climáticas encontradas no Brasil. Na Tabela 6, encontram-se exemplos de fitobacterioses de importância no Brasil e um breve resumo de seu manejo, baseado nas informações discutidas neste capítulo.

Tabela 6. Resumo das principais fitobacterioses no Brasil e das medidas gerais para seu manejo.

Fitobacteriose	Hospedeiro	Manejo
Cancro cítrico	Citros	Controle da larva minadora, <i>roguing</i> , aplicação de cobre
Cancro do tomateiro	Tomateiro	Descarte ou desinfestação do material usado ao longo da cultura, evitar ferimento, cultivares resistentes, aplicação de cobre
Cancro da videira	Videira	Material propagativo sadio, desinfestação de materiais de poda e variedades resistentes
Clorose variegada	Citros	Mudas sadias, controle de cigarrinhas e eliminação de ramos doentes
Crestamento bacteriano	Feijão	Cultivares resistentes, sementes sadias, acibenzolar-S-metil, aplicação decobre
Crestamento bacteriano	Soja	Cultivares resistentes, aplicação de cobre
Crestamento bacteriano	Mandioca	Cultivares resistentes, material propagativo sadio
Galha da coroa	Vários	Mudas sadias, controle biológico
<i>Greening</i>	Citros	Mudas sadias, controle do psílídeo vetor, <i>roguing</i>
Mancha aquosa	Cucurbitáceas	Sementes certificadas, evitar ferimento, aplicação de cobre
Mancha bacteriana	Tomateiro	Cultivar resistente, sementes sadias, irrigação localizada, rotação de cultura, aplicação de cobre, acibenzolar-S-metil e casugamicina
Moko da bananeira	Bananeira	Leis quarentenárias, desinfestação de facão usado para colheita
Murcha bacteriana	Solanáceas	Rotação de cultura, limpeza de implementos, solo drenado, porta-enxertos resistentes
Murcha bacteriana	Eucalipto	Mudas sadias, qualidade da água de irrigação em viveiros
Pinta bacteriana do tomateiro	Tomateiro	Sementes sadias, irrigação localizada, rotação de cultura, aplicação de cobre, acibenzolar-S-metil
Podridão negra	Brássicas	Sementes certificadas, rotação de cultura, cultivares resistentes, aplicação de cobre

Tabela 6. Continuação

Fitobacteriose	Hospedeiro	Manejo
Podridão mole	Vários	Rotação de cultura, aplicação de cobre, refrigeração, evitar fermentos
Raquitismo da soqueira	Cana-de-açúcar	Termoterapia dos toletes e desinfestação de lâminas e facões
Sarna comum	Batata	Evitar pH do solo entre 4,5 - 5,5, uso de batata semente certificada
Seca das ponteiros	Goiabeira	Mudas sadias, desinfestação de ferramentas para poda e eliminação de ramos doentes

6. Bibliografia

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 952 p.
- AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Brasília: Ministério da Agricultura, Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVEIRA, P. R.; RIOS, J. A.; OLIVEIRA, J. R.; MARIANO, R. L.R. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 28-34, 2013.
- ARAÚJO, E. R.; COSTA, J. R.; PONTES, N. C.; QUEZADO-PONTES, N. C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Estabilidade da resistência de 'Ohio 8245' e 'Heinz 9553' à mancha bacteriana do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 99-105, 2012.
- ARAÚJO, E. R.; COSTA, J. R.; PONTES, N. C.; QUEZADO-DUVAL, A. M. *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* associated with bacterial leaf spot on weeds in Brazilian tomato fields. **European Journal of Plant Pathology**, v. 143, p. 543-548, 2015.
- BAPTISTA, M. J.; REIS JUNIOR, F.B.; XAVIER, G.R.; ALCÂNTARA, C.; OLIVEIRA, A. R.; SOUZA, R. B.; LOPES, C. A. Eficiência da solarização e biofumigação do solo no controle da murcha-bacteriana do tomateiro no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 933-938, 2007.
- BASSANESI, R. B.; MONTESINO, L. H.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P. T.; GOTTWALD, T. R.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. **Plant Disease**, v. 97, p. 789-796, 2013.
- BEHLAU, F.; AMORIM, L.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; LEITE J. R. P.; GRAHAM, H. J.; GOTTWALD, T. R. Annual and polyetic progression of citrus canker on trees protected with copper sprays. **Plant Pathology**, v. 59, p. 1031-1036, 2010.
- BELASQUE- JÚNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J. C.; FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE JUNIOR, R. P.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas

- sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 137-145, 2009.
- BRUEHL, G. W. S. **Soilborne plant pathogens**. New York: MacMillan Publishing Company, 1987.368 p.
- CHRISTIANO, R. S. C.; PRIA, M. D.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PARRA, J. R. P.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Effect of citrus leaf-miner damage, mechanical damage and inoculum concentration on severity of symptoms of Asiatic citrus canker in Tahiti lime. **Crop Protection**, v. 26, p. 59-65, 2007.
- COSTA, H.; VENTURA, J. A. Doenças do tomateiro no estado do Espírito Santo- Reconhecimento e manejo. In: INCAPER. (Org.). **Tomate**. Vitória: Incaper, 2010. v. 1, p. 227-318.
- CZAJKOWSKI, R.; PÉROMBELON, M. C. M.; VAN VEEN, J. A.; VAN DER WOLF, J. M. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. **Plant Pathology**, v.60, p. 999-1013, 2011.
- DAMANN JÚNIOR, K. E.; BENDA, G. T. A. Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. **Plant Disease**, v. 67, p.966-967, 1983.
- ELPHINSTONE, J. G. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: ALLEN, C., PRIOR, P., HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p. 9-28.
- FÉLIX, K. C. S.; OLIVEIRA, W. J.; MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. Lettuce genotype resistance to 'soft rot' caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **Scientia Agricola**, v. 71, p. 287-291, 2014.
- FUNDECITRUS (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA). Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/>. Acesso em: 29 abr. 2016.
- GILLASPIE JÚNIOR, A. G.; TEAKLE, D. S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B. T.; GILLASPIE JUNIOR, A. G. (Eds.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 59-80.
- HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 65–87, 1991.
- HOY, J. W.; GRISHAM, M. P.; DAMANN, K. E., Jr. Spread and increase of ratoonstunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant Disease**, v. 83, p. 1170-1175, 1999.
- IOANNOU, N. Integrating soil solarization with grafting on resistant rootstocks for management of soil-borne pathogens of eggplant. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, p. 396-401, 2001.
- KADO, C. I. **Plant bacteriology**. St. Paul: APS Press, 2010. 336 p.
- KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Princípios gerais de controle. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Org.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Ceres, 2011. p. 307-324.
- KOCKS, C. G.; RUISSSEN, M. A.; ZADOKS, J. C.; DUIJKERS, M. G. Survival and extinction of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in soil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 911-923, 1998.
- LAMBERT, D. H.; LORIA, R. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 393-396, 1989.
- LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 125-130, 2015.
- LOPES, C. A.; DUVAL, A. M. Q. Epidemiologia e controle das bacterioses das hortaliças. In: ZAMBOLIM, L.; LOPES, C. A.; PICANÇO, M. C.; COSTA, H. (Org.). **Manejo integrado de**

- doenças e pragas** - hortaliças. Visconde do Rio Branco: Surpema Gráfica e Editora, 2007. p. 115-162.
- LOPES, C. A.; DUVAL, A. M. Q. Doenças Bacterianas. In: LOPES, C. A.; AVILA, A. C. (Org.). **Doenças do tomateiro**. 2. ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p. 53-73.
- LOPES, C. A.; GUEDES, I. M. R. Papel da nutrição mineral na manifestação das doenças bacterianas de batata e tomate. In: GEAFIP. (Org.). **Nutrição no manejo de doenças de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2012. p. 163-176.
- LOPES, C. A.; POLTRONIERI, L. S.; POLTRONIERI, M. C. New hosts of *Ralstonia solanacearum* in the Brazilian Amazon. **Bacterial Wilt Newsletter**, v. 17, p. 2-3, 2002.
- MACHADO, P. S.; ALFENAS, A. C.; ALFENAS, A. C.; COUTINHO, M. M.; SILVA, C. M.; MOUNTEER, A. H.; MAFFIA, L. A.; FREITAS, R. G.; FREITAS, C. S. Eradication of plant pathogens in forest nursery irrigation water. **Plant Disease**, v. 97, p. 780-788, 2013.
- MANERBA, F. C.; SOUZA, P. E.; PINHO, R. G. V.; DORNELAS, G. A.; MONTEIRO, F. P. Antibióticos no controle da mancha branca do milho. **Comunicata Scientiae**, v. 4, p. 361-367, 2013.
- MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S. V.; MACHADO, M. A.; TOTH, I.; SALMOND, G.; FOSTER, G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 614-629, 2012.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; OLIVEIRA, I. S.; PEIXOTO, A. R. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S. M.; BARROS, R. (Org.). **Desafios da proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, 2001. p. 141-169.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO) 2016. Disponível: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 29 abr. 2016.
- MARQUES, E.; UESUGI, C. H.; FERREIRA, M. A. S. V. Sensitivity to copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 406-411, 2009.
- MELO, E. A.; MARIANO, R. L. R.; LARANJEIRA, D.; SANTOS, L. A.; GUSMÃO, L. O.; SOUZA, E. B. Efficacy of yeast in the biocontrol of bacterial fruit blotch in melon plants. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p. 56-64, 2015.
- MELLO, M. R. F.; SILVEIRA, E. B.; VIANA, I. O.; GUERRA, M. L.; MARIANO, R. L. R. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 78-83, 2011.
- MIGUEL-WRUCK, D. S.; OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S.; DHINGRA, O. D. Eliminação de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em estacas de bambu infestadas artificialmente. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 373-375, 2006.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, E. I. Hospedeiros alternativos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 345-349, 2004.
- NAUE, C. R.; COSTA, V. S. O.; BARBOSA, M. A. G.; BATISTA, D. C.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* on grapevine cultivation tools and water: survival and disinfection. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, p. 451-458, 2014.
- NGADZE, E. **Identification and control of potato soft rot and blackleg pathogens in Zimbabwe**. 2012, 165f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – University of Pretoria, Pretoria.
- OLIVEIRA, A. **Colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro e sobrevivência em restos de cultura e no solo**. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

- OLIVEIRA, I. S.; SALES JÚNIOR, R.; MARIANO, R. L. R. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*: método de isolamento e transmissão por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 302, 2001.
- OLIVEIRA, I. S.; SALES JÚNIOR, R.; MARIANO, R. L. R. Ocorrência da mancha-aquosa causada por *Acidovoraxavenaesubsp. citrulli*, em melão-pepino no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 686, 2003.
- PARK, S. K. Studies in the relationship between Ca nutrient and soft rot disease in Chinese cabbage. **Research Report to Rural Development Administration**, v. 12, p. 63-70, 1969.
- PEIXOTO, A. N.; MARIANO, R. L. R.; MOREIRA, J. O. T.; VIANA, I. O. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.161-164, 2007.
- PÉROMBELON, M. C. M.; KELMAN, A. Ecology of the soft rot erwinias. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 361-387, 1980.
- PONTES, N. C.; LOPES, C. A. Sintomatologia de doenças bacterianas em plantas. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; PEREIRA, O. L. (Org.). **O essencial da fitopatologia: agentes causais**. Viçosa: UFV, 2012. v. 1, p. 179-202.
- PONTES, N. C.; NASCIMENTO, A. R.; GOLYSKI, A.; MAFFIA, L. A.; OLIVEIRA, J. R.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Intervals and number of applications of acibenzolar-s-methyl for the control of bacterial spot on processing tomatoes. **Plant Disease**, 2016 (aceito)
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2005. 417 p.
- SALES JÚNIOR, R.; PONTES FILHO, F.S.T.; NUNES, G. H. S.; TORRES, G. R. C. Eficiência de Acybenzolar-S-Methyl e oxicleto de cobre no controle de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha-aquosa do meloeiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, p. 66-70, 2007.
- SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, I. S.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, G. F.; NUNES, G. H. S. Kasugamycin and copper oxichloride effect on bacterial blotch of melon. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 295-298, 2005.
- SANTOS, M. M.; PEIXOTO, A. R.; PESSOA, E. S.; GAMA, M. A.; MARIANO, R. L. R.; BARBOSA, M. A. G.; PAZ, C. D. Identificação de potenciais plantas hospedeiras alternativas de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, v. 44, p. 595-598, 2014.
- SANTOS, A. A.; VIANA, F. M. **Mancha-aquosa do melão**. Fortaleza: EMBRAPA-SPI, 2000. 2 p.
- SILVA, V. L.; LOPES, C. A. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a cobre em tomateiros pulverizados com fungicidas cúpricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 85-89, 1995.
- SILVA, M. S.; CARVALHO, F. S. Q.; SILVA, J. R.; LINS, S. R. O.; OLIVEIRA, S.M.A. Uso de antagonistas e produtos alternativos no manejo pós-colheita de podridão mole em pimentão. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 718-725, 2014.
- WHETZEL, H. H. The terminology of phytopathology. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT SCIENCES, 2., Ithaca, USA. **Proceedings ...** Ithaca: Cornell University, 1929. p. 1204-1215.

Mancha Angular das Anacardiáceas

Marco Aurélio Siqueira da Gama

Adriano Márcio Freire Silva

Edilaine Alves de Melo

Alessandra Jackeline Guedes de Moraes

Rosa de Lima Ramos Mariano

1. Importância socioeconômica das anacardiáceas

A família Anacardiáceae é composta por 81 gêneros e aproximadamente 800 espécies (Pell, 2009), as quais apresentam distribuição pantropical, com algumas espécies ocorrendo em regiões temperadas (Cronquist, 1981). Nesta família são encontradas fruteiras, espécies utilizadas para ornamentação e plantas para extração de madeira. Dentre as espécies frutíferas destacam-se: mangueira (*Mangifera indica* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), cajazeiras, umbuzeiras e seriguelas (*Spondias* spp.). A aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e a aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) são exemplos de espécies ornamentais e que apresentam madeira de boa qualidade, respectivamente (Souza & Lorenzi, 2005).

Entre as Anacardiáceas, a mangueira, o cajueiro e os cajás destacam-se devido à elevada importância socioeconômica. A mangueira é uma planta nativa da Índia, tendo se espalhado pelo mundo a partir do século XVI devido à abertura do comércio marítimo entre Europa e Ásia. Por volta do ano de 1700 chegou ao Brasil por meio de mudas trazidas da Índia, e devido às condições climáticas favoráveis, espalhou-se por quase todas as regiões do país (Souza et al., 2002).

Os maiores produtores mundiais de manga são Índia, China, Tailândia, México e Indonésia, respectivamente. Dentre os países exportadores, o Brasil

ocupa a quarta colocação, ficando atrás da México, Índia, Tailândia e Peru (FAO, 2016).

No Brasil, os principais estados produtores de manga são Bahia, Pernambuco, São Paulo, Minas Gerais, Ceará, Rio Grande do Norte e Sergipe (IBGE, 2016). A região Nordeste caracteriza-se pela produção de mangas para a exportação, destacando-se a região do vale do São Francisco, a qual é responsável por quase todas as exportações nacionais da fruta (Silva, 2014). Em 2014 o volume exportado foi cerca de 133 mil toneladas, o que representou uma receita de aproximadamente US\$ 16 milhões (Anuário Brasileiro e Fruticultura, 2015).

O cajueiro é uma planta tropical, originária do Brasil, reconhecido como centro de origem da espécie, sendo dispersa em quase todo território nacional (Araújo & Silva, 1995), onde se destaca pela domesticação e elevado aproveitamento econômico (Melo & Bleicher, 2002). Por sua vez, a cajucultura é uma atividade de fundamental importância socioeconômica para a região Nordeste, devido aos empregos diretos que gera, dos quais 35 mil no campo e 15 mil na indústria, além de 250 mil empregos indiretos nos dois segmentos. Para o semiárido nordestino, a importância é ainda maior, pois os empregos do campo são gerados na entressafra das culturas tradicionais como milho, feijão e algodão, reduzindo, assim, o êxodo rural (CODEVASF, 2012).

Dentre os principais países produtores de amêndoas de caju do mundo destacam-se o Vietnã, Nigéria, Índia e Costa do Marfim (FAO, 2016). No Brasil, a região Nordeste é a principal produtora de amêndoas, sendo responsável por aproximadamente 106.000 toneladas de castanhas, produzidas na safra de 2014. Nesta safra, os principais estados produtores foram Ceará, Rio Grande do Norte, Piauí, Bahia, Maranhão e Pernambuco (IBGE, 2016).

A produção nacional de amêndoa destina-se tradicionalmente ao mercado externo, sendo os Estados Unidos, Canadá e os países baixos responsáveis por importar cerca de 80% da amêndoa brasileira (CONAB, 2016). Adicionalmente, em 2015, as exportações brasileiras de castanha de caju atingiram a cifra de 40.826 milhões de dólares (SECEX, 2015), demonstrando o valor desta cultura para o agronegócio.

No Brasil e, principalmente no Nordeste, o cajá, o umbu e a seriguela apresentam importância tanto econômica, quanto social, diante da crescente comercialização de seus frutos e produtos processados em mercados, supermercados e restaurantes da região. Todas essas fruteiras são exploradas de forma extrativista, mas apresentam grande potencial de exploração agroindustrial. Ainda em processo de domesticação, estas espécies produzem

frutos do tipo drupa, com aroma e sabor agradáveis, de boa qualidade nutritiva, desejados para o consumo como fruta fresca ou na forma processada como polpa, sucos, doces, néctares, picolés e sorvetes (Souza, 1998).

O aumento das áreas de cultivo, aliado às condições ambientais favoráveis e ao uso de variedades e cultivares suscetíveis e ao manejo inadequado, tem propiciado o aumento do número e intensidade das doenças nos polos de produção de frutas do semiárido nordestino. Nesse contexto, atenção especial deve ser dada à mancha angular, causada por bactérias do gênero *Xanthomonas* Dowson. Essa doença incide sobre a parte aérea de diversas espécies de Anacardiáceas, comprometendo diretamente a qualidade dos frutos produzidos e, conseqüentemente, reduzindo consideravelmente o valor da produção.

2. Etiologia da mancha angular

A mancha angular foi detectada pela primeira vez em mangueiras na África do Sul por Doidge (1915), o qual isolou uma bactéria pigmentada (amarela) e a classificou como *Bacillus mangiferae* Doidge. Em seguida, a bactéria foi reclassificada como *Erwinia mangiferae* (Doidge) Bergey et al. (Breed et al. 1957). Na Índia, Patel et al. (1948b) verificaram a ocorrência de sintomas em folhas e frutos de mangueiras similares aos descritos por Doidge (1915). No entanto, devido a diferenças de algumas características entre a linhagem isolada na África do Sul e a linhagem isolada na Índia, incluindo a coloração desta última, a qual era branca, Patel et al. (1948b) propuseram a criação de uma nova espécie: *Pseudomonas mangiferae-indicae* Patel et al. (1948a).

Na década de 70, Robbs et al. (1974) classificaram o patógeno em um outro gênero, resultando no epíteto *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Patel et al.) Robbs et al. Levando-se em consideração a variabilidade patogênica entre isolados de uma coleção mundial obtidos de vários gêneros de Anacardiáceas e com base na divergência evolucionária dos genomas, observada por polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), foi verificado a formação de três grupos geneticamente distintos e relacionados aos grupos 9.5, 9.6 e 9.7 de *X. axonopodis* Starr e Garces *sensu* Rademaker et al. (2005). Assim, foi proposta a reclassificação de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* em três patovares de *X. axonopodis*, a saber, *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*, *X. axonopodis* pv. *anacardii* e *X. axonopodis* pv. *spondiae* (Ah-You et al. 2007a).

Posteriormente, análises de sequências multilocus (MLSA), AFLP e hibridização DNA-DNA, demonstraram relações filogenéticas congruentes do

pv. *mangiferaeindicae* com isolados de *X. axonopodis* subgrupo 9.5, o qual inclui *X. axonopodis* pv. *citri* Vauterin et al. De forma similar, o pv. *anacardii* responsável pela mancha angular do cajueiro no Brasil, foi incluído em *X. axonopodis* subgrupo 9.6 (sinonímia *X. fuscans* Schaad), enquanto o pv. *spondiae* não apresentou uma posição definida. Dados de estabilidade térmica da reassociação do DNA confirmaram os resultados obtidos por meio de MLSA e AFLP, demonstrando que os pvs. *mangiferaeindicae* e *anacardii* possuem níveis de similaridade consistentes, sendo membros da mesma espécie (Ah-You et al. 2009). Estes dados também apoiaram a elevação de *X. axonopodis* pv. *citri* ao nível de espécie como *X. citri* (ex Hasse) Gabriel (Schaad et al., 2005) e, por sua vez, a reclassificação dos pvs. *mangiferaeindicae* e *anacardii* como patovares de *X. citri*, a saber *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* e *X. citri* pv. *anacardii*.

É importante esclarecer que, até o momento, esses últimos epítetos não foram validados pelo Comitê para Taxonomia de Bactérias Fitopatogênicas (Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria) da Sociedade Internacional de Patologia de Plantas (International Society of Plant Pathology) por não estarem de acordo com as normas 17 e 21 do padrão internacional para classificação de patovares de fitobactérias (International Standards for Naming Pathovars of Plant Pathogenic Bacteria), as quais determinam que novas combinações sejam acompanhadas por descrições formais e designadas como comb. nov., respectivamente (Bull et al., 2012). Por isso, neste capítulo as bactérias patogênicas às Anacardiáceas são tratadas como patovares de *X. axonopodis* ao invés de serem tratadas como patovares de *X. citri*.

3. Isolados pigmentados versus apigmentados

Desde a primeira ocorrência da mancha angular, isolados pigmentados vem sendo obtidos de tecidos de mangueiras apresentando sintomas da mancha angular na África do Sul, Brasil, Estados Unidos e Ilhas Reunião. Após os diversos estudos, tais isolados foram considerados como patógenos casuais em mangueiras (Gagnevin & Pruvost, 2001; Ah-You et al., 2007a), embora não tenham sido incluídos nos estudos que reclassificaram *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* como *X. axonopodis* pv. *anacardii*, *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* e *X. axonopodis* pv. *spondiae* (Ah-You et al., 2007a; Ah-You et al., 2009). Além disso, desde 2003, isolados pigmentados vem sendo obtidos de folhas e frutos de cajueiro no Brasil, os quais têm sido classificados provisoriamente como *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Viana et al., 2005; Viana et al., 2006a).

Poucos estudos analisaram o relacionamento entre isolados pigmentados de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* obtidos de mangueira e cajueiro, e os patovares de *X. axonopodis* patogênicos as Anacardiáceas. Contudo, os resultados obtidos até o momento indicaram que os isolados pigmentados são firmemente relacionados a *X. axonopodis* pv. *anacardii* (Gama et al., 2011). Por meio da análise do perfil de restrição da região espaçadora 16S-23S de isolados pigmentados e apigmentados oriundos de mangueiras e de *X. axonopodis* pv. *anacardii* (isolado IBSBF 1508), verificou-se o agrupamento desse último com os isolados pigmentados oriundos de mangueira, demonstrando uma estreita relação entre eles (Destéfano et al., 2001).

Análises de rep-PCR (ERIC e BOX-PCR em conjunto), demonstraram que isolados pigmentados de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* e *X. axonopodis* pv. *anacardii* apresentam similaridade de 55%, indicando uma estreita associação entre eles. Inoculações em folhas de cajueiro com isolados dessas duas bactérias induziram os mesmos sintomas, demonstrando a estreita relação entre esses isolados, independente da hospedeira de origem e da presença ou ausência de pigmento. Assim, estes dados indicaram que os isolados pigmentados de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* apresentam-se possivelmente como uma forma variante de *X. axonopodis* pv. *anacardii*, sugerindo especificidade destes isolados em relação ao cajueiro (Gama et al., 2011). No entanto, como o posicionamento taxonômico dos isolados pigmentados ainda não foi definido, esses isolados são tratados como *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* neste capítulo.

Em aroeira, cajá e cajarana apenas colônias apigmentadas tem sido isoladas e, embora essas espécies de Anacardiáceas estejam presentes no Brasil, nenhuma ocorrência foi registrada até o momento. Além disso, isolados de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* também são patogênicos a aroeira e a mangueira quando inoculados artificialmente (Gama et al., 2011), demonstrando que essas Anacardiáceas podem fazer parte do ciclo da doença como hospedeiras alternativas desses isolados.

4. Ocorrência e distribuição da mancha angular no mundo e no Brasil

Desde os primeiros registros até os dias atuais, os sintomas da mancha angular em mangueiras já foram constatados na Austrália, Brasil, Emirados Árabes Unidos, Filipinas, Estados Unidos, Ilhas Comores, Ilhas Maurício, Ilhas Reunião, Índia, Japão, Malásia, Nova Caledônia, Paquistão, Quênia, Tailândia, Taiwan (Gagnevin & Pruvost, 2001), Benin (Afounda et al., 2013), Burkina Faso

(Zombre et al., 2016), Gana (Pruvost et al., 2011), Mianmar (Ah-You et al., 2007b) e República do Mali (Pruvost et al., 2012).

No Brasil, o primeiro registro desta enfermidade foi realizado por Robbs (1955) em levantamento efetuado no Distrito Federal, embora, o referido autor não deixasse claro o hospedeiro, fazendo parecer que a ocorrência do patógeno naquela região estava associada à mangueira. Em alusão aos contornos angulosos das manchas características da enfermidade, o citado autor deu-lhe o nome de mancha angular. Atualmente esta enfermidade também é conhecida como cancro bacteriano ou bacteriose da mangueira (Ah-You et al., 2007a; Robbs & Rodrigues Neto, 1999).

No Nordeste, a primeira ocorrência da mancha angular foi realizada por Robbs et al. (1978) em mangueiras no estado do Ceará, não tendo sido feita referência à sua ocorrência em cajueiros, naquela ocasião. Posteriormente, Robbs et al. (1981) registraram a ocorrência desta bacteriose causando lesões angulares em folhas de cajueiros na região Nordeste. Além disso, Papa et al. (2001) relataram a ocorrência da mancha angular em cajueiro no município de Selviria, no Estado do Mato Grosso do Sul. Além do Brasil, a ocorrência natural da mancha angular do cajueiro foi detectada apenas em Burkina Faso (África Ocidental) (Zombre et al., 2016).

Em 2003, além da usual mancha-angular, manchas atípicas causadas por isolados pigmentados de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* foram observadas em folhas e frutos de cajueiro em pomares do estado do Piauí (Viana et al., 2006a) e, devido à ocorrência de sintomas distintos da mancha angular, uma nova doença foi descrita em cajueiro: a mancha de xanthomonas (Viana et al., 2005). Além do Piauí, a mancha de xanthomonas também foi observada no Ceará, em Minas Gerais (Viana et al., 2005; Viana et al., 2006a; Viana et al., 2006b) e em São Paulo (Gama et al., 2011).

5. Sintomatologia

Os sintomas causados por *X. axonoposis* pv. *mangiferaeindicae* em mangueiras são mais comuns em folhas e frutos (Figura 1), porém toda planta pode ser afetada. Nas folhas, os sintomas caracterizam-se como pequenas lesões encharcadas delimitadas pelos vasos, as quais se tornam elevadas, escurecidas e algumas vezes com halo clorótico. Nos frutos, os sintomas característicos são lesões escuras, deprimidas e arredondadas, com exsudações gomosas. Nesses casos, é frequentemente observado um padrão de infecção em forma de lágrima. Às vezes os frutos apresentam apenas depressões, no entanto, há deterioração da

polpa, causando descoloração e podridão da mesma. Nas infecções mais graves e geralmente em cultivares mais suscetíveis, são observados cancrios em galhos e ramos. Adicionalmente, a mancha angular da mangueira não é sistêmica e não afeta a raiz (Gagnevin & Pruvost, 2001; Ah-You, et al., 2007a).

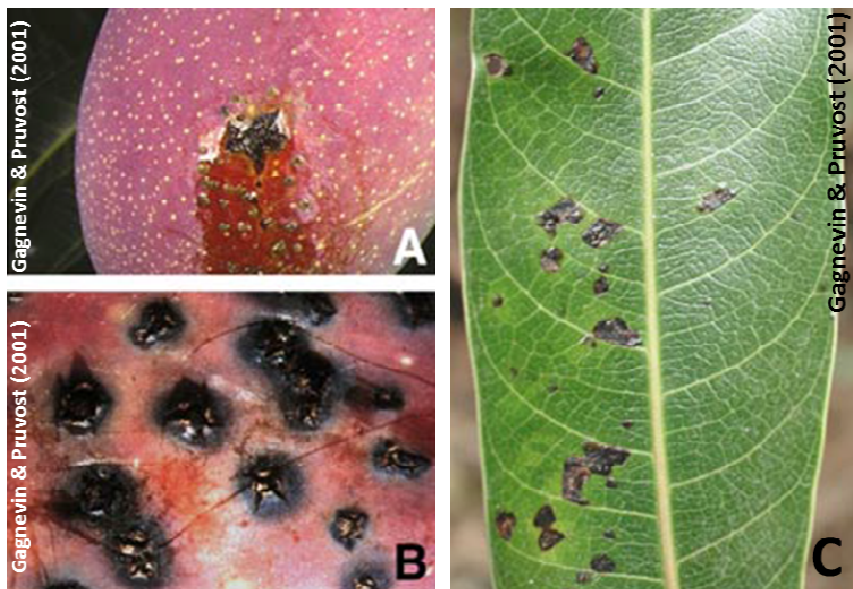


Figura 1. Sintomas da mancha angular da mangueira causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* em frutos (A e B) e folha (C).

Inoculações artificiais demonstraram que *X. axonopodis* pv. *anacardii* também é capaz de infectar a mangueira. No entanto, diferentemente das lesões provocadas por *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*, *X. axonopodis* pv. *anacardii* provoca manchas necróticas e achatadas de coloração marrom escura a preta nas folhas. No fruto, é observado um apodrecimento interno da polpa (Ah-You et al., 2007a). Adicionalmente, no Brasil, a mancha angular da mangueira apresenta pouca importância e depende das condições climáticas para o desenvolvimento e estabelecimento da doença (Barbosa et al., 2000).

Em cajueiros, *X. axonopodis* pv. *anacardii* foi descrita inicialmente apenas como agente causal de manchas angulares de coloração pardo-escuro em folhas (Ah-You et al., 2007a) (Figura 2A). Posteriormente, foi demonstrado que tanto *X. axonopodis* pv. *anacardii* quanto isolados pigmentados de *X. campestris* pv.

mangiferaeindicae são capazes de induzir a mesma sintomatologia em folhas e ramos de cajueiros (Gama et al., 2011).

Os sintomas da mancha de xanthomonas podem ser observados principalmente em folhas e frutos, podendo ocorrer também em ramos jovens. Nas folhas, embora o limbo foliar possa apresentar manchas angulares, os sintomas mais característicos encontram-se nas nervuras, as quais se mostram escuras (Figura 2B). O escurecimento passa da nervura principal para as secundárias. Enquanto o patógeno coloniza os vasos foliares livremente, essas mesmas nervuras impedem o avanço da bactéria no limbo foliar, motivo pelos quais as manchas nesse local são pequenas e angulares e, muitas vezes, bem próximas às nervuras (Viana et al., 2006b). As lesões foliares progridem em direção aos ramos e caule podendo ocasionar seca dos ponteiros (Gama et al., 2009) (Figura 2C). O fruto apresenta lesões encharcadas, as quais se transformam em necroses escuras, disforme, semelhante a uma queimadura (Viana et al., 2006b) (Figura 2D).

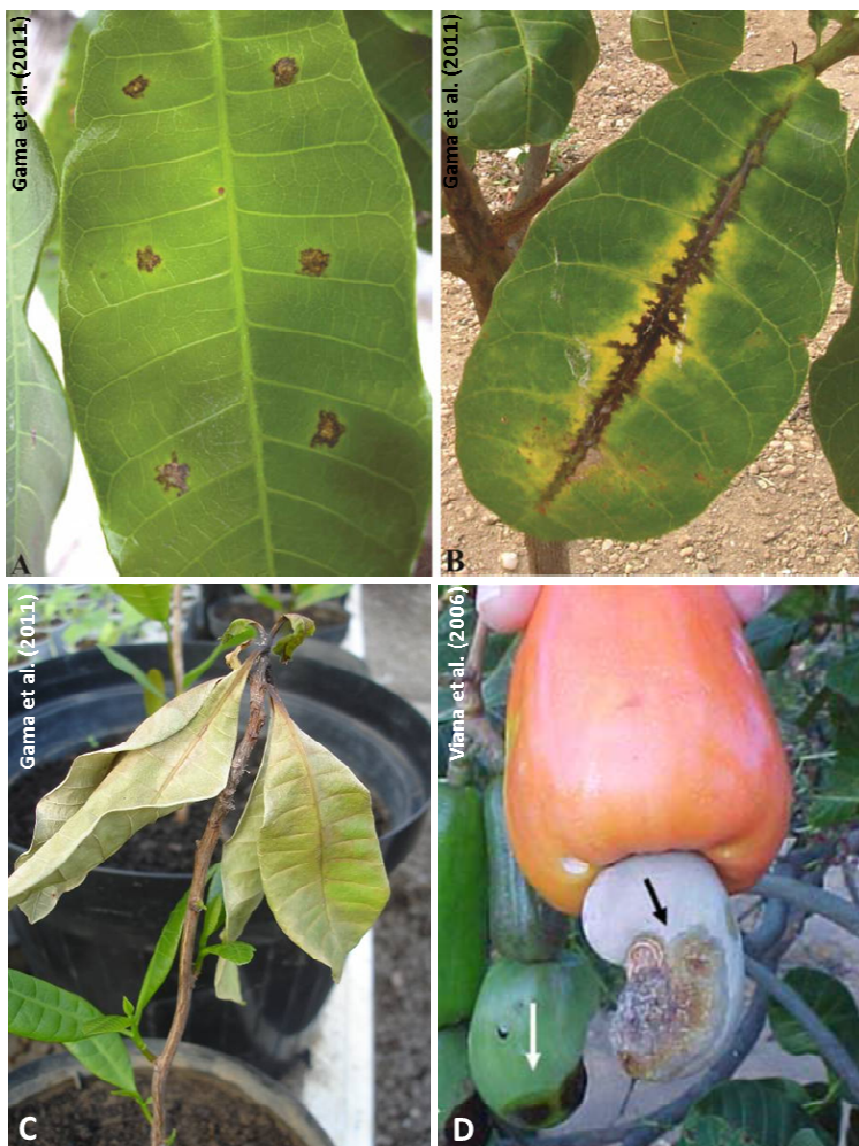


Figura 2. Sintomas da mancha angular em folha (A) e da mancha de xanthomonas sem folha (B), ramo (C) e fruto de cajueiro causada por isolados pigmentados e apigmentados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *anacardii*.

Até recentemente não existiam relatos de infecções naturais em cajueiro causadas por *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*. No entanto, esta bactéria foi recentemente reportada causando infecção sob condições naturais em cajueiro em Burkina Faso. Além da mancha angular nas folhas (Figura 3A), também foram reportadas lesões nos ramos (Figura 3B) e manchas encharcadas no fruto (Figura 3C) e no pseudofruto (Figura 3D) (Zombre et al., 2016).

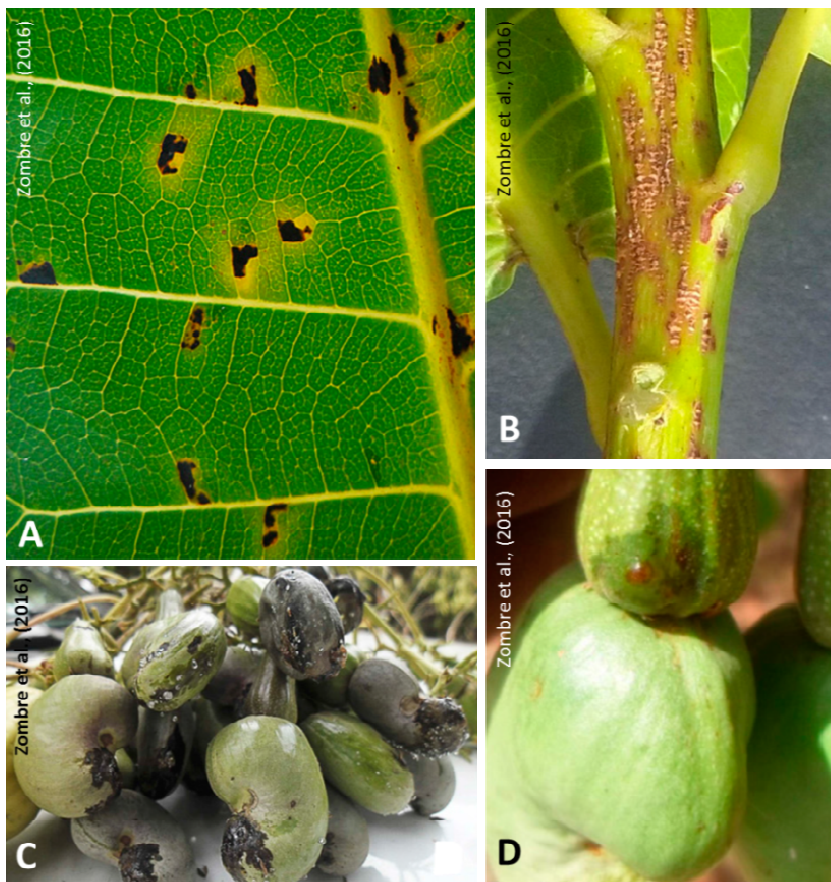


Figura 3. Sintomas da mancha angular causada por isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* em folha (A), caule (B), fruto (C) e pseudofruto (D) de cajueiro.

Em cajarana (*Spondias cytherea* Sonn.), isolados de *X. axonopodis* pv. *spondiae* provoca lesões pequenas, angulares e encharcadas, que se estendem e eventualmente coalescem. As lesões podem se tornar marrons, necróticas, planas e escuras, por vezes, delimitada pelas nervuras. Em hastes, são formadas lesões encharcadas, que se transformam em cancos. Também tem sido observadas exsudações de goma alaranjada escorrendo dos galhos com cancro, a grande quantidade de ramos com cancro pode induzir a morte das árvores. Lesões em frutos não têm sido relatadas. O cajá (*Spondias mombin* L.) apresenta sintomas similares, mas aparentemente é bem menos suscetível ao patógeno. Até o momento não foram detectadas infecções em mangueiras ou cajueiros causadas por *X. axonopodis* pv. *spondiae* (Ah-You et al., 2007).

6. Epidemiologia e controle

A maioria dos estudos incluindo etiologia, epidemiologia, ecologia e controle foram realizados com a mancha angular da mangueira. Neste hospedeiro, *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* sobrevive eficientemente em lesões foliares e em cancos nos ramos. A incidência da doença nos frutos é fortemente correlacionada com a severidade nas folhas, observada seis meses antes da frutificação. A presença de água livre permite a liberação e redistribuição da bactéria a partir de rupturas na epiderme, sendo um pré-requisito para infecção (Gagnevin & Pruvost, 2001; Manicon & Pruvost, 1994; Robbs & Rodrigues Neto, 1999). A disseminação da doença a longas distâncias ocorre através de material de propagação contaminado. Não existem registros de infecções em sementes, porém, pode ocorrer a infestação da superfície das mesmas. A curta distância, a chuva com vento é a principal forma de disseminação desta bactéria. A função dos insetos na disseminação de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* não está esclarecida, embora seja sugerida (Gagnevin & Pruvost, 2001; Manicon & Pruvost, 1994).

Para o controle da mancha angular da mangueira, recomenda-se o uso de materiais de propagação sadios, variedades precoces, plantio de quebra-vento nas bordas do pomar e aplicação de fungicidas cúpricos. A produção de material livre de doença em viveiros é de grande importância em um esquema de controle integrado. Algumas práticas de viveiro podem evitar o aparecimento da doença, incluindo: desinfestação de borbulha usando bactericidas, destruição de qualquer fonte potencial de inóculo, e redução da população bacteriana epifítica por meio de pulverizações com fungicidas à base de cobre. Além disso, o estabelecimento de novos pomares em áreas secas é imprescindível, já que a água livre na

superfície das plantas é um pré-requisito para a infecção bacteriana. No campo, o controle químico da doença é geralmente ineficaz. No entanto, compostos à base de cobre podem ajudar a reduzir inóculo epifítico na ausência de lesões (Gagnevin & Pruvost, 2001; Manicon & Pruvost, 1994; Robbs & Rodrigues Neto, 1999).

Por se tratar de uma doença recente, os aspectos epidemiológicos da mancha de *xanthomonas* ainda não foram esclarecidos. No entanto, o monitoramento de pomares de caju no Piauí e no Ceará mostra que o patógeno é capaz de causar perdas consideráveis, visto que as plantas cujos maturis (castanhas de caju verde) estão infectados resultam em frutos impróprios para a comercialização (Viana et al., 2006b). Além disso, dependendo do clone utilizado, os prejuízos podem ser elevados, principalmente em períodos chuvosos, podendo em algumas situações, comprometer mais de 90% da produção de frutos, conforme observado para o clone FAGA (Freire, 2015).

Quanto às medidas de controle, em pomares de cajueiro com histórico da mancha de *xanthomonas*, recomenda-se que sejam realizadas, logo no início das chuvas, pulverizações preventivas com oxicleto de cobre, em intervalos quinzenais, até que as castanhas percam a coloração verde. Em pomares onde a doença esteja ocorrendo, recomenda-se poda de limpeza por meio do corte de cachos onde se inserem maturis afetados, bem como a poda de ramos afetados ou que contenham folhas sintomáticas e, pulverização com oxicleto de cobre (Viana et al., 2006b).

7. Detecção e identificação patovares de *X. axonopodis* associadas ao cajueiro

Vários métodos moleculares têm sido utilizados para detectar, identificar e analisar a variabilidade de fitopatógenos. Neste contexto, a técnica de rep-PCR permite a determinação de perfis genômicos específicos que podem ser utilizados para estudos de identificação e diversidade de bactérias (Louws et al., 1999). As vantagens desta técnica consistem no fato que nem o conhecimento prévio da estrutura genômica de uma determinada espécie e nem uma seleção inicial de *primers* são necessários para identificação de bactérias (Louws et al., 1999). Além disso, rep-PCR foi consistentemente utilizada para diferenciação de isolados e para avaliação da diversidade genética do gênero *Xanthomonas* spp. (Rademaker et al., 2005).

BOX e ERIC-PCR foram utilizados para identificar os isolados pigmentados de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* e diferenciá-los de isolados de *X. axonopodis* pv. *spondiae*, *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* e *X. axonopodis* pv. *anacardii* (Gama et al., 2011). Além disso, a análise de agrupamento realizada isoladamente e em conjunto com os dados gerados por esses marcadores permitiram a diferenciação entre os isolados pigmentados, *X. axonopodis* pv. *anacardii*, *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* e *X. axonopodis* pv. *spondiae* a um nível de 70% de similaridade.

A observação da presença de elementos de inserção de família IS1595 apenas no genoma de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (Ah-You et al., 2007a) permitiu a construção de *primers* (IS 3F - GGGCGACCTGCGTTAAGCGT e IS 3R - AAGCTGCGCACC GGCTCAAT) específicos para detecção e identificação de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (Gama et al. 2011). Estes *primers* amplificam um fragmento de 979 pb da sequência de inserção IS1595 encontrada apenas no genoma dessa bactéria (Ah-You et al., 2007a), tornando-os uma eficiente ferramenta a ser adotada em medidas quarentenárias.

8. Considerações finais

Diversos aspectos sobre a diversidade dos isolados de *Xanthomonas* associados às Anacardiáceas já foram esclarecidos. No entanto, mais estudos ainda são necessários para esclarecer o relacionamento entre isolados pigmentados de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* e isolados de *X. axonopodis* pv. *anacardii*. Além disso, aspectos etiológicos de *X. axonopodis* pv. *spondiae* causadores de mancha angular em *Spondias* sp. também precisam ser elucidados.

Aspectos da interação bactéria-planta também precisam ser esclarecidos mais adequadamente para servir como embasamento de novas medidas de controle que possam ser inseridas no manejo integrado das doenças provocadas por essas bactérias em Anacardiáceas. Nesse sentido, o recente sequenciamento do genoma do isolado referência LMG 941 de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* foi anunciado (Midha et al. 2012) e, aliado ao sequenciamento do genoma de isolados pigmentados de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* e *X. axonopodis* pv. *anacardii*, os quais estão sendo realizados atualmente pela equipe do LAFIBAC, abrirão novas perspectivas para o entendimento das relações entre esses isolados e seus respectivos hospedeiros,

bem como servirão para o melhor entendimento sobre a origem e evolução dessa bactérias.

9. Agradecimentos

Os autores agradecem a L. Gagnevin, O. Pruvost, F. M. P. Viana e C. Zombre pelas imagens cordialmente cedidas.

10. Bibliografia

- AFOUNDA, L. C. A.; ZINSOU, V.; BALOGOUN, R. K.; ONZO, A.; AHOHUENDO, B. C. Inventaire des agents pathogènes de l'anacardier (*Anacardium occidentale* L.) au Bénin. **Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin**, v. 73, p. 13-19, 2013.
- AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; CHIROLEU, F.; JUEN, E.; RODRIGUES NETO, J.; PRUVOST, O. Pathological variations within *Xanthomonas campestris* pv. *maniferaeindicae* supported its separation into three distinct pathovars that can be distinguished by amplified fragment length polymorphism. **Phytopathology**, v. 97, p. 1568-1577, 2007a.
- AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; GRIMONT, P. A.D.; BRISSE, S.; NESME, X.; CHIROLEU, F.; BUI THI NGOC, L.; JUEN, E.; LEFEUVRE, P.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O. Polyphasic characterization of *Xanthomonas* pathogenic to members of the Anacardiaceae and theirs relatedness to species of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 306-318, 2009.
- AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. First report in Myanmar of *Xanthomonas axonopodis* pv. *maniferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica*. **Plant Disease**, v. 91, p. 1686, 2007b.
- ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2015. 128 p.
- ARAÚJO, J. P. P.; SILVA, V. V. (EdC.). **Cajucultura**: modernas técnicas de produção. Fortaleza: Embrapa/CNPAT, 1995. 14 p.
- BARBOSA, F. R.; HAJI, F. N. P.; ALENCAR, J. A.; MOREIRA, A. N.; TAVARES, S. C. C.; LIMA, M. F.; MOREIRA, W. A. **Monitoramento de pragas e doenças na cultura da mangueira**. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2000. 33 p.
- BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; SMITH, N. R. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1957. 1130 p.
- BULL, C. T.; DE BOER, S. H.; T.P. DENNY, FIRRAO, G.; FISCHER-LE SAUX, M.; SADDLER, G. S.; SCORTICHINI, M.; STEAD, D. E.; TAKIKAWA, Y. List of New Names of Plant Pathogenic Bacteria. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 21-27, 2012.
- CODEVASF (COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO DO VALE DO SÃO FRANCISCO). **A cadeia produtiva do caju**. Brasília, 2012. 4 p.
- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **CONAB 2016**. Conjuntura mensal: Castanha de caju. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=526&ordem=produto&Pagina_objcmsconteudos=22#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 19 abr. 2016.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.

- DESTÉFANO, S. A. L.; ALMEIDA, I. M. G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; PAPA, M. F. S.; BALANI, D. M.; FERREIRA, M. Caracterização molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* isolada de caju. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 117, 2001.
- DOIDGE, E. A bacterial disease of the mango *Bacillus mangiferae* n. sp. **Annals of Applied Biology**, v. 2, p. 1-45, 1915.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **FAOSTAT 2016**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 29 abr. 2016.
- Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: 20 abr. 2016.
- FREIRE, F. C. O. Introdução de fitopatógenos e doenças emergentes na agricultura Cearense. **Essentia**, v. 16, p. 22-39, 2015.
- GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Epidemiology and control of mango bacterial black spot. **Plant Disease**, v. 85, p. 928-935, 2001.
- GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, F. M. P.; FERREIRA, M. A. S. V.; SILVEIRA, E. B. Sintomas sistêmicos em cajueiro causados por isolados pigmentados de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 42. 2009, Rio de Janeiro. **Anais...** Brasília: Tropical PlantPathology, 2009. p. 14.
- GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, F. M. P.; FERREIRA, M. A. S. V.; SOUZA, E. B. Polyphasic characterization of pigmented strains of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. **Plant Disease**, v. 95, p. 793-802, 2011.
- IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, v. 29, p. 1-78, 2016.
- LOUWS, E. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 81-125, 1999.
- MANICON, B. Q.; PRUVOST, O. Bacterial black spot. In: PLOETZ, R. C.; ZENTMYER, G. A.; NISHIJIMA, W. T.; ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. (Eds.). **Compendium of tropical fruit diseases**. St. Paul: APS Press, 1994. p. 41-42.
- MELO, Q. M. S.; BLEICHER, E. **Frutas do Brasil: caju** fitossanidade. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2002. 62 p.
- MIDHA, S.; RANJAN, M.; SHARMA, V.; PINNAKA, A. K.; PATIL, P. B. Genome sequence of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* strain LMG 941. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 3031, 2012.
- PAPA, M. F. S.; MATOS, E. C.; ALMEIDA, I. M. C.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; BOLIANI, A. C. Ocorrência da mancha-angular (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*) em cajueiro no estado do Mato Grosso do Sul. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 119, 2001.
- PATEL, M. K.; KULKARNI, Y. S.; MONIZ, L. *Pseudomonas mangiferae-indicae*, pathogenic on mango. **Indian Phytopathology**, v. 1, p. 147-152, 1948a.
- PATEL, M. K.; MONIZ, L.; KULKARNI, Y. S. A new bacterial disease of *Mangifera indica* L. **Current Science**, v. 6, p. 189-190, 1948b.
- PELL, S. K. **Neotropical Anacardiaceae**. New York, 2009. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Anacardiaceae.htm>>. Acesso em: 29 abr 2016.
- PRUVOST, O.; BOYER, C.; VITAL, K.; VERNIERE, C.; GAGNEVIN, L. First report in Ghana of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica*. **Plant Disease**, v. 95, p. 774, 2011.

- PRUVOST, O.; BOYER, C.; VITAL, K.; VERNIERE, C.; GAGNEVIN, L. First report in Mali of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica*. **Plant Disease**, v. 96, p. 581, 2012.
- RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; SCHULTZ, M. H.; ROSSBACH, U.; VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; DE BRUIJN, F. J. A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 95, p. 1098-1111, 2005.
- ROBBS, C.F. Algumas bactérias fitopatogênicas do Distrito Federal. **Agronomia**, v. 14, p. 147-164, 1955.
- ROBBS, C. F.; NETO, J. R.; RIBEIRO, R. L. D.; KIMURA, O. Annotated list of bacterial plant pathogens in Brazil. In: INTERNATIONAL PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 5., 1981, Cali. **Proceedings ...** Cali: CIAT, 1981. p. 601-612.
- ROBBS, C. F.; PONTE, J. J.; SALES, M. G. Nota sobre *Xanthomonas mangiferaeindicae* no nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p. 215-217, 1978.
- ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. D. L.; KIMURA, O. Sobre a posição taxonômica de *Pseudomonasmangiferaeindicae* Patelet al. 1948, agente causal da “Mancha bacteriana” das folhas da mangueira (*Mangifera indica* L.). **Arquivos da Universidade Federal do Rio de Janeiro**, v. 4, p. 11-14, 1974.
- ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J. Enfermidades causadas por bactérias em fruteiras tropicais no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 73-76, 1999.
- SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 494–518, 2005.
- SECEX (SECRETÁRIA DE COMÉRCIO EXTERIOR). **Grupos de produtos**: exportação. 2015. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=5&menu=5294>>. Acesso em: 19 abr. 2016.
- SILVA, J. S. **Análise da eficiência econômica dos produtores de manga do vale do São Francisco**. 2014, 87 f. Dissertação (Mestrado em Economia) Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru.
- SOUZA, F. X. **Spondias agroindustriais e os seus métodos de propagação**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT / SEBRAE/CE, 1998. 27 p.
- SOUZA, J. S.; ALMEIDA, C. O.; ARAÚJO, J. L. P.; CARDOSO, C. E. L. Aspectos socioeconômicos. In: GENÚ, P. J. C.; PINTO, A. C. Q. (Eds.). **A cultura da mangueira**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 21-29.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.
- VIANA, F. M. P.; FERREIRA, M. A. S. V.; MARIANO, R. L. R.; SARAIVA, H. Á. O.; TRINDADE, L. C. **Mancha-de-Xanthomonas**: nova doença do cajuero. Fortaleza: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006a. 4 p.

- VIANA, F. M. P.; SARAIVA, H. Á. O.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E. **Mancha-de-Xanthomonas-do-cajueiro**: sintomas e controle. Fortaleza: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006b. 4 p.
- VIANA, F. M. P.; SARAIVA, H. A. O.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E. Ocorrência da bacteriose do cajueiro nos Estados do Piauí e Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, Suplemento, p. 65, 2005.
- ZOMBRE, C.; SANKARA, P.; OUÉDRAOGO, S. L.; WONNI, I.; BOYER, K.; BOYER, C.; TERVILLE, M.; JAVEGNY, S.; ALLIBERT, A.; VERNIÈRE, A.; PRUVOST, O. Natural infection of cashew (*Anacardium occidentale*) by *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* in Burkina Faso. **Plant Disease**, v. 100, p. 718-723, 2016.

Manejo da Podridão Mole em Hortaliças

Kátia Cilene da Silva Felix

Alessandra Jackeline Guedes de Moraes

Leandro Victor Silva dos Santos

Joelma Santana Rezende

Elineide Barbosa de Souza

1. Introdução

As hortaliças inserem-se de maneira cada vez mais efetiva e valiosa na dieta da população brasileira e mundial. O consumidor brasileiro vem pouco a pouco valorizando mais os produtos ligados à qualidade de vida, entre esses, as hortaliças.

Em 2010, a produção mundial de hortaliças folhosas ficou em torno de 90 milhões de toneladas (FAO, 2010). No Brasil, a produção desse segmento aumentou em 63% entre os anos de 1990 e 2006, chegando a 779 mil toneladas em 2007, numa área plantada de 771 mil hectares (Gutierrez, 2010). O cultivo de hortaliças gera 2,4 milhões de empregos diretos, ou seja, 3,5 empregos por hectare (MAPA, 2011).

Entre as hortaliças produzidas no estado de Pernambuco, o cultivo da couve-chinesa e alface têm se destacado pela expressiva importância econômica. Em 2011, segundo informações da Central de Abastecimento de Pernambuco (CEASA-PE, 2012) foram comercializadas 135 toneladas de couve-chinesa e 127 toneladas de alface, sendo Camocim de São Félix, Chã Grande, Garanhuns, Bonito, São Joaquim do Monte e Gravatá os principais municípios produtores de couve-chinesa e Vitória de Santo Antão, de alface.

Outras hortaliças que se destacam no estado de Pernambuco são pimentão, tomate e batata. Essas hortaliças pertencem à família das Solanaceae (Filgueira,

Estado da Arte em Fitobacterioses Tropicais. Gama, M.A.S. et al. (Eds.). 2016.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil

ISBN: 978-85-7946-259-7

2008) e apresentam grande importância socioeconômica no Brasil, pois podem ser cultivadas em diferentes sistemas de produção e por pequenos e grandes produtores. A produção nacional em 2012 de pimentão, tomate e batata foi cerca de 43 mil, 3,8 e 3,7 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2013).

Diversas doenças podem afetar estas culturas, comprometendo a sua quantidade e qualidade. Além disso, todas as partes da planta podem ser atacadas por fitopatógenos em diferentes estádios de desenvolvimento da cultura (Kimati et al., 2005).

De um modo geral, a produção de hortaliças é prejudicada pela ocorrência de doenças devido ao cultivo intensivo e escalonado em pequenas áreas (Pereira et al. 2013). No Brasil e em outros países é muito comum, no campo ou na fase de pós-colheita, a ocorrência da podridão mole (Pavan, 1997), sendo esta uma doença considerada limitante para hortaliças como a alface, couve-chinesa, batata, pimentão, tomate, entre outras (Mariano et al., 2005).

2. A podridão mole

A podridão mole, causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* e outras bactérias pectinolíticas, é muito comum no Brasil, seja no campo ou na fase de pós-colheita. É considerada um fator limitante para o cultivo de hortaliças (Mariano et al., 2005). De acordo com um levantamento publicado por Mansfield et al. (2012), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* está entre as dez fitobactérias de maior importância científica e econômica do mundo.

As perdas econômicas causadas pela podridão mole são grandes, variando com o valor da cultura e época de plantio, severidade do ataque, condições ambientais e das práticas aplicadas do cultivo à comercialização dos produtos (Pérombelon & Kelman, 1980). Em 2004, na mesorregião Agreste do estado de Pernambuco, foi constatada prevalência de 100% da podridão mole em couve-chinesa e de 42,9% em alface, com incidência variando entre 1 a 67% para couve-chinesa e 0 a 22% em alface (Silva et al., 2007).

As pectobactérias estão alocadas no filo Proteobacteria, classe Gamaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae e gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. Em nível de espécies, são classificadas como: *P. atrosepticum* (van Hall) Gardan et al., *P. betavascularum* (Thomson et al.) Gardan et al., *P. cacticidium* Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* Duarte et al., *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al., *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois et al.) Hauben et al., *P. wasabiae* (Goto and Matsumoto) Gardan et al., *P. cypripedii* (Hori) Brenner et al., *D.*

chrysanthemi (Burkholder et al.) Samson et al., *D. dadantii* Samson et al., *D. dianthicola* Samson et al., *D. dieffenbachiae* Samson et al., *D. paradisiaca* (Fernandez-Borrero and Lopez-Duque) Samson et al., *D. solani* van der Wolf et al., e *D. zae* Samson et al. (Duarte et al. 2004; Hauben et al. 1998; Samson et al. 2005).

As espécies de bactérias pertencentes a estes gêneros são Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, baciliformes e móveis. Em meio de cultura têm crescimento ótimo entre 28-30° C, formam colônias pigmentadas de coloração creme, opacas, circulares ou amebóides, com bordos irregulares e de aproximadamente 1,5 a 3,0 µm de diâmetro (Jabuonski et al., 1986).

Espécies de *Pectobacterium* e *Dickeya* são comumente denominadas de pectobactérias porque são produtoras de enzimas pectinolíticas que causam inicialmente encharcamento ou anasarca, sendo responsáveis pelo sintoma de podridão mole (Maringoni, 1997). Essas bactérias dependem em grande parte da temperatura, umidade e concentração de oxigênio para iniciar a infecção, bem como para a produção e intensidade dos sintomas (Pérombelon & Kelman, 1980).

Para que haja sucesso na infecção é requerida a produção e secreção coordenada de diferentes fatores de virulência pela bactéria. As enzimas pectinolíticas (pectina metil esterase, pectina liase, pectina acetil esterase, pectato liase, poligalacturonases, celulasas e proteases) degradadoras da parede celular da planta hospedeira (plant cell wall degrading enzymes - PCWDEs) são comumente os principais determinantes da virulência. A produção dessas enzimas extracelulares é controlada pela densidade celular (dependente), através da sinalização molecular (N-acil-homoserina lactona - AHLs) mais conhecido como *quorum-sensing*. Além das PCWDEs, vários outros fatores e mecanismos, tais como a motilidade, produção de lipopolissacarídeos, exopolissacarídeos, harpinas, proteínas efetoras, toxinas, sideróforos, condições ambientais e o hospedeiro, contribuem para o desenvolvimento da doença (Barras et al., 1994; Kado, 2010; Kersey et al., 2012; Pérombelon, 2002; Toth et al., 2003; Toth et al., 2006). Yang et al. (1992) verificaram que as enzimas endopectato liase, exopectato liase e endopoligalacturonase foram produzidas sequencialmente até as 12 primeiras horas após a inoculação de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em tubérculos de batata, revelando sua importância para a patogênese. Hossain et al. (2005) verificaram que mutantes de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* sem motilidade apresentavam redução na produção de enzimas e na severidade da doença em couve-chinesa.

Em couve-chinesa os sintomas ocorrem inicialmente na base das folhas em contato com o solo infestado, progredindo rapidamente para o caule principal, resultando no colapso de toda a planta (Figura 1A e 1B) (Ren et al., 2001). Em alface, a maceração dos tecidos surge inicialmente como uma murcha nas folhas externas, sendo as plantas adultas (próximo à idade da colheita) mais suscetíveis. A murcha é causada pelo colapso dos tecidos vasculares, resultando na descoloração do tecido. Com o progresso da doença, a medula do caule torna-se encharcada, macerada e esverdeada (Figura 1D). Em estádios avançados, toda a planta pode apodrecer, inclusive no período pós-colheita (Raid, 1997).

Em pimentões e tomateiros, a podridão mole pode ocorrer tanto nos frutos quanto no caule. Neste último caso, a doença é comumente chamada de talo oco (Figura 1E) (Lopes & Quezado-Soares, 1997). Nos frutos, a penetração da bactéria ocorre na região do pedúnculo devido ao acúmulo de água de chuva ou de irrigação, provocando depressões aquosas (Agrofit, 2016; Amorim et al., 2012). A bactéria também pode penetrar por meio de ferimentos provocados por insetos (brocas e traças). Nesse caso, o fruto apodrece e fica pendurado na planta como se fosse uma pequena bolsa d'água (Figura 1F) (Lopes & Quezado-Soares, 1997). A doença continua a aparecer mesmo em fase de pós-colheita, pois a bactéria penetra por ferimentos provocados durante as operações de colheita, embalagem e transporte (Agrofit, 2016).

A bactéria penetra na planta através de ferimentos ou aberturas naturais, localizando-se nos espaços intercelulares dos tecidos parenquimatosos e eventualmente no tecido vascular (Pérombelon, 2002; Pérombelon & Kelman, 1980), no qual se multiplicam produzindo as enzimas pectinolíticas que atuam na lamela média. O tecido afetado se desintegra em uma massa pastosa de células desorganizadas rodeadas por bactérias e suas enzimas, ocasionando o sintoma de podridão mole. A maceração do tecido vegetal é resultante da perda de componentes da parede celular e liberação de fluidos celulares (Kado, 2010).



Figura 1. Sintomas de podridão mole em plantas de couve-chinesa (A-C) e alface (C-D), de talo oco em tomateiro (E) e podridão de frutos em tomateiro (F).

3. Aspectos epidemiológicos

O conhecimento epidemiológico das doenças de plantas é essencial para a correta adoção de medidas de controle (Miller, 1988). Sendo assim, levantamentos de informações sobre o comportamento das doenças em função da idade da planta hospedeira, da faixa de temperatura e do período de exposição à umidificação, bem como a concentração de inóculo adequada para o estabelecimento de altos níveis de severidade devem ser definidos para cada associação patógeno-hospedeiro.

O difícil controle dessa enfermidade se deve principalmente ao patógeno, que possui ampla gama de plantas hospedeiras, capacidade de sobreviver em restos de cultura, em plantas voluntárias, na superfície de plantas como epífitos e/ou endófitos, bem como saprófitas (Pérombelon, 2002), se disseminando pela água de irrigação (Maddox & Harrison, 1988), insetos (Kloepper et al., 1979), movimento de solo, tratos culturais, implementos agrícolas (Pérombelon & Kelman, 1980), e sementes (Hadas et al., 2001). Outro fator importante que dificulta o controle da doença é a alta variabilidade das pectobactérias. A grande diversidade de hortaliças cultivadas nas áreas de produção, assim como plantas daninhas presentes na região que podem ser hospedeiras alternativas das

pectobactérias, podem contribuir como mecanismo de variabilidade para as bactérias pectinolíticas (Alvarado et al., 2011).

Em levantamento epidemiológico realizado por Silva et al. (2007) foi verificado que em alface, a maior intensidade da podridão mole foi constatada em áreas com mais de 17 anos de plantio, nas cultivares Cacheada, Elba e Tainá, em solo argiloso, irrigadas pelo sistema de rega com mangueira e drenagem deficiente. Porém, os autores verificaram menor intensidade da doença em áreas de plantio com as cultivares Verdinha e Salad Bowl, cultivadas anteriormente com coentro, no qual as mudas foram produzidas em bandejas. Em couve-chinesa, observou-se que a intensidade da podridão mole foi maior em áreas com mais de 10 anos de cultivo e em plantios com mais de 50 dias.

4. Manejo integrado

O manejo da podridão mole deve ser realizado de forma preventiva (Reis et al, 2015). Nesse sentido, recomenda-se o uso de variedades resistentes (Ren et al., 2001) ou plantas transgênicas (Fray et al., 1999; Mãe et al., 2001), controle biológico e alternativo (Dong et al., 2004, Silva et al., 2012), uso de cálcio (Flego et al., 1997), indutores de resistência (acibenzolar-S-metil) (Benelli et al., 2004) e emprego de antibióticos (Mello et al., 2011).

As principais medidas recomendadas para o controle da podridão mole incluem: evitar plantio em solos de baixada e mal drenados; erradicar plantas doentes; destruir restos culturais; rotação de culturas por três a quatro anos; não armazenar produtos doentes e sadios conjuntamente; armazenar produtos em local ventilado, seco e frio; evitar fermentos durante tratamentos culturais; controlar insetos mastigadores; desinfestar depósitos e armazéns com sulfato de cobre; utilizar água de boa qualidade para irrigação livre de contaminação; evitar o excesso de umidade com o maior espaçamento possível entre plantas; efetuar adubação equilibrada e rica em cálcio e utilizar cloro na água de lavagem (Mariano et al., 2001).

5. Controle cultural: mediado pelo uso de cálcio

O controle cultural pelo uso de cálcio (Ca) tem sido utilizado em inúmeros trabalhos com sucesso para o controle de diversas doenças, tanto na pré quanto na pós-colheita (Conway et al., 1992; Gomes et al., 2005; Hajhamed et al., 2007; McGuire & Kelman, 1986; Sugimoto et al., 2010).

O cálcio é um macronutriente essencial para a planta com papel importante na integridade estrutural das membranas e da parede celular (Dayod et al., 2010) e atua como um mensageiro secundário para inúmeros sinais ambientais (bióticos e abióticos) e hormonais das plantas (Lecourieux et al., 2006). Esse elemento (Ca) encontra-se mais proeminente no apoplasto, espaço da parede celular onde desempenha pelo menos duas funções distintas: interligar cadeias pécticas com o elemento boro, contribuindo consequentemente para a estabilidade da parede e a formação do gel péctico (Epstein & Bloom, 2006).

O cálcio é absorvido pela planta por meio da solução do solo na forma divalente (Ca^{2+}) e move-se com a água, sendo sua translocação via apoplástica e seu teor nos tecidos está sujeito às taxas de transpiração, no qual o fluxo de água (transpiração) carrega íons de cálcio das raízes para as folhas, via xilema, sendo distribuído apoplasticamente para o interior da parede celular (Conn et al., 2011). Uma vez depositado, o cálcio não apresenta redistribuição para outras partes da planta, sendo acumulado principalmente em tecidos que transpiram mais facilmente (Millaway & Wiersholm, 1979). Devido à distribuição intracelular diferencial do cálcio, a concentração de cálcio livre (Ca^{2+}) no citoplasma é rigidamente controlada (White & Broadley, 2003).

Além da parede celular, o cálcio é encontrado em altas concentrações em outros compartimentos intracelulares, como vacúolo, retículo endoplasmático, mitocôndrias, cloroplastos, e em baixas concentrações no citoplasma (Doyod et al. 2010). A concentração de íons de cálcio no citoplasma acima de $0,1 \mu\text{M}$ regula diversos processos, incluindo a secreção de componentes da parede celular. Na parede celular a concentração de íons de cálcio é cerca de $10 \mu\text{M}$ a 10 mM . O cálcio se liga as cargas negativas sobre as pectinas e confere rigidez estrutural à parede. A membrana plasmática ocupa uma posição central entre os dois compartimentos, em que os canais seletivos regulam o influxo de íons de cálcio e os transportadores específicos bombeiam íon do citoplasma de volta para a parede celular (Hepler & Winship, 2010). O acúmulo e, ou concentração de íons de cálcio na parede celular varia grandemente com o tipo de tecido e condições ambientais (Sattelmacher, 2001), e diferentes tipos de célula respondem diferentemente ao cálcio extracelular (Dayod et al., 2010).

Storey e Leigh (2004) estudando a distribuição de cálcio em folhas de limoeiro (*Citrus jambhiri* Lush.) usando microanálise de raio-X, observaram que o cálcio se acumulou em diferentes tecidos principalmente nos tecidos do parênquima paliádico e esponjoso, havendo também formação de cristais nas células idioblásticas, evidenciando a importância desses tecidos como reservatórios de cálcio, sendo sua distribuição referente a taxa de absorção em

diferentes tecidos. Estudos de ultraestrutura conduzidos durante os últimos anos, utilizando microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios-X, contribuíram para a compreensão das diferentes células e organelas que acumulam íons de cálcio (Hepler & Winship, 2010; Sattelmacher, 2001; White & Broadley, 2003), proporcionando assim um maior entendimento da complexidade entre as ligações, transporte e armazenamento do cálcio nas plantas (Doyod et al., 2010).

Diversos trabalhos têm indicado os efeitos benéficos do cálcio na fisiologia da planta e por consequência na prevenção de doenças (bióticas e abióticas), relacionando cloreto de cálcio (CaCl_2) e nitrato de cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$] como as principais fontes de cálcio utilizadas (Dayod et al., 2010; Liang et al., 2009; McGuire & Kelman, 1986; Sen et al., 2010; Sugimoto et al., 2010).

Schober e Vermeulen (1999) observaram que o uso de CaCl_2 ocasionou uma resistência parcial da podridão mole em chicória, sendo atribuída essa redução ao cálcio pelo retardamento da atividade do fator primário de patogenicidade de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. As enzimas pectato liase e poligalacturonase foram detectadas apenas as 24 e 48h após a inoculação do patógeno, respectivamente. Ngadze (2012) verificou uma redução da podridão mole e canela preta em tubérculos e plantas de batata, pela aplicação de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, também associada a interferência do cálcio na ação das enzimas pectato liase e poligalacturonases. Em couve-chinesa, apenas um trabalho realizado na China relatou a eficiência do cálcio no controle da podridão mole (Park, 1969).

6. Controle biológico e alternativo

Dentre as alternativas para redução do uso de agroquímicos o controle biológico é uma das alternativas mais discutidas, podendo tanto aproveitar o controle biológico natural quanto realizar a introdução massal de antagonistas (Bettiol & Morandi, 2009).

Segundo Baker e Cook (1974) controle biológico consiste na redução da quantidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença incitadas por um patógeno ou parasita, nos seus estádios de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas.

Barra et al. (2009), avaliando bactérias com potencial para o biocontrole da podridão mole do tomateiro observaram que dos 45 isolados estudados, 14 foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Enquanto que, nos ensaios *in vivo* apenas as rizobactérias UFV-006 e UFV-043 foram as que se destacaram, apresentando potencial uso no controle biológico de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* em tomateiro.

Mello et al. (2011), realizando estudo para avaliar o efeito de antibióticos e leveduras no controle da podridão mole em couve-chinesa, observaram que os isolados (*Saccharomyces cerevisiae*) e Rh1 (*Rhodotorula* sp.) reduziram a severidade em até 84% em experimento realizado em nervuras destacadas da hortaliça. Em casa de vegetação, o isolado Sc1diferiu da testemunha reduzindo a severidade da doença em até 27,6%. Os autores ainda relatam que a baixa eficiência das leveduras em campo pode ser resultado da dificuldade de colonização do filopiano nas condições climáticas prevalentes neste habitat.

O controle alternativo de doenças figura como uma ferramenta a mais, a ser incorporada nos sistemas alternativos e convencionais de produção de alimentos, como forma de aumentar a sustentabilidade e segurança dos mesmos (Silva et al., 2012).

A ação dos fosfitos foi testada inúmeras vezes contra diferentes patógenos das mais variadas plantas cultivadas (Dianese & Blum, 2010). Esses compostos não são fitotóxicos, podendo atuar diretamente inibindo o desenvolvimento dos microrganismos fitopatogênicos e também indiretamente, ativando o sistema de defesa da planta hospedeira (Silva et al., 2014).

Silva et al. (2014), analisando o efeito de antagonistas e produtos alternativos no manejo da podridão mole em pimentão causada por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, obtiveram resultados satisfatórios nos ensaios *in vivo*, onde o tratamento com fosfito de cálcio e fosfito de potássio demonstraram os maiores valores de período de incubação e redução da severidade da doença, demonstrando ser o melhor produto no manejo pós-colheita da podridão mole em pimentão. Ainda no mesmo trabalho, os autores obtiveram bons resultados com isolados de *Bacillus pumilus*, *Rhodotorula glutinis* e *R. aurantiaca* que foram mais eficientes no manejo pós-colheita da podridão mole do pimentão.

Em um estudo realizado por Silva et al. (2012) avaliando o efeito de óleos essenciais e extratos vegetais no controle da podridão mole em alface crespa, foi verificado que o óleo essencial de *Corymbia citriodora* e os extratos de ramos de *Parkinsonia aculeata* e folhas de *Chamaecrista cytisoides* podem ser utilizados para controle da podridão mole da alface em sistema de cultivo protegido, sem comprometimento das características físico-químicas da planta.

Vários autores estudaram os efeitos de óleos essenciais sobre o agente causal da podridão mole. Costa et al. (2008) constataram que o óleo puro de citronela

(*Cymbopogon winterianus*) foi mais efetivo do que o antibiótico tetraciclina na inibição do crescimento de seis isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Também Jeong et al. (2009) observaram atividade inibitória do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) sobre três isolados de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, com completa inibição do crescimento após 48 h de incubação.

7. Controle genético

A resistência de plantas é o principal método de controle para muitas doenças, isso pode ser alcançado através do cultivo de plantas que já possuem resistência ou pela incorporação de genes de resistência por meio de cruzamento, seleção ou por técnica de engenharia genética (Waller & Lenné, 2001).

A resistência é caracterizada pela sua natureza dinâmica e coordenada, onde a efetividade depende da expressão dos seus mecanismos em uma sequência lógica, após o contato do patógeno com o hospedeiro. Mostra-se como um sistema multicomponente, onde o nível de resistência resulta da somatória das contribuições individuais de diferentes mecanismos de resistência (Pascholati & Leitel, 1995).

Os mecanismos de defesa das plantas são divididos em estruturais e bioquímicos, podendo estes ser pré-formados e, ou pós-formados. Os mecanismos estruturais são constituídos de barreiras físicas, que dificultam a penetração e, ou colonização do agente patogênico. Os mecanismos bioquímicos são substâncias, que possuem características que impossibilitam o desenvolvimento do patógeno, podendo também gerar condições adversas para a sobrevivência deste nos tecidos da planta (Schwan-estrada et al., 2008).

O uso de cultivares resistentes a doenças tem sido sem dúvida o método de controle mais eficiente, sendo uma das principais práticas de sustentabilidade da agricultura moderna. Essa técnica é, ao mesmo tempo, o meio mais eficiente, econômico e seguro do ponto de vista ambiental, por reduzir o uso de agroquímicos, sendo compatível com outras práticas de manejo de doenças de plantas (Camargo, 2011b).

A busca por cultivares resistentes consiste num trabalho de grande complexidade, no qual estratégias de melhoramento devem ser traçadas. Para isso é necessário que se identifique fontes de resistência, que posteriormente serão cruzadas com cultivares de interesse, para transferência dessa resistência (Lima et al., 2005).

Na identificação de fontes de resistência, podem-se utilizar métodos de inoculações artificiais em condições controladas ou realizar experimentos em áreas que apresentem longo histórico de infecção, avaliando-se a resistência de diversos acessos com base na incidência e/ou severidade da doença, comparando-se com o comportamento de cultivares suscetíveis. Outra etapa indispensável é verificar se essa resistência é durável, pois muitos agentes patogênicos apresentam variabilidade genética que diferem em agressividade, em diferentes cultivares de uma cultura. Assim, a resistência depende tanto do genótipo do hospedeiro como da variante do patógeno, ambos afetados pelo ambiente. Por isso, o conhecimento da variabilidade genética do patógeno é pré-requisito para um teste rigoroso e inteligente na seleção de materiais resistentes (Lima, 2005).

Estudos de seleção de cultivares vêm sendo realizados a fim de encontrar fontes de resistência que possam ser utilizadas em programas de melhoramento. Felix et al. (2014), quando testaram 41 genótipos de alface quanto a resistência a podridão mole causada por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, verificaram que a cultivar Vitória de Santo Antão, têm uma resistência durável, sendo considerada uma boa fonte de resistência para programas de melhoramento.

Alguns pesquisadores têm realizado trabalhos visando à busca de cultivares e clones de batatas com potencial fonte de resistência a podridão mole. Benelli et al. (2004) testaram quatro cultivares de batata quanto a suscetibilidade a *P. atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *Dickeya chrysanthemi* os autores observaram que a cultivar Asterix mostrou uma menor suscetibilidade à podridão mole. Oliveira (2011), estudando resistência de clones de batatas a podridão mole e canela preta, avaliou 125 clones e verificou que 13 deles apresentaram alto nível de resistência a podridão mole e canela preta.

A busca por cultivares resistente a podridão mole é importante, entretanto torna-se mais difícil porque *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* é um patógeno que sobrevive no solo, tem ampla gama de hospedeiros e alta variabilidade genética. Alvarado et al. (2011) estudando uma população dessa bactéria oriunda de couve-chinesa de várias áreas de cultivo no estado de Pernambuco, constataram uma alta variabilidade, reafirmando a importância de se testar vários isolados em estudos de seleção de cultivares.

8. Bibliografia

- AGROFIT. **Sistema de produtos agrotóxicos e fitossanitários**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento/ Secretaria de Defesa Agropecuária, 2016. Disponível em: < http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 fev. 2016.
- ALVARADO, I. C. M.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; RESENDE, L. V.; CARDOSO, E.; MIZUBUTI, E. S. G. Characterization and variability of soft rot-causing bacteria in chinese cabbage in north eastern Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p. 173-181, 2011.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433 p.
- BARRA, V. R.; ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O.; MOURA, A. B.; SILVA, H. S. A.; MENDONÇA, H. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Antagonismo direto e biocontrole da podridão-mole-do-tomateiro pelo uso de procariotas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 327-330, 2009.
- BARRAS, F.; VAN GIJSEGEM, F.; CHATTERJEE, A. K. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 201-234, 1994.
- BENELLI, A. I. H.; DENARDIN, N. D.; FORCELINI, C. A. Ação do acibenzolar-S-metil aplicado em tubérculos e plantas de batata contra canela preta, incitada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* atípica. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 263-267, 2004.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de Doenças De Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúma: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.
- CAMARGO, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia**. Princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011a. v. 1, p. 119-132.
- CAMARGO, L. E. A. Controle Genético. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011b. v. 1, p. 325-340.
- CAMARGO, L. E. A.; BERGAMIN FILHO, A. Controle genético. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995b. v. 1, p. 729-760.
- CEASA-PE (CENTRAL DE ABASTECIMENTO DE PERNAMBUCO). **Comercialização de produtos**. Recife: Central de Abastecimento de Pernambuco, 2012. Disponível em: <<http://www.ceasape.org.br/calend.php>>. Acesso em: 03 set. 2012.
- CONN, S. J.; GILLIAM, M.; ATHMAN, A.; SCHREIBER, A. W.; BAUMANN, U.; MOLLER, I.; CHENG, N. H.; STANCOMBE, M. A.; HIRSCHI, K. D.; WEBB, A. A. R.; BURTON, R.; KAISER, B. N.; TYERMAN, S. D.; LEIGH, R. A. Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 23, p. 240-257, 2011.
- CONWAY, W. S.; SAMS, C. E.; MCGUIRE, R. G.; KELMAN, A. Calcium treatment of apples and potatoes to reduce post-harvest decay. **Plant Disease**, v. 76, p. 329-334, 1992.
- COSTA, C. M. G. R.; SANTOS, M. S.; BARROS, H. M. M.; AGRA, P. F. M.; FARIAS, M. A. A. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 2, p. 11-14, 2008.
- DAYOD, M.; TYERMAN, S. D.; LEIGH, R. A.; GILLIAM, M. Calcium storage in plants and the implications for calcium biofortification. **Protoplasma**, v. 247, p. 215-231, 2010.
- DIANESE, A. C.; BLUM, L. E. B. **Uso de fosfitos no manejo de doenças fúngicas de fruteiras e soja**. Brasília: EMBRAPA, 2010. 29 p.
- DONG, Y. H.; ZHANG, X. F.; XU, J. L.; ZHANG, L. H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 954-960, 2004.

- DUARTE, V.; DE BOER, S.H.; WARD, L.J.; OLIVEIRA, A.M.R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 535-545, 2004.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Londrina: Editora Planta, 2006. 403 p
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de Olericultura: agrotecnologia moderna para produção de hortaliças**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2008. 421 p.
- FLEGO, D.; PIRHONEN, M.; SAARILAHTI, H.; PALVA, T. K.; TAPIO P. E. Control of virulence gene expression by plant calcium in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. **Molecular Microbiology**, v. 25, p. 831-838, 1997.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **FAOSTAT 2013**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations – crops and processed crops. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>>. Acesso em: 29 abr. 2016.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). **FAOSTAT 2010**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>>. Acesso em: 29 abr. 2016.
- FRAY, R. G.; THROUP, J. P.; DAYKIN, M.; WALLACE, A.; WILLIAMS, P.; STEWART, G. S. A. B.; GRIERSON, D. Plant genetically modified to produce *N*-acylhomoserine lactones communicate with bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1017-1020, 1999.
- GOMES, A. M. A.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Tratamento pós-colheita com cálcio e microrganismos para controle da podridão-mole em tomate. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.108-111, 2005.
- GUTIERREZ, A. S. D. **Hortaliças em números: novidades no mercado – frutas e hortaliças frescas**. São Paulo: Centro de Qualidade e Hortaliças – CEAGESP, 2010. Disponível em: <http://www.hortibrasil.org.br/jnw/index.php?option=com_content&view=article&id=909:hortalicas-em-numeros&catid=64:frutas-e-hortalicas-frescas&Itemid=82>. Acesso em: 11 ago. 2015.
- HADAS, R.; KRITZMAN, G.; GEFEN, T.; MANULIS, S. Detection, quantification and characterization of *Erwinia carotovora* spp. *carotovora* contaminating pepper seeds. **Plant Pathology**, v. 50, p. 117-123, 2001.
- HAJHAMED, A. A.; EL-SAYED, W. M. A.; EL-YAZIED, A. A.; EL-GHAFFAR, N. Y. A.; Suppression of bacterial soft rot disease of potato. **Egyptian Journal Phytopathology**, v. 35, p. 69-80, 2007.
- HAUBEN, L.; MOORE, E.R.B.; VAUTERIN, L.; STEENACKERS, M.; MERGAERT, J.; VERDONCK, L.; SWING, J. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, p. 384-397, 1998.
- HEPLER, P. K.; WINSHIP, L. J. Calcium at the cell wall-cytoplasm interface. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 147-160, 2010.
- JABUONSKI, R. E.; TAKATSU, A.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Levantamento e identificação de espécies de *Erwinia* de diferentes plantas hospedeiras e regiões do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, p. 185-195, 1986.
- JEONG, M.R.; PARK, P. B.; KIM, D. H.; JANG, Y. S.; JEONG, H. S.; CHOI, S. H. Essential oil prepared from *Cymbopogon citrates* exerted an antimicrobial activity against plant pathogenic and medical microorganisms. **Mycobiology**, v.37, p. 48-52, 2009
- KADO, C. I. **Plant bacteriology**. St. Paul: APS Press, 2010. 336 p.
- KERSEY, C. M.; AGYEMANG, P. A.; DUMENYO, C. K. CorA, the magnesium/nickel/cobalt transporter, affects virulence and extracellular enzyme production in the soft rot pathogen *Pectobacterium carotovorum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 58-71, 2012.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L.E.A. (Eds). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

- KLOPPER, J. W.; HARRISON, M. D.; BREWER, J. W. The association of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and *Erwinia carotovora* var. *carotovora* with insects in Colorado. **American Potato Journal**, v. 56, p. 351-361, 1979.
- LECOUREUX, D.; RANJEVA, R.; PUGIN, A. Calcium in plant defence-signalling Pathways. **New Phytologist**, v. 171, p. 249-269, 2006.
- LIANG, W.; WANG, M.; AI, X. The role of calcium in regulating photosynthesis and related physiological indexes of cucumber seedlings under low light intensity and suboptimal temperature stress. **Scientia Horticulturae**, v. 123, p. 34-38, 2009.
- LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; VALLE, L. A. C. Controle genético de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Imprensa Universitária UFRPE, 2005, p. 247-278.
- LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; REIS, A. **Doenças da alface**. Brasília: Embrapa Hortalças, 2010. 68 p.
- LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortalças: diagnose e controle**. Brasília: Embrapa CNPH, 1997. 70 p.
- MADDOX, D. A.; HARRISON, M. D. Presence and population dynamics of *Erwinia carotovora* in irrigation water in South Central Colorado. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 64, p. 169-182, 1988.
- MÃE, A.; MONTESANO, M.; KOIV, V.; PALVA, T. Transgenic plant producing the bacterial pheromone *N*-acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 1035-1042, 2001.
- MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S. V.; MACHADO, M. A.; TOTH, I.; SALMOND, G.; FOSTER, G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, v. 6, p. 614-629, 2012.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ALVARADO, I. C. M.; SILVA, A.M. F. Bactérias fitopatogênicas pectinolíticas dos gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 2, p.121-153, 2005.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; OLIVEIRA, I. S.; NASCIMENTO, A. R. P. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste Brasileiro. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, 2001, p. 141-169.
- MARINGONI, A. C. Doenças das crucíferas (brócolis, couve, couve-chinesa, rabanete, repolho e rúcula). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doença das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 315-324.
- MCGUIRE, R. G.; KELMAN, A. Calcium in potato tuber cell walls in relation to tissue maceration by *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*. **Phytopathology**, v. 76, p. 401-406, 1986.
- MELLO, M. R. F.; SILVEIRA, E. B.; VIANA, I. O.; GUERRA, M. L.; MARIANO, R. L. R. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 78-83, 2011.
- MILLAWAY, R. M.; WIERSHOLM, L. Calcium and metabolic disorders. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 10, p. 1-28, 1979.
- MILLER, S. A.; MARTIN, R. R. Molecular diagnosis of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, p. 409-432, 1988.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Câmara setoriais e temáticos**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Hortalicas/Dados_Economicos/ABCSEM%202011.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2015.
- NGADZE, E. **Identification and control of potato soft rot and blackleg pathogens in Zimbabwe**. 2012, 165f. Tese (Doutorado em Patologia de Plantas) – University of Pretoria, Pretoria.

- OLIVEIRA, C. L. **Avaliação agrônômica e reação de clones de batata à canela preta e podridão mole**. 2011, 81f. Dissertação (Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- PARK, S. K. Studies in the relationship between Ca nutrient and soft rot disease in Chinese cabbage. **Research Report to Rural Development Administration**, v. 12, p.63-70, 1969.
- PEROMBELON M.C.M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. **Plant Pathology**, v. 51, p.1-12, 2002.
- PÉROMBELON, M. C. M.; KELMAN, A. Ecology of the soft rot *erwinias*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 361-387, 1980.
- RAID, R. N. Soft rot of lettuce. In: Davis, R. M.; SUBBARAO, K. V.; RAID, R. N.; KURTZ, E. A. (Eds.). **Compendium of lettuce diseases**. St. Paul: APS Press, 1997. p. 30-31.
- REIS, A.; MOURA, A. P.; LOPES, C. A.; LIMA, C. E. P.; MORETTI, C. L.; MENDES, D. G.; RESENDE, F. V.; HENZ, G. P.; PINHEIRO, J. B.; GUIMARÃES, J. A.; FILHO, M. M.; LIMA, M. F.; BOTREL, N.; VILELA, N. J.; MADEIRA, N. R.; CARVALHO, P. G. B.; SOUZA, R. B.; CAVALIERI, S. D.; OLIVEIRA, V. R.; MOROUELLI, W. A. **Árvore do conhecimento**. EMBRAPA, 2012. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cebola/Abertura.html>>. Acessoem: 10 jul. 2015.
- REN, J.; PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. Genetics and population improvement resistance to bacterial soft rot chinese cabbage. **Euphytica**, v. 117, p. 197-207, 2001.
- SALA, F. C. A; COSTA, C. P. ‘Gloriosa’: cultivar de alface crespa americana tropicalizada. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 409-410, 2008.
- SALA, F. C.; COSTA, C. P. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 187-194, 2012.
- SAMSON, R.; LEGENDRE, J. B.; CHRISTEN, R.; ACHUAK, W.; GARDEN, L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Brenner et. al. 1973) and *Brenneria paradisiaca* (Hauben et. al., 1998) to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. Nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. Nov. and delineation of four novel species: *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. **International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1415-1427, 2005.
- SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New Phytologist**, v. 149, p. 167-172, 2001.
- SCHOBER, B. M.; VERMEULEN, T. Enzymatic maceration of witloof chicory by the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the effect of nitrogen and calcium treatments of the plant on pectic enzyme production and disease development. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 341-349, 1999.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação planta patógeno – fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227-248.
- SILVA, A. M. F.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; SILVEIRA, E. B.; MEDEIROS, F. H. V. Levantamento da intensidade da podridão-mole em alface e couve-chinesa em Pernambuco. **Revista Caatinga**, v. 20, p. 84-93, 2007.
- SILVA, C. L.; SOUZA, E. B.; FELIX, K. C. S.; SANTOS, A. M. G.; SILVA, M. V.; MARIANO, R. L. R. Óleos essenciais e extratos vegetais no controle da podridão mole em alface crespa. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 632-638, 2012.
- SILVA, M. S.; CARVALHO, F. S. Q.; SILVA, J. R.; LINS, S. R. O.; OLIVEIRA, S.M.A. Uso de antagonistas e produtos alternativos no manejo pós-colheita de podridão mole em pimentão. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 718-725, 2014.
- STOREY, R.; LEIGH, R. A. Processes modulating calcium distribution in citrus leaves. An investigation using X-ray microanalysis with strontium as a tracer. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3838-3848, 2004.

- SUGIMOTO, T.; WATANABE, K.; YOSHIDA, S.; AINO, M.; FURIKI, M.; SHIONO, M.; MATOH, T.; BIGGS, A. R. Field application of calcium to reduce *Phytophthora* stem rot of soybean, and calcium distribution in plants. **Plant Disease**, v. 94, p. 812-819, 2010.
- TOTH, I. K.; BELL, K. S.; HOLEVA, M. C.; BIRCH, P. R. J. Soft-rot *Erwiniae*: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 17-30, 2003.
- TOTH, I. K.; PRITCHARD, L.; BIRCH, P. R. J. Comparative genomics reveals what makes an Enterobacterial plant pathogen. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 305-336, 2006.
- WALLER, J. M.; LENNÉ, J. M. Disease resistance. In: WALLER, J. M.; LENNÉ, J. M.; WALLER, S. J. (Eds.). **Plant pathologist's pocketbook**. Wallingford: CABI publishing, 2001, p. 328-335.
- WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, v. 92, p.487-511, 2003.
- YANG, Z.; CRAMER, C. L.; LACY, G. H. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectic enzymes: In plant gene activation and roles in soft-rot pathogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5, p. 104-112, 1992.

Manejo da Mancha Aquosa em Meloeiro

Elaineide Barbosa de Souza
Rosa de Lima Ramos Mariano
Claudeana Souza da Conceição

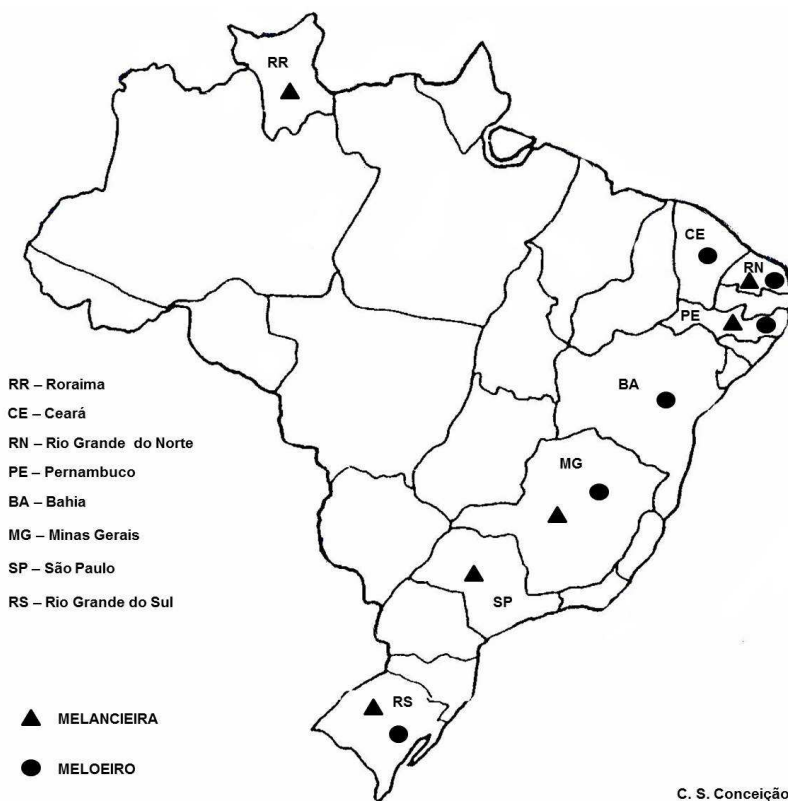
1. Introdução

O Nordeste é a principal região produtora de melão (*Cucumis melo* L.) do Brasil, com cerca de 90% da área total plantada no país. Os estados do Ceará e Rio Grande do Norte destacaram-se em 2014 com 11.550 ha e a região do Vale do São Francisco com 2.800 ha de área plantada (HORTIFRUTI BRASIL, 2015). O melão é a principal fruta fresca exportada pelo Brasil em volume, atingindo 177.829 toneladas em 2014, sendo o estado do Ceará responsável por 62,4% desse montante (CEASA-CE, 2015).

A grande adaptação do meloeiro a região Nordeste deve-se às condições edafoclimáticas, pois o clima semiárido favorece o desenvolvimento da planta, a produtividade e também a qualidade dos frutos (Moura et al., 2011). No entanto, mesmo com toda tecnologia aplicada, o meloeiro apresenta peculiaridades que dificultam o controle fitossanitário, como o ciclo curto, cerca de 60 dias em média, e o plantio de forma escalonada, favorecendo a migração de pragas e patógenos de uma cultura mais velha para uma recém-plantada (Fernandes et al., 2000).

No ano de 1997 foi detectada no Rio Grande do Norte (Assis et al., 1999) uma nova doença nos plantios de meloeiro, a mancha aquosa, que tem como agente etiológico a bactéria *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.) Schaad et al. (Sin: *A. avenae* subsp. *citrulli* Schaad et al.). Embora já assinalada nessa cultura, nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (Robbs et al., 1991), só a partir desse ano apresentou impacto econômico para o meloeiro. Em seguida, foi

registrada no Ceará (Santos & Viana, 2000), Rio Grande do Sul (Ueno et al., 2003), Minas Gerais (Macagnan et al., 2003), Pernambuco e Bahia (Mariano & Silveira, 2004) (Figura 1). As perdas de produção nos primeiros anos giraram em torno de 40 a 50%, todavia, chegou a dizimar totalmente algumas lavouras nos municípios de Quixeré (Ceará) e Mossoró (Rio Grande do Norte) nos períodos chuvosos (Santos & Viana, 2000). Além disso, os prejuízos econômicos são elevados devido às restrições de comercialização dos frutos (Carvalho et al., 2013).



C. S. Conceição

Figura 1. Ocorrência da mancha aquosa em meloeiro (●) e melanciaira (▲) no Brasil.

Para a cultura da melanciaira (*Citrullus lanatus* (Thunb) Matsum. & Nakai no Brasil, a mancha aquosa não tem importância econômica, ao contrário do que

ocorre em outros países, como os Estados Unidos. Contudo, já foi assinalada nos estados de São Paulo (Robbs et al., 1992), Minas Gerais (Macagnan et al., 2003), Roraima (Halfeld-Vieira & Nechet, 2007), Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul (Carvalho et al., 2013) (Figura 1). Sabe-se que isolados de *A. citrulli* provenientes de meloeiro são patogênicos a melancia (Oliveira et al., 2007; Walcott et al., 2004) e plantios dessas duas cucurbitáceas são freqüentemente encontrados numa mesma área, o que preocupa os produtores e pesquisadores. Surtos epidêmicos em melancia nos Estados Unidos incluíram perdas econômicas diretas, assim como processos legais dispendiosos contra produtores de sementes e mudas, forçando algumas empresas de sementes a saírem do mercado (Walcott, 2005)

Atualmente, a mancha aquosa encontra-se distribuída em 10 países da Ásia, dois da América do Norte, três da América Central e Caribe (sendo que na Nicarágua a doença foi erradicada), um na América do Sul, quatro na Europa e três na Oceania (CABI, 2015). Recentemente foi relatada na Turquia, Sérvia e Califórnia (Horuz et al., 2014; Kumagai et al., 2014; Popović & Ivanović, 2015). Devido a esses recentes relatos, a mancha aquosa foi adicionada a lista de alerta A1 da European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), a qual relaciona as doenças de grande impacto econômico mundial (CABI, 2015). *Acidovorax citrulli* foi considerada como uma séria ameaça para cucurbitáceas, em particular meloeiro e melancia (EPPO, 2015).

Não existe cultivares comerciais de cucurbitáceas com imunidade à mancha aquosa (Walcott, 2005), sendo o princípio da exclusão o mais recomendável, pois uma vez introduzida em uma área, a erradicação é muito difícil (Costa et al., 2006). Assim, uma vez detectada a mancha aquosa, diferentes métodos devem ser integrados para o manejo eficaz da doença.

2. Ciclo da mancha aquosa

Para um eficaz manejo integrado da mancha aquosa é necessário conhecer o agente causal e o ciclo da doença (Figura 2), para que diferentes estratégias de controle possam ser utilizadas.

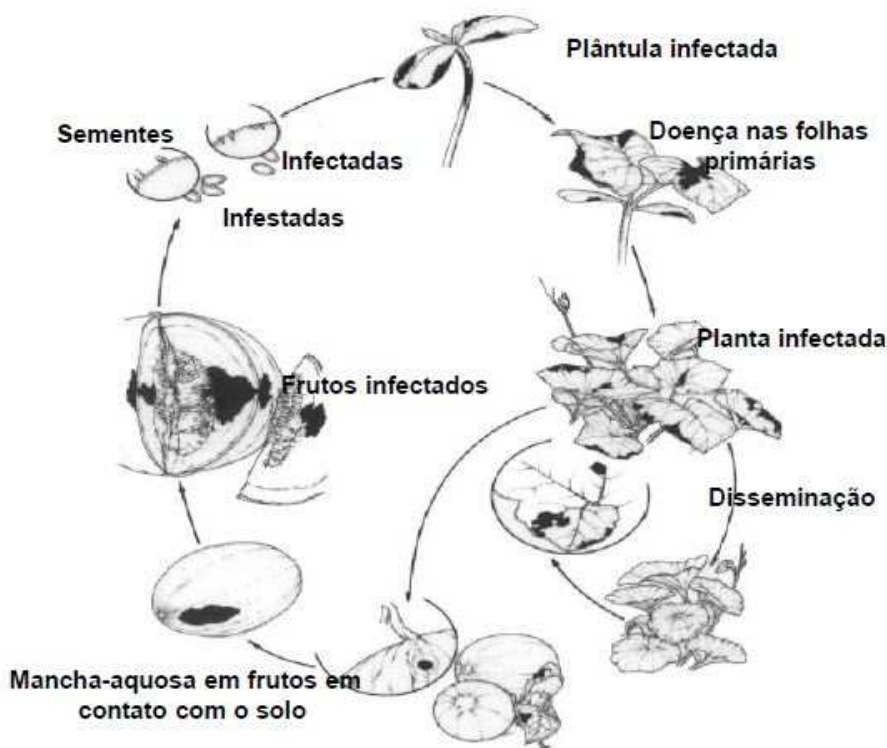


Figura 2. Ciclo da mancha aquosa em meloeiro (Mariano et al., 2001).

Acidovorax citrulli é uma bactéria Gram negativa, aeróbica, móvel com um único flagelo polar e com formato de bastonete. Apresenta bom crescimento em meio de cultura de rotina como ágar nutritivo-extrato de levedura-dextrose (NYDA) onde forma colônias pequenas com 0,7 a 1,0 mm, brancas ou cremes. Cresce a temperatura de 41 °C, mas não a 4 °C (Schaad et al., 1978). Colônias de *A. citrulli* podem ser identificadas utilizando o perfil de ácidos graxos - FAME (Hodge et al. 1995; Somodi et al. 1991), Biolog GEN III MicroPlate™ com a base de dados MicroLog (Isakeit et al., 1997) e PCR utilizando dois pares de primers específicos: WFB1/WFB2 e SEQID4m/SEQID5 (Schaad et al., 2000; Walcott & Gitaitis, 2000). Inicialmente, os isolados de *A. citrulli* formavam uma população homogênea, mas com base em testes de agressividade, bioquímicos e moleculares, verificou-se que há uma variabilidade genética na população (Burdman et al., 2005; Burdman & Walcott, 2012; O'Brien & Martin, 1999; Somodi et al., 1991; Yan et al., 2013; Walcott et al., 2004). Com base nessa

diversidade Walcott et al. (2000, 2004) separaram os isolados de *A. citrulli* em dois grupos: Grupo I, isolados provenientes de cucurbitáceas diferentes de melanciaira juntamente com o isolado tipo da espécie (ATCC29625), que foram moderadamente agressivos ao meloeiro cantaloupe, aboboreira (*Cucurbita* spp.) e abobrinha (*Cucurbita pepo* L.), e o Grupo II, formado por isolados obtidos de melanciaira, que são mais agressivos a essa cultura do que a outras cucurbitáceas. No Brasil, 34 isolados obtidos de diferentes áreas de produção de melão da região Nordeste foram caracterizados quanto a sua agressividade a frutos de meloeiro, perfil de utilização de substratos e genótipo. Os resultados indicaram baixa diversidade da população e os isolados formaram um único grupo, correspondendo ao Grupo I (Silva et al., 2016). Essa baixa diversidade é um fator positivo no manejo da mancha aquosa, principalmente para os programas de melhoramento genético que buscam selecionar genótipos com resistência à doença.

A disseminação de *A. citrulli* a longa distância é feita principalmente por sementes contaminadas (infestadas ou infectadas) (O'Brien & Martin, 1999; Oliveira et al., 2001), consideradas a principal fonte de inóculo primário para epidemias da mancha aquosa (Burdman & Walcott, 2012), e transplântio de mudas de cucurbitáceas infectadas (Hopkins et al., 1996). Após a germinação da semente contaminada, em condições de umidade relativa elevada, a bactéria é facilmente disseminada entre as plântulas por respingos de água, os quais são responsáveis por significativa proporção de mudas infectadas (Hopkins, 1993, 1994). Uma única semente contaminada em um lote pode transmitir a doença em níveis variando de 16,7 a 100% (Dutta et al., 2012b). Na ausência de sintomas nas plântulas, populações epifíticas da bactéria podem iniciar surtos epidêmicos de mancha aquosa em condições de campo favoráveis. Por esses fatores, o risco de desenvolvimento da doença é elevado, mesmo para lotes de sementes com níveis baixos de contaminação (Walcott, 2005). À medida que as plantas vão crescendo no campo, o patógeno dissemina-se para novas folhas e plantas vizinhas, principalmente através de respingos de água de chuva e de irrigação (Santos & Viana, 2000), sendo condições favoráveis umidade relativa elevada e alta temperatura (Walcott, 2005). Lesões foliares e populações epifíticas servem como reservatórios de *A. citrulli* e contribuem para o desenvolvimento da mancha aquosa em frutos (Burdman & Walcott, 2012; Silva Neto et al., 2006), e as sementes oriundas de frutos infectados abandonados no solo podem resultar em plantas voluntárias infectadas, servindo de inóculo primário para o próximo plantio (Latin, 1997). Os frutos de melanciaira servem como fonte de infecção limitada, por contato, na pós-colheita (Rushing et al., 1997) e sementes de frutos

sintomáticos e assintomáticos podem originar plântulas com sintomas típicos da doença, com transmissão da *A. citrulli* de até 35,3 e 8,7%, respectivamente (Carvalho et al., 2013).

A bactéria penetra nas folhas de meloeiro através dos estômatos e ferimentos e permanece nos espaços intercelulares (apoplasto) dos tecidos infectados. Existem evidências de infecção sistêmica em plântulas de meloeiro (Alves et al., 2010; Bahar et al., 2009). Nos frutos, a penetração ocorre via estômatos e lenticelas, sendo os frutos verdes mais susceptíveis à invasão por *A. citrulli* do que os maduros, devido à deposição de ceras na superfície dos frutos maduros (Silva Neto et al., 2006). No entanto, os sintomas da doença nos frutos só aparecem quando estes estão próximos à maturidade de colheita (Walcott, 2005). Nas sementes, a bactéria ao penetrar pelo pericarpo do ovário resulta na contaminação superficial da casca e camadas do perisperma-endosperma, e quando a invasão ocorre através do pistilo, há deposição no embrião (Dutta et al., 2012a).

Os sintomas da mancha aquosa são detectados em diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Não parece haver qualquer efeito de *A. citrulli* na qualidade das sementes, uma vez que a aparência das sementes, germinação e vigor das mudas não são afetadas. Em plântulas, lesões encharcadas são observadas nos hipocótilos e cotilédones, progredindo para verde-escuras (Santos & Viana, 2000) e marrons nos cotilédones, podendo correr necrose do hipocótilo e morte das mudas (Hopkins et al., 1996). As lesões nas folhas de plantas adultas são inicialmente pequenas, com aspecto oleoso e coloração verde-clara, assumindo posteriormente uma coloração marrom-escura (Santos & Viana, 2000), com ou sem halo (Hopkins et al., 1996). Lesões são frequentemente observadas ao longo das nervuras ou nas margens da folha (O'Brien & Martin, 1999). Os sintomas foliares não resultam em desfolhamento, tornando as folhas importantes reservatórios da bactéria para a infecção do fruto (Hopkins, 1994). Os frutos exibem pequenas manchas oleosas que se expandem e se tornam marrons e necróticas, causando pequenas depressões na casca, podendo ainda apresentar rupturas no centro; internamente a bactéria coloniza a polpa do fruto, onde causa podridão seca de coloração castanha (Melo et al., 2015; Walcott, 2005), podendo assim contaminar as sementes externa e internamente (Mariano & Silveira, 2007). A necrose ou simples lesão na casca não reflete o dano que ocorre na polpa imediatamente abaixo, ou seja, a parte interna já pode estar bastante comprometida, mesmo quando essa lesão, externamente, se mostra com apenas 0,5 cm a 2,0 cm de diâmetro. (O'Brien &

Martin, 1999). Após a colheita, as lesões superficiais não aumentam drasticamente nos frutos (Mariano & Silveira, 2004; Rushing et al., 1997).

Durante períodos de temperaturas elevadas e dias ensolarados com chuvas ao entardecer, os sintomas da doença desenvolvem-se e a bacteriose dissemina-se sobre folhas e frutos mais rapidamente (Hopkins et al., 1992). Infecções bem-sucedidas podem ocorrer num período de 30 minutos de molhamento na folha à temperatura de 26 °C (Latin, 1997). Silveira et al. (2003) verificaram que o prolongamento da duração do período de molhamento foliar aumentou o índice de doença, sendo o maior índice obtido em plantas submetidas a câmara úmida por 48 h. Em relação à infecção em frutos, através de teste de inoculação artificial, verificou-se que a temperatura e umidade influenciaram a severidade da doença, sendo as maiores lesões observadas na casca de frutos de meloeiro incubados a 30 e 35 °C na ausência de umidade e a 30 °C em câmara úmida por 6 horas (Silveira et al. 2004).

Os hospedeiros mais suscetíveis dentre as cucurbitáceas são o meloeiro e a melancia, nos quais os sintomas se desenvolvem em folhas e frutos. Em outras cucurbitáceas como pepineiro (*Cucumis sativus* L.) e aboboreira os sintomas são apenas foliares (EPPO, 2010). Em estação de quarentena em Israel, a bactéria foi detectada em plântulas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e berinjela (*Solanum melongena* L.) provenientes de sementes importadas dos Estados Unidos (Assouline et al., 1997), porém não são conhecidas infecções naturais dessas culturas (O'Brien & Martin, 1999). No Brasil, inoculações artificiais de *A. citrulli* nas folhas induziram sintomas em chuchuizeiro (*Sechium edule* L.) (Robbs et al., 1991), maxixeiro (*Cucumis anguria* L.), aboboreira moranga (*Cucurbita maxima* Duchesne) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) (Nascimento et al., 2004).

Acidovorax citrulli sobrevive eficazmente por períodos maiores que 30 anos em sementes de meloeiro e melancia. A localização no embrião/endosperma aumenta esta sobrevivência, o que dificulta a erradicação (Dutta et al., 2016).

Em condições de campo, *A. citrulli* sobrevive em plântulas voluntárias, como também em hospedeiras alternativas presentes em áreas de cultivo de meloeiro, como as cucurbitáceas nativas melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.), bucha (*Luffa cylindrica* Roemer) (Santos & Viana, 2000), melão-pepino (*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud.) (Oliveira et al., 2003) e cabaça (*Lagenaria vulgaris* Ser.) (Viana et al., 2000). Na Austrália e no Texas, respectivamente, as plantas invasoras *Cucumis myriocarpus* L. e *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. var. *citroides* (Bailey) Mansf. foram assinaladas como hospedeiras da bactéria (Isakeit, 1999; O'Brien & Martin, 1999). *A. citrulli*

também sobrevive em tecidos de folhas e frutos de meloeiro incorporados ao solo nas profundidades de 0,5 e 10 cm por 21 dias, e a 15 cm por 14 dias. No solo na ausência de uma planta hospedeira, a bactéria sobrevive menos de uma semana (Oliveira, 2008).

3. Estratégias para o manejo da mancha aquosa

Todos os tipos de meloeiro apresentam suscetibilidade a *A. citrulli*, incluindo Amarelo, Orange Flesh, Pele-de-Sapo, Charentais e Gália (Latin, 1997; Mariano et al., 2001) e não existem cultivares comerciais resistentes a doença. Várias seleções foram realizadas com acessos e variedades de meloeiro e outras curcubitáceas (Bahar et al., 2009; Buso et al., 2004; Carvalho, 2013; Hopkins, 1993; Hopkins & Thompson 2002; Sowell & Schaad, 1979), no entanto, variações nos resultados freqüentemente têm sido encontradas, devido principalmente a diferenças nas condições experimentais (Carvalho et al., 2013; Hopkins & Thompson, 2002) e a alta variabilidade dos isolados utilizados (Hopkins, 1993).

Bahar et al. (2009) avaliaram o nível de tolerância à mancha aquosa de vários genótipos de meloeiro através da inoculação em sementes e em plântulas. Os genótipos testados apresentaram reações diferentes, porém alguns resultados consistentes foram encontrados, sendo selecionadas duas cultivares (ADIR339 e 6407) resistentes em todos os testes e duas linhagens (BLB-B e EAD-B) resistentes no ensaio de inoculação em sementes. No Brasil, Buso et al. (2004) avaliaram 76 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Melão da Embrapa Hortaliças e encontraram cinco genótipos (CNPH 83-068, CNPH 83-101, CNPH 00-881, CNPH 00-585, CNPH 01-925) com significativo grau de resistência à mancha aquosa, sendo indicados como fonte de resistência.

Mesmo não sendo considerada de importância econômica para o Brasil em melanciaira, mas considerando que isolados de meloeiro são patogênicos a essa cultura (Melo et al., 2015; Oliveira et al., 2007; Walcott et al., 2004), programas de melhoramento genético incluem seleções para resistência a mancha aquosa. Genótipos de melanciaira pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro (BAG) da Embrapa Semiárido foram inoculados com *A. citrulli* em diferentes estádios de desenvolvimento da planta: sementes (74 genótipos), plântulas e plantas antes da floração (29 genótipos) e plantas durante a floração e frutificação (7 genótipos). Nenhum genótipo foi imune à mancha aquosa, e a maioria apresentou variação nas reações de resistência. Porém, os genótipos BGCIA 979, BGCIA 34 e ‘Sugar Baby’

mostraram altos níveis de resistência na maioria dos estádios de desenvolvimento da planta, indicando possuírem genes para resistência à mancha aquosa (Carvalho et al., 2013).

Diante da inexistência de cultivares resistentes, o manejo bem-sucedido da mancha aquosa não será obtido pelo uso de uma única medida, mas depende da utilização de sementes e mudas sadias, de práticas culturais adequadas e do uso de bactericidas.

3.1. Manejo da mancha aquosa na produção de sementes

A estratégia mais importante para o manejo da mancha aquosa é a exclusão de *A. citrulli* pela utilização de sementes livres do patógeno. A semente é a principal fonte de inóculo para disseminação da bactéria, sendo responsável pela introdução da doença em áreas livres. No Rio Grande do Norte, por exemplo, acredita-se que a mancha aquosa tenha sido introduzida inadvertidamente pela importação de sementes contaminadas (Assis et al., 1999).

As sementes devem ser produzidas em regiões de clima frio e seco de países sem histórico de mancha aquosa, empregando rotações de 3 a 5 anos com culturas que não pertençam à família das cucurbitáceas. Os campos são inspecionados visualmente, e somente é utilizada a semente proveniente de campos livres da doença. Mesmo assim, é impossível garantir que as sementes estejam livres do patógeno, mas a realização de testes de sanidade reduz o risco de surtos epidêmicos. O teste padrão indicado é o de crescimento de plântulas a partir do semeio de 10.000-30.000 sementes por lote, em condições condutivas ao desenvolvimento da doença. O ensaio pode levar até três semanas e exige técnicos treinados para reconhecer variações nos sintomas da mancha aquosa nas mudas, dependendo da interação patógeno-hospedeiro (Walcott, 2005). Finalmente, ensaios de laboratório são necessários para confirmar a identidade de bactérias isoladas a partir de mudas. Além do isolamento em meio semisseletivo (Hopkins et al., 2003), testes altamente sensíveis e que requerem menor tempo podem ser utilizados, a exemplo de Bio-PCR, separação imunomagnética combinada com PCR (Walcott & Gitaitis, 2000), teste ELISA com anticorpo monoclonal (Himananto et al., 2011), sonda cadeado e hibridização dot-blot (Tian et al., 2013). Uma vez detectada a bactéria, o lote de sementes deve ser descartado porque a tolerância para presença de sementes contaminadas é zero.

Nos Estados Unidos, para proteger os produtores de sementes de processos legais, cada pacote de semente de melancieira é acompanhado de um termo de

responsabilidade, declarando que embora as sementes tenham sido testadas, não há garantia que estejam livres de *A. citrulli*. No momento da compra, é solicitado aos agricultores para renunciarem aos seus direitos de iniciar ações legais contra os produtores de sementes, caso aconteça uma epidemia de mancha aquosa (Walcott, 2005).

Adicionalmente, alguns tratamentos químicos e físicos das sementes podem ser realizados. Embora nenhum consiga erradicar *A. citrulli* totalmente, reduzem significativamente a transmissão da mancha aquosa para as plântulas. Os fatores que influenciam a eficácia dos tratamentos de sementes incluem, a incapacidade do tratamento em penetrar no tegumento da semente e a localização da bactéria externa e/ou internamente à semente (Burdman & Walcott, 2012).

Para o tratamento das sementes são recomendados: estreptomicina por 16 horas (1,0 mg/ml) (Sowell & Schaad, 1979); ácido clorídrico 1,8% por 5 minutos; hipoclorito de sódio 0,5% por 20 minutos (Rane & Latin, 1992); ácido láctico 2% por 20 minutos; imersão em água quente a 52° C por 10 minutos (Santos & Viana, 2000); acibenzolar-S-metil (Bion) 0,01% por 20 minutos; sulfato de estreptomicina 0,1% por 30 minutos; sulfato de estreptomicina 0,1% + solução salina 1,5% por 30 minutos (Moraes et al., 2002); ácido peroxiacético 1.600 µg/ml por 30 minutos, seguindo-se secagem com baixa umidade a 40°C por 24 horas (Hopkins et al. 2003); e sulfato de estreptomicina 0,1%, kasugamicina 0,1%, oxicleto de cobre 0,5% e Bion 0,01%, isoladamente ou em mistura por 30 minutos (Silva Neto et al., 2003).

Agentes de biocontrole também têm sido testados com o objetivo de diminuir a concentração de inóculo de *A. citrulli* nas sementes de meloeiro. As bactérias endofíticas ENM5 (*Bacillus* Cohn sp.), ENM9 (*Bacillus cereus* Frankland e Frankland), ENM13 (*Bacillus* sp.), ENM16 (*B. cereus*), ENM32 (*Bacillus subtilis* Cohn) e ENM43 (*Bacillus* sp.) utilizadas para microbiolização de sementes artificialmente infectadas com *A. citrulli*, revelaram potencial para o controle da doença (Oliveira et al., 2006). Santos et al. (2006) obtiveram controle da mancha aquosa através do tratamento de sementes com líquidos fermentados com ou sem presença das células de *B. subtilis* (R14), *B. megaterium* de Bary pv. *cerealis* Hosford (RAB7), *B. pumilis* Meyer e Gottheil (C116) e *Bacillus* sp. (MEN19), sendo os melhores resultados obtidos com RAB7 que proporcionou redução da incidência (89,1%) e do índice de doença (92,7%), elevou o período de incubação da mancha aquosa de 9,8 para 11,9 dias e reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença de 3,36 para 0,17. Dentre 50 isolados de bactérias endofíticas e epifíticas obtidas de meloeiro e outras culturas, o isolado RAB9 (*Bacillus* sp.) foi selecionado como eficiente no controle da mancha aquosa

(Medeiros et al., 2009). O tratamento das sementes com extrato metabólico da levedura *Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman diminuiu a incidência da doença em plântulas, e a sua eficácia não diferiu significativamente dos tratamentos químicos com sulfato de estreptomicina (0,1% p/v) e ácido hidrocloreídrico (2% v/v) (Wang et al., 2009). As leveduras *Rhodotorula aurantiaca* (Saito) Lodder (LMA1) e *P. anomala* (CC-2) aplicada às sementes por imersão reduziram o índice de doença e área abaixo da curva de progresso da doença em até 34,3 e 45,5%, respectivamente, pelo tratamento de sementes (Melo et al., 2015).

3.2. Manejo da mancha aquosa na produção de mudas

A primeira medida a ser tomada é a utilização de sementes livres da bactéria, de firmas credenciadas e em embalagens herméticas (Santos & Viana, 2000; Viana et al., 2000). Mesmo assim, as epidemias de mancha aquosa em meloeiro e melancia têm sido atribuídas ao plantio de sementes contaminadas (Assis et al., 1998; Walcott, 2005). Não esquecendo que, muitas vezes o produtor utiliza sementes de frutos produzidos na propriedade, aumentando o risco de disseminação da doença.

Visando minimizar a disseminação da doença entre as plântulas, algumas medidas devem ser tomadas, tais como: utilizar bandejas esterilizadas; plantar sementes provenientes de lotes diferentes em estufas distintas e, quando não for possível, utilizar barreiras plásticas de 60 cm de altura entre essas bandejas; diminuir o contato físico entre as plântulas; realizar adubação e controle de pragas adequados, para promover o crescimento de mudas saudáveis; realizar a rega por aspersão ao meio dia para permitir a rápida secagem da superfície das folhas e com pressão de saída da água baixa, para evitar a formação de aerossóis; evitar o tráfego e movimento de equipamentos entre estufas (Walcott, 2005); manter temperatura e umidade em níveis baixos (Dias et al., 1998); realizar inspeções visuais das plântulas para detecção de sintomas da doença (Walcott, 2005); erradicar plântulas com sintomas (Dias et al., 1998). Após cada ciclo de produção das mudas, as estufas devem ser desinfestadas completamente e esvaziadas por pelo menos duas ou três semanas antes do novo plantio (Walcott, 2005).

Uma vez que *A. citrulli* sobrevive de forma epifítica em plântulas assintomáticas, todas as mudas produzidas em estufas aonde a mancha aquosa foi detectada devem ser descartadas. No entanto, devido aos custos, as mudas sintomáticas e vizinhas devem ser descartadas, e as remanescentes tratadas com bactericidas à base de cobre (Walcott, 2005).

Bactérias antagonistas têm sido testadas visando o controle da mancha aquosa em plântulas de meloeiro, com resultados promissores. A bactéria *Paenibacillus lentimorbus* Dutky (MEN2) pulverizada em plântulas protegeu as folhas, reduzindo a incidência (77%) e severidade da doença (81%) (Medeiros et al., 2009). As leveduras *P. anomala* CC-2 e *R. aurantiaca* LMA1 reduziram a severidade da doença, com resultados similares ao indutor de resistência acibenzolar-S-metil (Melo et al., 2015). Essas leveduras pulverizadas nas plântulas e combinadas com silicato de cálcio incorporado ao substrato (1,41 g Si/kg) ou silicato de potássio (17mM Si) pulverizado, também reduziram a severidade da mancha aquosa, embora sem efeito aditivo ou sinérgico (Conceição et al., 2014).

Para confirmar a presença de *A. citrulli* nas plântulas, pequenos ($\sim 4 \text{ mm}^2$) pedaços de tecidos sintomáticos são colocados em uma gota de água esterilizada ou solução salina de tampão fosfato 0,1 M, macerados, semeados em meio semi-seletivo e incubados durante 2-3 dias a 28°C. Para posterior confirmação, extrair DNA genômico de colônias isoladas e realizar um teste de PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos (Dutta et al., 2012b). *A. citrulli* também pode ser detectada por imunotiras disponíveis comercialmente (ImmunoStrips® Test, Agdia Inc.), que é uma ferramenta para a detecção rápida da bactéria nas folhas, frutos e mudas com sintomas da mancha aquosa, além de identificar culturas bacterianas.

3.3. Manejo da mancha aquosa em campos de produção de frutos

Medidas de manejo para evitar a doença em cultivos estabelecidos consistem na proteção das plantas através de aplicações quinzenais ou semanais com fungicidas cúpricos, tais como hidróxido de cobre, hidroxissulfato de cobre ou oxiclureto de cobre, iniciando-se na floração, ou antes, e se prolongando até a maturação dos frutos (Walcott, 2005). Sales Júnior et al. (2005) obtiveram resultados positivos na redução da incidência da mancha aquosa em frutos de meloeiro em campo com o uso de oxiclureto de cobre (1250 ppm), kasugamicina (70 ppm), kasugamicina+oxiclureto de cobre (40+1250 ppm) e sal de oxitetraciclina (82 ppm). São indicadas também quatro aplicações com intervalos semanais de acibenzolar-S-metil (Sales Júnior et al., 2007). Além disso, nos plantios de meloeiro do Rio Grande do Norte, são utilizados o indutor de resistência mananoligossacarídeo fosforilado derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* 1026 (Agro-Mos) e cobre micronizado

(partículas manométricas de cobre na forma de suspensão, dispersas em uma solução polimérica) (Informação Pessoal, Rosemberg Ferreira Senhor).

Como medidas culturais, principalmente após a entrada de *A. citrulli* no campo são indicadas: erradicar plantas com sintomas de mancha aquosa (Dias et al., 1998); destruir restos de culturas, principalmente em campos infectados; diminuir a movimentação de pessoas ou implementos no campo, quando as plantas estiverem molhadas (orvalho, irrigação, chuva); evitar plantio direto (Isakeit, 1999; O'Brien & Martin, 1999); fazer rotação de culturas por pelo menos três anos, não utilizando hospedeiros alternativos de *A. citrulli*; evitar plantio em áreas úmidas ou em períodos de muitas chuvas; efetuar adubação equilibrada, sem excesso de nitrogênio (Viana et al., 2000); incorporar silicato de cálcio ao solo (Ferreira et al., 2015); eliminar cucurbitáceas silvestres, como melão-pepino (Oliveira et al., 2003), bucha, cabaça e melão-de-são-caetano (Santos & Viana, 2000; Viana et al., 2000).

Grandes avanços já foram obtidos nas pesquisas do patossistema *A. citrulli*-meloeiro/melanciaira, resultando no estabelecimento de algumas estratégias eficientes para o manejo da mancha aquosa, o que tem possibilitado a redução das perdas em plantios de diversas partes do mundo. No entanto, essa doença ainda é considerada de grande impacto econômico mundial, com riscos elevados para essas culturas e outras cucurbitáceas, uma vez que novas epidemias vêm sendo assinaladas, indicando que se o manejo não for realizado de forma adequada nas três etapas do processo de produção (sementes, plântulas e frutos), *A. citrulli* continuará causando problemas para o produtor.

4. Bibliografia

- ALVES, A. O.; XAVIER, A. S.; VIANA, I. O.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Colonization dynamics of *Acidovorax citrulli* in melon. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 368-372, 2010.
- ASSIS, S. M. P.; MARIANO, R. L. R.; SILVA-HANLIN, D. M. W.; DUARTE, V. Mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* no Estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 191, 1999.
- ASSOULINE, I.; MILSHEIN, H.; MIZRAHI, M.; LEVY, E.; BEM-ZEV, I.S. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* transmitted by solanaceous seeds. **Phytoparasitica**, v. 25, p. 2, 1997.
- BAHAR, O.; KRITZMAN, G.; BURDMAN, S. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. **European Journal Plant Pathology**, v. 123, p. 71-83, 2009.
- BURDMAN, S.; KOTS, N.; KRITZMAN, G.; KOPELOWITZ, J. Molecular, physiological, and host range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* strains from watermelon and melon in Israel. **Plant Disease**, v. 89, p. 1339-1347, 2005.

- BURDMAN, S.; WALCOTT, R. *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 805-815, 2012.
- BUSO, G. S. C.; NASS, L. L.; MARQUES, A. S. A.; LOPES, C. A.; BUSO, J. A. 2004. **Avaliação de genótipos de melão, visando identificar fontes de resistência a *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 12 p. (Comunicado Técnico, 116).
- CABI. ***Acidovorax citrulli* (fruit blotch)**. 2015. Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/2676#tab1nav>>. Acesso em: 27 abr. 2016.
- CARVALHO, F. C. Q.; SANTOS, L. A.; DIAS, R. C. S.; MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. 2012. Selection of watermelon genotypes for resistance to bacterial fruit blotch. **Euphytica**, v. 190, p. 169-180, 2013.
- CONCEIÇÃO, C. S.; FELIX, K. C. S.; MARIANO, R. L. R.; MEDEIROS, E. V.; SOUZA, E. B. Combined effect of yeast and silicon on the control of bacterial fruit blotch in melon. **Scientia Horticulturae**, v. 174, p. 164-170, 2014.
- COSTA, F. M.; SALES JÚNIOR, R.; ALMEIDA, F. A.; LOPES, M. V. Eficiência de Kasugamicina e Hidróxido de Cobre no Controle da Bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, Agente Causal da “Mancha-Aquosa” no Meloeiro. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 6, p. 132-138, 2006.
- CEASA-CE (CENTRAL ESTADUAL DE ABASTECIMENTO DO ESTADO DO CEARÁ). **Produção e exportação de melão no Brasil**. FORTALEZA: Central Estadual de Abastecimento, 2015. Disponível em: <<http://www.ceasa-ce.com.br/index.php/noticias/43866-ceara-ocupa-o-1o-lugar-em-producao-e-exportacao-de-melao-no-brasil->>. Acesso em: 21 abr. 2016.
- DIAS, R. C. S.; COSTA, N. D.; SILVA, P. C. G.; QUEIRÓZ, M. A.; ZUZA, F.; LEITE, L. A. S.; PESSOA, P. F. A.; TARAO, D. A. Cadeia produtiva do melão no Nordeste. In: CASTRO, A. M. G.; LIMA, S. M. V.; GOEDERT, W. J.; FREITAS FILHO, A.; VASCONCELOS, J. R. P. **Cadeias produtivas e sistemas naturais: prospecção tecnológica** (Eds.). Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. p. 440-493.
- DUTTA, B.; AVCI, U.; HAHN, M. G.; WALCOTT, R. R. Location of *Acidovorax citrulli* in infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion. **Phytopathology**, v. 102, p. 461-468, 2012a.
- DUTTA, B.; SCHERM, H.; GITAITIS, R. D.; WALCOTT, R. R. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions. **Plant Disease**, v. 96, p. 705-711, 2012b.
- DUTTA, B.; SCHNEIDER, R. W.; ROBERTSON, C. L.; WALCOTT, R. R. Embryo localization enhances the survival of *Acidovorax citrulli* in watermelon seeds. **Phytopathology**, v. 106, p. 330-338, 2016.
- EPPO (EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION). ***Acidovorax citrulli*: Bacterial fruit blotch of cucurbits**. 2015. Disponível em: <http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/bacteria/Acidovorax_citrulli.html>. Acesso em: 20 abr. 2016.
- FRANKLE, W. G. O.; HOPKINS, D. L.; STALL, R. E. Ingress of watermelon fruit blotch bacterium into fruit. **Plant Disease**, v. 77, p. 1090-1092, 1993.
- FERNANDES, O. A.; FERREIRA, C. C.; MONTAGNA, M. A. **Manejo integrado de pragas de meloeiro**: manual de reconhecimento das pragas e táticas de controle. Jaboticabal: Funep-CNPq, 2000. 28 p.
- FERREIRA, H. A.; NASCIMENTO, C. W. A.; DATNOFF, L. E.; NUNES, G. H. S.; PRESTON, W.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Effects of silicon on resistance to bacterial fruit blotch and growth of melon. **Crop Protection**, v. 78, p. 277-283, 2015.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K. L. Fruit blotch of watermelon in Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 268, 2007.
- HIMANANTO, O.; THUMMABENJAPONE, P.; LUXANANIL, P.; KUMPOOSIRI, M.; HONGPRAYOON, R.; KOSITRATANA, W.; GAJANANDANA, O. Novel and highly specific

- monoclonal antibody to *Acidovorax citrulli* and development of ELISA-based detection in cucurbit leaves and seed. **Plant Disease**, v. 95, p. 1172-1178, 2011.
- HODGE, N. C.; BAIRD, S. M.; GITAITIS, R. G.; HOPKINS, D. L.; STALL, R. E. A bacterium related to *Acidovorax facilis* occurs on watermelon seedlings. **Phytopathology**, v. 85, p. 1187, 1995.
- HOPKINS, D. L. Field spread of bacterial fruit blotch of watermelon. **Phytopathology**, v. 83, p. 466, 1993.
- HOPKINS, D. L. Spread of bacterial fruit blotch of watermelon in the greenhouse. **Phytopathology**, v. 84, p. 755, 1994.
- HOPKINS, D. L.; CUCUZZA, J. D.; WATERWON, J. C. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. **Plant Disease**, v. 80, p. 529-532, 1996.
- HOPKINS, D. L.; CUCUZZA, J. D.; WATTERSON, J. C. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon. **Plant Disease**, v. 87, p. 1495-1499, 2003.
- HOPKINS, D. L.; STALL, R. E.; LATIN, R.; RUSHING, J.; COOK, W. P.; KEINATH, A. P. **Bacterial fruit blotch of watermelon**. gAInNESVILLE: American Sunmelon, 1992. 3 p. (Bulletin).
- HOPKINS, D. L.; THOMPSON, C. M. Evaluation of *Citrullus* sp. germ plasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, v. 86, p. 61-64, 2002.
- HORTIFRUTI BRASIL. **Anuário 2014-2015**. Piracicaba: CEPEA- ESALQ/USP, 2015. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/hfbrasil>>. Acesso em: 19 abr. 2016.
- HORUZ S.; CETINKAYA-YILDIZ R.; MIRIK M.; AYSAN Y. Occurrence, isolation, and identification of *Acidovorax citrulli* from Melon in Turkey. **Plant Protection Science**, v. 50, p. 179-183, 2014.
- ISAKEIT, T. **Bacterial fruit blotch in watermelon**. Corphus Christi: The Agricultural Extension Service, 1999. Disponível em: <http://oaktrust.library.tamu.edu/bitstream/handle/1969.1/86751/pdf_1000.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2016.
- ISAKEIT, T.; BLACK, M. C.; BARNES, L. W.; JONES, J. B. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, v. 81, p. 694-700, 1997.
- KUMAGAI, L. B.; WOODS, P. W.; WALCOTT, R.; MOUA, X. First report of bacterial fruit blotch on melon caused by *Acidovorax citrulli* in California. **Plant Disease**, v. 98, p. 1423, 2014.
- LATIN, R. X. Survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon transplant production facilities. In: HOPKINS, D. et al. **Bacterial fruit blotch of watermelon**. Tampa: Citrus & Vegetable Magazine, 1997. p. 3-4.
- MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. S.; MENDONÇA, H. L.; BARRETO, R. W. Mancha bacteriana da melancia: uma nova bacteriose no estado de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, v. 29, p. 286-287, 2003.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Mancha-aquosa: importante bacteriose do meloeiro no Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p.79-88, 2004.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Melões indefesos. **Cultivar Hortalças e Frutas**, v. 7, p. 08-10, 2007.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; OLIVEIRA, I. S.; NASCIMENTO, A. R. P. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: Imprensa Universitária UFRPE, 2001. p. 141-169.
- MEDEIROS, F. H.V.; MORAES, I. S. F.; SILVA NETO, E. B.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Management of melon bacterial blotch by plant beneficial bacteria. **Phytoparasitica**, v. 37, p. 453-460, 2009.
- MELO, E. A.; MARIANO, R. L. R.; LARANJEIRA, D.; SANTOS, L. A.; GUSMÃO, L. O.; SOUZA, E. B. Efficacy of Yeast in the Biocontrol of Bacterial Fruit Blotch in Melon Plants. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, p.56-64, 2015.

- MORAES, I. S. F.; MEDEIROS, F. H. V.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Proteção de plantas de melão contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* mediada por *Bacillus* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, suplemento, p. 65-66, 2002.
- MOURA, M. C. F.; SILVA, S. G. A.; OLIVEIRA, L. C. S.; SANTOS, E. C. Atividades impactantes da cadeia produtiva do melão no agropólo Mossoró/Assú-N. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, p. 09-14, 2011.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, E. I. Hospedeiros alternativos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 345-349, 2004.
- O'BRIEN, R. G.; MARTIN, A. L. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 39, p. 479-485, 1999.
- OLIVEIRA, A. **Colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro e sobrevivência em restos de cultura e no solo**. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- OLIVEIRA, I. S.; SALES JÚNIOR, R.; MARIANO, R. L. R. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*: método de isolamento e transmissão por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 302, 2001.
- OLIVEIRA, I. S.; SALES JÚNIOR, R.; MARIANO, R. L. R. Ocorrência da mancha-aquosa causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, em melão-pepino no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 686, 2003.
- OLIVEIRA, A.; SANTOS, M. H. M.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R. Biocontrole da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes com bactérias epifíticas e endofíticas. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 373-377, 2006.
- OLIVEIRA, J. C.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; CARDOSO, E.; VIANA, I. O. Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 480-487, 2007.
- POPOVIĆ, T.; IVANOVIĆ, Ž. Occurrence of *Acidovorax citrulli* causing bacterial fruit blotch of watermelon in Serbia. **Plant Disease**, v. 99, p. 886, 2015.
- RANE, K. K.; LATIN, R. X. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. **Plant Disease**, v. 76, p. 509-512, 1992.
- ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAN, L. O. S. Podridões de frutos de melão em pós-colheita causadas por bactérias no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 195, 1992.
- ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J.; RAMOS, R. S.; SINIGAGLIA, C. Mancha bacteriana da melancia no estado de São Paulo, causada por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, p. 48, 1991.
- RUSHING, J. W.; COOK, W. P.; KEINATH, A. P. Postharvest behavior of watermelon fruit blotch. In: HOPKINS, D. et al. (Eds.). **Bacterial fruit blotch of watermelon**. Tampa: Citrus & Vegetable Magazine, 1997. p. 5-6.
- SALES JUNIOR, R.; OLIVEIRA, I. S.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, G. F.; NUNES, G. H. S. Kasugamycin and copper oxichloride effect on bacterial blotch of melon. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 295-298, 2005.
- SALES JUNIOR, R.; PONTES FILHO, F.S.T.; NUNES, G. H. S.; TORRES, G. R. C. Eficiência de Acybenzolar-S-Methyl e oxicleto de cobre no controle de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha-aquosa do meloeiro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, p. 66-70, 2007.
- SANTOS, A. A.; VIANA, F. M. **Mancha-aquosa do melão**. Fortaleza: EMBRAPA-SPI, 2000. 2 p.
- SANTOS, E. R.; GOUVEIA, E. R.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 376-378, 2006.
- SCHAAD, N. W.; SONG, W. Y.; HATZILOUKAS, E. **PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax***. Alexandria: United States Patent and Trademark Office, 2000. (US Patent no. 6146834)
- SCHAAD, N. W.; SOWELL JÚNIOR, G.; GOTH, R. W.; COLWELL, R. R.; WEBB, R. E. "*Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov.". **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, p. 117-125, 1978.

- SILVA, K. M. M.; XAVIER, A. S.; GAMA, M. A. S.; LIMA, N. B.; LYRA, M. C. C. P.; MARIANO, R. L. R.; SOUZA, E. B. Polyphasic analysis of *Acidovorax citrulli* strains from northeastern Brazil. **Scientia Agricola**, v.73, p.252-259, 2016.
- SILVA NETO, E. B.; MEDEIROS, F. H. V.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Controle químico da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, suplemento, p. 340, 2003.
- SILVA NETO, E. B.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L.; SANTOS, L. A. Penetração e colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em folhas, frutos e sementes de melão amarelo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 84-88, 2006.
- SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; OLIVEIRA, S. M. A. Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 34-38, 2004.
- SILVEIRA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Severidade da mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 171-175, 2003.
- SOMODI, G. C.; JONES, J. B.; HOPKINS, D. L.; STALL, R. E.; KUCHARAK, T. A.; HODGE, N. C.; WATTERSON, J. C. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. **Plant Disease**, v.75, p. 1053-1056, 1991.
- SOWELL, G.; SCHAAD, N. W. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon: seed transmission and resistance of plant introductions. **Plant Disease Reporter**, v. 63, p. 437-441, 1979.
- TIAN, Y.; ZHAO, Y.; BAI, S.; WALCOTT, R. R.; HU, B.; LIU, F. Reliable and sensitive detection of *Acidovorax citrulli* in cucurbit seed using a padlock-probe-based assay. **Plant Disease**, v. 97, p. 961-966, 2013.
- UENO, B.; COUTO, M. E. O.; UESUGI, C. H. Ocorrência de mancha-aquosa em melão no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 246, 2003.
- VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A.; CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O.; LOPES, C. A. **Surto da mancha-aquosa em frutos de melão nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte: recomendações preliminares de controle**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 4 p. (Comunicado Técnico, 50).
- WALCOTT, R.R. **Bacterial fruit blotch of cucurbits**. The Plant Health Instructor, 2005. DOI: 10.1094/PHI-I-2005-1025-02
- WALCOTT, R. R.; FESSEHAIE, A.; CASTRO, A. C. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit host. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 277-285, 2004.
- WALCOTT, R.R.; GITAITIS, R.D. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v. 84, p. 470-474, 2000.
- WALCOTT, R. R.; LANGSTON JÚNIOR, D. B.; SANDERS JÚNIOR, F. H.; GITAITIS JÚNIOR, R. D. Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. **Phytopathology**, v. 90, p. 191-196, 2000.
- WANG, X.; LI, G.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. **Biological Control**, v. 50, p. 164-171, 2009.
- YAN, S.; YANG, Y.; WANG, T.; ZHAO, T.; SCHAAD, N. W. Genetic diversity of *Acidovorax citrulli* in China. **European Journal of Plant Pathology**, v. 136, p. 171-181, 2013.

Detecção e Variabilidade de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, Agente Causal do Cancro Bacteriano da Videira

Marisa Alvares da Silva Velloso Ferreira

1. Introdução

Com vinhedos do sul ao nordeste brasileiros, a viticultura ocupa uma área de cerca de 81 mil hectares no Brasil. Duas regiões têm destaque, o Rio Grande do Sul por contribuir, em média, com 777 milhões de quilos de uva por ano, e o Submédio do Vale do São Francisco que, com os polos de frutas de Petrolina/PE e Juazeiro/BA, responde por 95% das exportações nacionais de uvas finas de mesa. No Rio Grande do Sul são elaborados, em média anual, 330 milhões de litros de vinhos e derivados, concentrando mais de 90% da produção nacional (MAPA, 2015a).

No semiárido brasileiro, as condições de solo e clima, além da irrigação, favoreceram o estabelecimento e a expansão da fruticultura irrigada, em particular da viticultura, propiciando a produção de frutos de alta qualidade durante todo o ano (Lima & Moreira, 2012). A uva de mesa do Vale do São Francisco é produzida com participação significativa de pequenos produtores, que representam 70% dos viticultores. Embora detenham apenas 17% da área cultivada, produzem mais de 60% da uva do vale (MAPA, 2015a). A viticultura também gera um grande número de empregos diretos e indiretos. O seu cultivo no Nordeste gera cerca de 5 empregos/hectare/ano, representando o maior índice entre as culturas perenes e anuais (Silva & Correia, 2000).

Apesar de todos os aspectos positivos da expansão da área cultivada no Brasil, alguns fatores têm contribuído para a emergência de novas doenças na

videira: o plantio de material suscetível, condições ambientais favoráveis, a coexistência das várias fases fenológicas da planta nos parreirais, a importação de materiais genéticos e o trânsito de material de propagação não certificado. Além de algumas doenças causadas por vírus e fungos, bacterioses emergentes e quarentenárias representam novos desafios para a viticultura nacional. São elas as doenças causadas por pragas quarentenárias ausentes (A1), como *Xylophilus ampelinus*, agente da necrose bacteriana e por pragas quarentenárias presentes (A2), como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv), agente do cancro bacteriano (MAPA, 2013; MAPA 2015b). Importante destacar também *Xylella fastidiosa* (*X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*) agente do Mal de Pierce (Janse & Obradovic, 2010), que embora não incluída na lista de pragas quarentenárias (MAPA, Instrução Normativa nº 59, 2013) não tem ainda registro no país.

2. Ocorrência do cancro bacteriano da videira no Brasil

No Brasil, até o ano de 1998, doenças bacterianas ocorriam de forma esporádica na videira e sem causar grandes prejuízos, e se limitavam à galha da coroa (*Rhizobium radiobacter*, *R. vitis*) relatada em parreirais do Nordeste, em Minas Gerais e São Paulo (Malavolta Jr. et al., 2008; Tavares et al., 2000). No início de 1998, detectou-se pela primeira vez o cancro bacteriano em parreirais da variedade Red Globe no Submédio São Francisco. Seu agente causal foi determinado como *X. campestris* pv. *viticola* por meio de isolamento, testes nutricionais, bioquímicos e de patogenicidade (Lima et al., 1999; Malavolta Jr. et al., 1999a).

Mundialmente, a doença havia sido observada somente na Índia em 1969. O seu agente causal foi descrito por Nayudu (1972) como *Pseudomonas viticola* sp. nov., mas reclassificado por Dye (1978) como *X. campestris* pv. *viticola*. Por mais de 10 anos, desde o primeiro relato na Índia, a doença ou o patógeno não foram alvo de atenção. Sua importância só foi notada naquele país na década de 1980, quando a doença apareceu de forma epidêmica ocasionando perdas entre 60 a 80% (Chand & Kishun, 1990). Com o passar do tempo, tornou-se um problema comum nas regiões viticultoras de Maharashtra, North Karnataka e Andhra Pradesh (Jambenal, 2008). Midha & Patil (2014) citam uma ocorrência na África em 2005, embora sem a referência. O cancro bacteriano permanece, portanto, um problema potencial para cultivos de videira das Américas, Austrália e Europa.

No Brasil, após a primeira detecção em Petrolina/PE em 1998, a doença foi também detectada em cultivos comerciais de *V. vinifera* na região de Teresina/PI

(Malavolta Jr. et al., 1999b) e novos focos da doença foram observados nos municípios de Curaçá, Casa Nova, Sento Sé e Juazeiro na Bahia, nas variedades Festival, Brasil, Benitaka, Patrícia, Piratininga, Ribiere Catalunha (Lima et al., 1999). Nos anos seguintes, observações de plantas sintomáticas e a confirmação da presença do patógeno ocorreram em Jaguaruana/CE (Freire & Oliveira, 2001), Boa Vista/RR (Halfeld-Vieira & Nechet, 2006), Formosa/GO (Junqueira et al., 2006), Tupi Paulista/SP (Rodrigues Neto et al., 2011) e Cianorte/PR (Tomaz et al., 2011). Em alguns desses locais, é relatado que o procedimento de erradicação de plantas foi adotado. No estado de São Paulo, por exemplo, 4.700 plantas foram eliminadas.

O cancro bacteriano é, portanto, uma das doenças de maior preocupação fitossanitária no Vale do São Francisco. Além de causar queda na produtividade, impede o trânsito de material propagativo a partir dos estados onde a bactéria foi registrada e pode limitar a exportação da uva para os mercados interno e externo. Como já exposto, a bactéria é considerada uma praga regulamentada, classificada como quarentenária presente (A2) e está sujeita a um programa oficial de controle segundo a Instrução Normativa Nº 2, de 6 de fevereiro de 2014 (MAPA, 2014).

2. Ocorrência do cancro bacteriano da videira no Brasil

No Brasil, até o ano de 1998, doenças bacterianas ocorriam de forma esporádica na videira e sem causar grandes prejuízos, e se limitavam à galha da coroa (*Rhizobium radiobacter*, *R. vitis*) relatada em parreirais do Nordeste, em Minas Gerais e São Paulo (Malavolta Jr. et al., 2008; Tavares et al., 2000). No início de 1998, detectou-se pela primeira vez o cancro bacteriano em parreirais da variedade Red Globe no Submédio São Francisco. Seu agente causal foi determinado como *X. campestris* pv. *viticola* por meio de isolamento, testes nutricionais, bioquímicos e de patogenicidade (Lima et al., 1999; Malavolta Jr. et al., 1999a).

Mundialmente, a doença havia sido observada somente na Índia em 1969. O seu agente causal foi descrito por Nayudu (1972) como *Pseudomonas viticola* sp. nov., mas reclassificado por Dye (1978) como *X. campestris* pv. *viticola*. Por mais de 10 anos, desde o primeiro relato na Índia, a doença ou o patógeno não foram alvo de atenção. Sua importância só foi notada naquele país na década de 1980, quando a doença apareceu de forma epidêmica ocasionando perdas entre 60 a 80% (Chand & Kishun, 1990). Com o passar do tempo, tornou-se um problema comum nas regiões vitícolas de Maharashtra, North Karnataka e

Andhra Pradesh (Jambenal, 2008). Midha & Patil (2014) citam uma ocorrência na África em 2005, embora sem a referência. O cancro bacteriano permanece, portanto, um problema potencial para cultivos de videira das Américas, Austrália e Europa.

No Brasil, após a primeira detecção em Petrolina/PE em 1998, a doença foi também detectada em cultivos comerciais de *V. vinifera* na região de Teresina/PI (Malavolta Jr. et al., 1999b) e novos focos da doença foram observados nos municípios de Curaçá, Casa Nova, Sento Sé e Juazeiro na Bahia, nas variedades Festival, Brasil, Benitaka, Patrícia, Piratininga, Ribiere Catalunha (Lima et al., 1999). Nos anos seguintes, observações de plantas sintomáticas e a confirmação da presença do patógeno ocorreram em Jaguaruana/CE (Freire & Oliveira, 2001), Boa Vista/RR (Halfeld-Vieira & Nechet, 2006), Formosa/GO (Junqueira et al., 2006), Tupi Paulista/SP (Rodrigues Neto et al., 2011) e Cianorte/PR (Tomaz et al., 2011). Em alguns desses locais, é relatado que o procedimento de erradicação de plantas foi adotado. No estado de São Paulo, por exemplo, 4.700 plantas foram eliminadas.

O cancro bacteriano é, portanto, uma das doenças de maior preocupação fitossanitária no Vale do São Francisco. Além de causar queda na produtividade, impede o trânsito de material propagativo a partir dos estados onde a bactéria foi registrada e pode limitar a exportação da uva para os mercados interno e externo. Como já exposto, a bactéria é considerada uma praga regulamentada, classificada como quarentenária presente (A2) e está sujeita a um programa oficial de controle segundo a Instrução Normativa Nº 2, de 6 de fevereiro de 2014 (MAPA, 2014).

3. Sintomas, ciclo da doença e condições favoráveis

Os sintomas podem surgir no limbo foliar como pontos necróticos inicialmente até a necrose de grandes áreas. Nas nervuras e pecíolos das folhas aparecem manchas escuras alongadas e irregulares. Nos ramos surgem os cancos onde a bactéria permanece latente durante o período seco. Outros sintomas são: necrose nas inflorescências, manchas escuras e alongadas na ráquis dos frutos, desuniformidade e lesões necróticas nas bagas (Lima & Moreira, 2002; Lima et al., 1999) (Figura 1). No semiárido, a incidência e a severidade da doença têm sido maiores no primeiro semestre do ano, devido às chuvas, condição que propicia a disseminação e a infecção bacteriana (Lima & Moreira, 2002). O principal prejuízo verificado nas variedades mais suscetíveis (Red Globe e variedades sem sementes) é a redução na produção. Plantas infectadas

produzem cachos com cancos no engaço, inutilizando os frutos para comercialização (Lima & Moreira, 2002; Nascimento & Mariano, 2004).

A bactéria pode sobreviver epifiticamente e em cancos formados nos órgãos da parte aérea, sendo esses responsáveis pela manutenção de inóculo na ausência de condições ideais para a infecção (Araújo, 2001). Com a ocorrência de chuvas, há abundante exsudação a partir desses cancos, o que favorece a disseminação da bactéria e o surgimento de novos focos. A sobrevivência deste patógeno pode também estar relacionada a cancos presentes no material vegetativo podado e remanescente no pomar (Lima, 2008). Após a penetração via ferimentos, a bactéria multiplica-se rapidamente colonizando os espaços intercelulares e atingindo o sistema vascular, sendo transmitida a todos os órgãos da planta (Nascimento & Mariano, 2004). Além de sobreviver em tecidos assintomáticos (Araújo et al., 2004), a bactéria pode também sobreviver em altas populações por, no mínimo, 80 dias em tecido vegetal infectado na superfície do solo (Silva et al., 2012). Uma associação com as sementes e bagas confirmou a natureza sistêmica da colonização (Tostes et al., 2014).

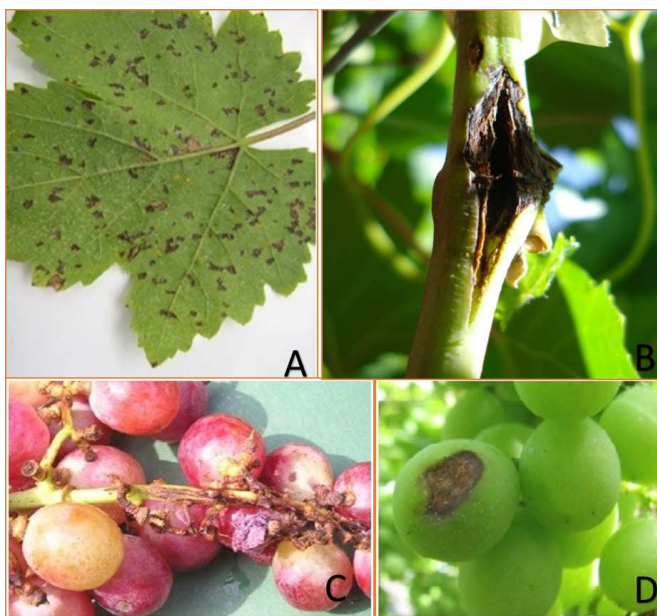


Figura 1. Sintomas do cancro bacteriano da videira: A. lesões necróticas na folha; B. Cancro no ramo; C. Cancro na ráquis; D. Necrose na baga. A, C e D. fotos de L.C. Trindade; B. foto de A.C. Freitas.

Um dos principais meios de disseminação da doença a longas distâncias é o material propagativo de copa e porta-enxerto infectado e utilizado em enxertia e na formação de mudas. Entre as plantas do mesmo parreiral ou entre áreas próximas, a disseminação é favorecida por ventos fortes associados a chuvas, o que pode, também, causar ferimentos em folhas, propiciando a entrada da bactéria na planta. Tratos culturais que resultam em ferimentos como desbrotas e podas, realizadas no período chuvoso, em cultivares suscetíveis, podem propiciar a ocorrência de novas infecções no parreiral (Lima, 2008). Temperaturas em torno de 25 a 30 °C e alta umidade relativa do ar proporcionam condições favoráveis ao desenvolvimento da doença (Nascimento & Mariano, 2004).

Além de infectar a videira, infecção natural também foi observada em plantas invasoras de *Alternanthera tenella* (alecrim,), *Amaranthus* sp. (caruru), *Glycine* sp. (soja perene) e *Senna obtusifolia* (fedegoso,) coletadas em parreirais de Juazeiro e Petrolina (Peixoto et al., 2007). Além dessas, *Desmodium discolor*, *Azadirachta indica* (nim), *Solanum lycopersicum* e *Vigna unguiculata* apresentaram sintomas após inoculação artificial (Santos et al., 2014). Plantas da família Anacardiaceae, como a mangueira (*Mangifera indica*), também foram descritas como hospedeiras potenciais por inoculações artificiais (Araújo & Robbs, 2000; Chand & Kishun, 1990).

4. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: detecção e identificação

O agente causal do cancro bacteriano da videira, originalmente *Pseudomonas viticola* sp. nov. Nayudu (1972), pertence ao gênero *Xanthomonas*, reclassificado por Dye 1978 como *X. campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye. A não inclusão desse patovar nos estudos de Vauterin et al. (1995) tornou sua classificação na espécie *campestris* sujeita à revisão. Parkinson et al. (2009) demonstraram o posicionamento da estirpe NCPPB 2475 (LMG 965), referência do patovar, no grupo filogenético de *X. axonopodis* pv. *citri* (*X. citri* subsp. *citri*) por comparação de sequências da DNA girase B (*gyrB*). Com base na comparação de sequências de outros seis genes de *housekeeping* desse isolado indiano e de isolados do Brasil (dados não publicados) confirmou-se tratar de um patovar distinto dentro da espécie *X. axonopodis* (Rademaker group 9.5), e não *X. campestris*. O sequenciamento do genoma do patotipo (Midha & Patil, 2014) revelou um genoma de 5,1 Mb e, também pela análise de um conjunto de genes conservados, demonstrou-se uma relação filogenética próxima aos patovares de outras fruteiras (*citri*, *punicae* e *mangiferaeindicarum*) todos com origem na Índia e, possivelmente, membros de uma única espécie.

A diagnose precisa do cancro bacteriano da videira depende de métodos que possam detectar a presença de células bacterianas em tecidos (frutos, folhas, ramos) e, ao mesmo tempo, identificá-las. Preferencialmente, esse método deve ser aplicável também a material assintomático que pode conter baixas populações sem induzir nenhum tipo de sintoma ou danos na planta. Os primeiros trabalhos no Brasil demonstraram que a diagnose do cancro podia ser feita com base na avaliação dos sintomas, observação do fluxo bacteriano, isolamento em meio de cultura, realização de testes bioquímicos e nutricionais, teste de hipersensibilidade em folhas de tomate (cv. Santa Clara) e patogenicidade em videira (Lima et al., 1999; Malavolta et al., 1999). No entanto, esses métodos apresentam limitações em função do tempo gasto e da dificuldade de se fazer a diagnose precoce em material assintomático (Trindade et al., 2007). Métodos já desenvolvidos que auxiliam na detecção da bactéria e diagnose da doença são: anticorpos policlonais para uso em ELISA (Araújo et al., 2005), meio semisseletivo (Peixoto et al., 2006), e oligonucleotídeos semiespecíficos (*primers*) para PCR (Trindade et al., 2007).

Peixoto et al. (2006) desenvolveram um meio semisseletivo, NYDAM (NYDA + ampicilina), para isolamento de Xcv. O isolamento a partir de folhas de videira pode apresentar dificuldades pela presença frequente de *Microbacterium barkeri*, bactéria de crescimento rápido e que apresenta caracteres culturais que inicialmente podem ser confundidos com Xcv. Ampicilina adicionada ao meio na concentração de 100 ppm inibe o crescimento desse saprófita e permite o crescimento do patógeno embora com colônias de diâmetro reduzido de 2,5 mm para 1,5 mm. O meio NYDAM facilita o isolamento de Xcv de folhas, principalmente. Combinado com a BIO-PCR o uso desse meio favorece a detecção do patógeno em frutos e folhas assintomáticos (Freitas, 2012).

Métodos moleculares e sorológicos podem ser ferramentas adicionais para a diagnose do cancro bacteriano. Anticorpos policlonais contra o patógeno foram produzidos, caracterizados por ELISA indireto e sua especificidade e sensibilidade determinadas (Araújo et al., 2005). O limite de detecção dos dois anticorpos produzidos (AC 4558 e AC 4560) variou de 10^4 a 10^6 UFC/ml. Embora os autores tenham verificado reações cruzadas com os patovares *vesicatoria*, *campestris* e *mangiferaeindicae*, o método tem relevância prática considerando-se que essas bactérias não infectam videiras. Além da detecção para fins de diagnose, os anticorpos foram usados em ensaios de imunomarcagem para localização e estudos de colonização da bactéria em diversas partes da planta (Araújo et al., 2004; Tostes et al., 2014)

Com o objetivo de desenvolver um método molecular baseado em PCR, três *primers* foram desenhados com base na sequência parcial do gene *hrpB6* (*hrcN*), que codifica proteína integrante do sistema de secreção tipo III (TTSS) (Trindade et al, 2007). As combinações de *primers* Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R que amplificaram fragmentos de 243 e 340 pb, respectivamente, foram testadas quanto à especificidade e sensibilidade para detecção do DNA de Xcv. Com ambos os pares, amplificação foi positiva com o DNA de 44 isolados de Xcv, mas também com quatro isolados do pv. *mangiferaeindicae* e cinco do pv. *passiflorae*. Contudo, a digestão dos produtos de PCR com a enzima *Hae* III permitiu diferenciar Xcv desses patovares. Nenhum dos dois pares de *primers* amplificou o DNA de videira, nem de 20 bactérias não patogênicas isoladas da flora da videira, ou de 10 isolados de fitobactérias diversas. A sensibilidade dos *primers* Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R foi de 10 pg e 1 pg de DNA purificado de Xcv, respectivamente. O limite de detecção de RST2/Xcv3R foi de 10^4 UFC/ml, mas com uma segunda rodada de amplificação com o *primer* interno Xcv1F (Nested-PCR), esse limite foi reduzido para 10^2 UFC/ml.

A aplicação desses *primers* para a detecção e identificação de Xcv foi testada em diferentes formatos e tipos de amostra: DNA purificado, suspensões de células, extratos de macerado de tecidos de videira previamente inoculados, lavados de folhas e frutos enriquecidos ou não em meio de cultura líquido ou sólido (Freitas, 2012; Trindade 2007; Trindade et al., 2007). Não foi possível detectar por PCR a presença de Xcv usando-se macerados de tecidos diretamente na reação, mas amplificações são positivas quando se utiliza uma etapa de enriquecimento em meio de cultura antes da PCR (BIO-PCR conforme Schaad et al., 1995). Detectou-se Xcv em 1 µl da suspensão obtida do lavado das placas e em uma suspensão obtida a partir de uma única colônia (Trindade et al., 2007). Assim, o uso da PCR com qualquer das combinações de *primers*, ou no formato Nested-PCR para maior sensibilidade, pode ser usado como ferramenta para confirmação da identidade da bactéria, seja a partir do DNA purificado, suspensão de células ou colônias em meio de cultura (Figura 2).

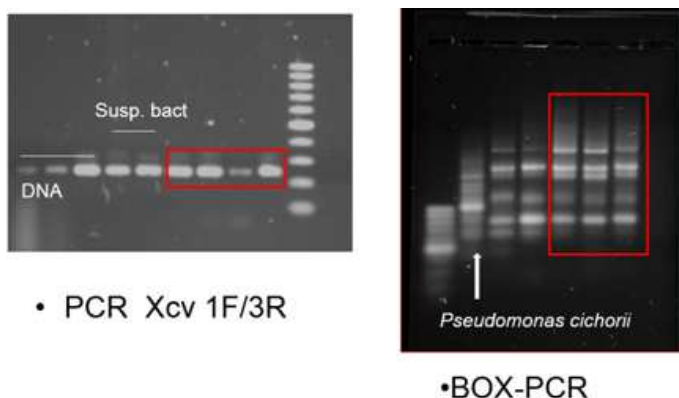


Figura 2. PCR específica e BOX-PCR como ferramentas para identificação de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. À esquerda: amplificação positiva de isolados de Xcv (DNA ou suspensão) comparados a quatro amostras suspeitas. À direita: perfis de BOX-PCR mostram padrões idênticos entre dois isolados de Xcv e três isolados suspeitos, confirmando sua identidade. O padrão de bandas de outra bactéria não relacionada, *Pseudomonas cichorii*, foi incluído para comparação.

Para fins de detecção em material assintomático, o limite mínimo de detecção de Xcv por BIO-PCR e Nested-PCR foi determinado com a inoculação de Xcv em frutos e folhas de videira em concentrações crescentes de 10^2 a 10^8 UFC/ml. O limite mínimo de detecção por BIO-PCR em frutos e folhas foi de 10^2 UFC/ml. Com a Nested-PCR o limite mínimo de detecção em frutos foi de 10^2 UFC/ml e de 10^3 UFC/ml em folhas, no entanto, nessas concentrações a detecção não foi possível em 100% das repetições nos experimentos realizados (Freitas, 2012).

A validação da BIO-PCR e Nested-PCR para detecção de Xcv foi realizada com a coleta de amostras de folhas e pecíolos de Red Globe com e sem sintomas, em dois viveiros e em três áreas de produção de videira em Petrolina, PE, em 2012. A BIO-PCR foi mais eficiente na detecção de Xcv (Figura 3). Em relação às amostras com sintomas, a detecção foi positiva por BIO-PCR em 97% das amostras contra 69,7% por Nested-PCR. Das amostras sem sintomas, cerca de 30% foram positivas por BIO-PCR, mas nenhuma amostra foi positiva por Nested-PCR. Nos viveiros, do total de 60 amostras de folhas assintomáticas coletadas, três amostras (5%) foram positivas por BIO-PCR, mas nenhuma delas foi positiva por Nested-PCR.

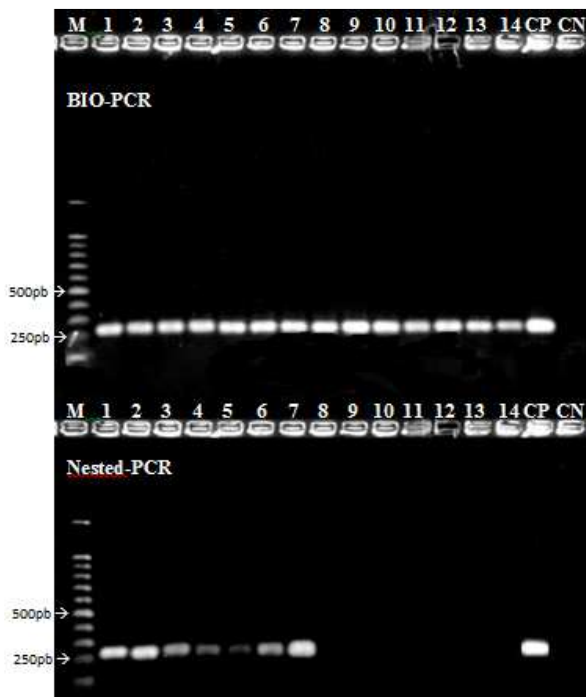


Figura 3. Comparação entre BIO-PCR e Nested-PCR utilizando os iniciadores Xcv1F/Xcv3R para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em amostras coletadas em Petrolina, PE, 2012. M – Marcador 100pb DNA Ladder (Promega®); CN – controle negativo: reação livre de DNA; CP – controle positivo de DNA purificado do isolado A-2; 1–7: Lavado de folhas de Red Globe com sintomas; 8-14: Lavado de folhas de Red Globe sem sintomas (Freitas, 2012).

5. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*: variabilidade

Variabilidade fenotípica: *X. campestris* pv. *viticola* é uma bactéria bastonetiforme Gram-negativa, com um único flagelo polar e metabolismo aeróbico. As colônias são arredondadas, convexas, brilhantes e de bordos lisos e coloração creme-esbranquiçada. (Lima et al. 1999; Malavolta Jr. et al., 1999a). Isolados coletados na época da primeira ocorrência da doença no país (1998/99) oriundos de Pernambuco e Bahia mostraram-se um grupo homogêneo em relação às propriedades bioquímicas e nutricionais, tendo como características comuns: atividade de catalase, ausência de pigmentos fluorescentes em meio King's B e de atividade de urease e oxidase, não utilização de asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, ausência de inclusões de poli- β -hidroxibutirato e crescimento médio (48 - 72 horas) entre 28°C e 33°C, mas não a 41°C e produção de ácidos a partir de glucose, manose, galactose, trehalose, e frutose (Malavolta Jr. et al., 1999a; Lima et al., 1999). A produção de ácidos a partir de celobiose foi positiva segundo Lima et al. (1999), mas não foi detectada nos isolados estudados por Malavolta Jr. et al. (1999a). Reações variáveis também ocorreram quanto à tolerância a NaCl, variando entre concentrações de 1 e 2 %, podendo chegar a 5%, e quanto à reação de hipersensibilidade em fumo (*Nicotiana tabacum*). Em fumo, enquanto alguns isolados não induzem nenhuma reação, outros induzem reação fraca, caracterizada pelo aparecimento de clorose e necrose após 72 horas (Ferreira et al., 2000). Em tomate Santa Clara, ao contrário, todos os isolados tiveram reação positiva (Malavolta Jr. et al., 1999, Marques, 2007). Entretanto, no estudo de Gama (2014) envolvendo 115 isolados, foi verificada reação variável, com 24 isolados apresentando reação negativa em tomateiro.

Variabilidade na sensibilidade ao cobre: O controle químico com produtos à base de cobre logo após a poda, brotação ou quando há a ocorrência de ferimentos, é recomendado. No entanto, sabe-se que sua utilização frequente pode levar à resistência. Araújo (2001) demonstrou a ocorrência de isolados tolerantes ao cobre na região de Petrolina (tolerância *in vitro* até 300 μ g/mL de cobre). Em outro estudo, isolados mais tolerantes também foram detectados na Bahia e Piauí (Marques, 2007; Marques et al., 2009). Esses estudos assim como o de Chand et al. (1994) indicam que a resistência ao metal está presente em isolados do Brasil e Índia. A variabilidade na tolerância encontrada entre e dentro áreas de coleta sugere que houve uma disseminação de isolados mais tolerantes por meio de material propagativo para esses diferentes locais ou mesmo uma seleção local dos isolados com menor sensibilidade, ocasionada pela pressão de

seleção devido às aplicações excessivas de produtos a base de cobre. Corroborando os resultados de tolerância *in vitro* aos íons cobre, Marques (2007) verificou a presença do gene *copA* em todos os 37 isolados de Xcv testados. O gene foi amplificado por PCR com *primers* desenhados a partir das sequências dos genes de Xcv e *X. axonopodis* pv. *citri*. O isolado patotipo de Xcv, NCPPB 2475 da Índia, não mostrou tolerância ao cobre, mas apresentou o respectivo gene envolvido na resistência ao cobre.

Variabilidade genética: O método de rep-PCR (repetitive PCR) tem sido usado para estudos de variabilidade intrapatovar em Xcv. Em um primeiro estudo, 40 isolados, coletados entre 1998 e 2001 em Pernambuco, Bahia e Piauí, tiveram seus padrões genômicos comparados. A análise combinada dos padrões obtidos com os *primers* REP, ERIC e BOX, mostraram similaridade superior a 80% entre a maioria dos isolados brasileiros (29) e o isolado tipo NCPPB 2475, originário da Índia. Os isolados brasileiros apresentaram padrões similares e algumas bandas diagnósticas, presentes em todos os isolados (Fig.4). Os padrões foram distintos dos isolados de outros patovares e de um isolado não-patogênico obtido de folhas de videira. O polimorfismo detectado entre os isolados brasileiros permitiu a diferenciação de cinco subgrupos, sem relação com cultivar de origem, local ou ano de coleta, mas já um indicativo de variabilidade nesse conjunto de isolados (Trindade et al., 2005).

Um estudo posterior avaliou mais 27 isolados coletados entre 2003 e 2006 e comparou seus *fingerprints* por rep-PCR. Da mesma forma, foram observados padrões semelhantes entre os isolados com certo grau de polimorfismo, porém muito limitado principalmente por BOX-PCR, em que 28 dos 33 isolados apresentaram o mesmo perfil (Marques, 2007). A técnica de ITS-RFLP também foi avaliada para detecção de variabilidade em Xcv, no entanto, não mostrou nenhum polimorfismo entre os 33 isolados avaliados.

Mais recentemente, um estudo envolvendo um maior número de isolados de Xcv (Gama, 2014) avaliou a variabilidade metabólica, molecular e patogênica de 115 isolados brasileiros, por meio de testes fenotípicos (127 características metabólicas por testes bioquímicos convencionais e sistema Biolog), componentes epidemiológicos da doença após inoculação em folhas da variedade Red Globe e rep-PCR. Os isolados formaram um grupo homogêneo com alta similaridade metabólica (77 a 97%) e similaridade acima de 88% entre os perfis de rep-PCR dos isolados. A avaliação dos componentes epidemiológicos permitiu verificar a existência de variabilidade na agressividade entre isolados, sendo a maioria dos isolados (106) classificados nos grupos A e B de severidade que correspondem à agressividade média e alta. Esse tipo de estudo é relevante

no sentido de permitir a seleção de isolados representativos da variabilidade intrapatovar para o desenvolvimento de cultivares resistentes ao cancro bacteriano, assim como para a investigação da interação videira-Xcv (Gama, 2014).

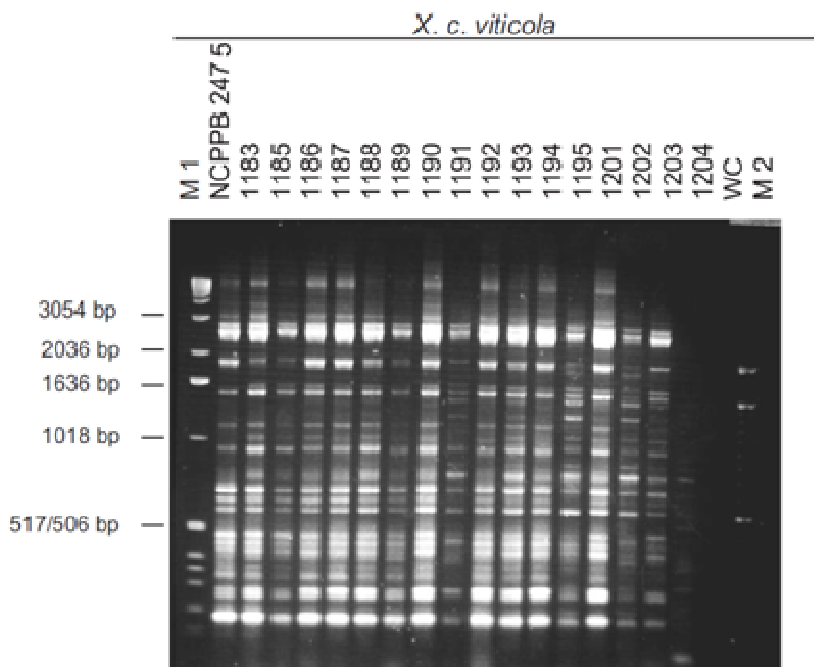


Figura 4. Variabilidade genética de *Xanthomonas campestris* pv *viticola* detectada por ERIC-PCR. Isolados brasileiros coletados entre 1998-2001 foram comparados ao isolado de referência do patovar NCPPB 2475. NI: bactéria não patogênica isolada comumente de folhas de videira, não identificada; WC: Controle negativo da PCR ; M: marcador 1 Kb DNA ladder (M1) e 100 bp-DNA ladder (M2). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Trindade et al., 2005).

Além de rep-PCR, outras alternativas para análise da diversidade bacteriana têm sido utilizadas com maior poder de resolução. MLVA (multi locus variable number of tandem repeat analysis) é um método que tem sido extensivamente utilizado para monitorar epidemias e determinar a estrutura de populações de

patógenos humanos. Para as fitobactérias, esquemas MLVA já foram publicadas para *X. citri* pv. *citri* (Bui et al., 2009), e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Zhao et al., 2012), entre outras. A técnica baseia-se na detecção do polimorfismo intrapatovar, relativo a diferenças no número de cópias de pequenas sequências nucleotídicas repetidas *in tandem* (micro ou minissatélites). As vantagens da MLVA são a alta reprodutibilidade e o alto poder discriminatório, no entanto, é necessário, em um primeiro momento, avaliar loci candidatos para identificar os mais informativos. Estudos com uma coleção de Xcv e oito loci VNTR (Ferreira et al., dados não publicados) detectaram variabilidade com 101 tipos VNTR em 107 isolados. O número de alelos variou de 5 a 12 por locus. A análise diferenciou a população brasileira de dois isolados indianos, que apresentaram, em três loci, alelos não encontrados entre os isolados brasileiros. Nossos estudos indicam que MLVA pode-se constituir uma excelente ferramenta para o monitoramento da variabilidade do patovar *viticola* nas áreas de ocorrência do cancro bacteriano no Brasil.

6. Considerações finais

O manejo do cancro bacteriano baseia-se principalmente na adoção de medidas preventivas, tais como o uso de material de propagação sadio. Nesse contexto, métodos eficazes de detecção da bactéria na planta (áreas de produção ou viveiros) com especificidade e sensibilidade conhecidas são extremamente importantes. O que temos hoje disponível como ferramentas de detecção (BIO-PCR) apresenta alguma limitação com relação ao número de etapas e à sensibilidade, e ainda há a necessidade de estabelecimento de controles internos para falso negativos. Dessa forma, alternativas, como a PCR em tempo real, que propiciem mais rapidez com maior sensibilidade estão sendo consideradas e desenvolvidas.

Outra prática comum no manejo da doença é o uso de produtos à base de cobre logo após a poda, brotação ou quando há a ocorrência de ferimentos. Contudo, estirpes resistentes ao cobre já foram relatadas, o que pode limitar a eficiência dessa medida de controle. Nessa situação, variabilidade da bactéria quanto a tolerância ao cobre deve ser alvo constante de monitoramento. Da mesma forma, a existência da variabilidade intrapatovar quanto à agressividade já relatada de Xcv deve ser levada em consideração na seleção de material resistente ao cancro bacteriano.

O estabelecimento do patovar *viticola* no Brasil foi possível por condições ambientais que favoreceram uma população inicial bastante agressiva e que se

diversificou com o tempo. Metodologias para avaliar e monitorar essa variabilidade e os mecanismos que esse patógeno utiliza para gerar variabilidade ainda devem ser alvos de pesquisa mais aprofundadas.

7. Agradecimentos

Aos ex-alunos do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UnB: Loiselene Trindade, Eder Marques e Anna Cristina de Freitas, aos colegas da UnB, e colaboradores da Embrapa Semiárido, UFRPE e INRA. Ao CNPq e CAPES pelas bolsas e auxílios à pesquisa ao longo dos anos.

8. Bibliografia

- ARAÚJO, J. S. P. **Perfil epidemiológico e subsídios para controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera* L.)** no Brasil. 2001, 121f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- ARAÚJO, J. S. P.; OLIVEIRA, B. C.; OLIVARES, F. L.; REIS-JUNIOR, F. B.; CRUZ, G. B.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D. Imunomarcagem de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* com ouro utilizando anticorpos policlonais. **Agronomia**, v. 38, p. 29-33, 2004.
- ARAÚJO, J. S. P.; REIS-JUNIOR, F. B.; CRUZ, G. B.; OLIVEIRA, B. C.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 305-309, 2005.
- ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. F. Sintomatologia, patogenicidade e controle do cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) no Brasil. **Agronomia**, v. 34, p. 83-86, 2000.
- BUI THI NGOC, L.; VERNIERE C.; VITAL K.; GUERIN F.; GAGNEVIN L.; AH-YOU N.; PRUVOST, O. Development of 14 minisatellite markers for the citrus canker bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *citri*. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 125-127, 2009.
- CHAND, R.; KISHUN, R. Outbreak of grapevine bacterial canker disease in India. **Vitis**, v. 29, p. 183-188, 1990.
- CHAND, R.; SINGH, P. N.; SINGH, D.; SINGH, R. Copper and Streptomycin Resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 101, p. 487-491, 1994.
- DYE, DW. Genus IX *Xanthomonas* Dowson 1939. In: YOUNG, J. M., BRADBURY, J. F., PANAGOPOULOS, C.G., ROBBS, C.F. (Eds.). A proposed nomenclature and classification for pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 21. pp. 153-177, 1978.
- FERREIRA, M. A. S. V.; BRAGA, J. P.; FRANÇA, C. D.; UESUGI, C. H.; LIMA, M. F. Caracterização bioquímica de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 459, 2000.
- FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, A. D. S. **Ocorrência do cancro bacteriano da videira no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 2 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 62).

- FREITAS, A. C. **Detecção molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videiras assintomáticas**. 2012, 71f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília.
- GAMA, M. A. S. **Variabilidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente do cancro bacteriano da videira**. 2014, 65 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, L.K. Bacterial canker of grapevine in Roraima, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 604, 2006.
- JAMBENAL, S. **Studies on bacterial leaf spot of grape caused by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye in Northern Karnataka**. 2008. 64f. Dissertação (Master in Plant Pathology) – University of Agricultural Sciences, Dharwad.
- JANSE, J. D.; OBRADOVIC, A. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, p.35-48, 2010.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; VAZ, C. F.; SANTOS, E. C.; JUNQUEIRA, L. P.; SOUZA, L. S.; LIMA, C. A. Ocorrência do cancro bacteriano da videira na região do entorno do Distrito Federal. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2006, Cabo Frio, RJ. Frutas do Brasil: Saúde para o mundo. **Palestras e Resumos ...** Cabo Frio: SBF/UENF/UFRRJ. 2006. p. 323.
- LIMA, M. F. Doenças que comprometem a produção e a comercialização da uva. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO. 1., 2008. **Resumos ...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. p. 13-14.
- LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V.; MOREIRA, A. W.; DIANESE, J. C. Bacterial canker of grapevine in Brazil caused by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 440-443, 1999.
- LIMA, M. F.; MOREIRA, F. R. B. **Uva de mesa: fitossanidade**. Brasília: Embrapa, 2012. 111 p.
- 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 Phytopathologica**, v. 25, p. 262-264, 1999a.
- MALAVOLTA JR., V. A.; BERIAM, L. O. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J. ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **SummaPhytopathologica**, v. 34, p.1-88, 2008.
- MALAVOLTA JR., V.A.; ALMEIDA, J. M. G.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E. J. P.; NOGUEIRA, E. M. C. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Estado do Piauí. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 89, 1999b.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Pragas regulamentadas**: lista de pragas quarentenárias ausentes. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2015b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/importacao/requisitos-fitossanitarios/quarentena/lista-de-pragas>>. Acesso em: abril, 2016.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2015a. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva/>>. Acesso em: abril, 2016.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Instrução normativa Nº 2, de 6 de fevereiro de 2014**. D.O.U. de 07/02/2014. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em:

- <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: abril, 2016.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Lista de pragas quarentenárias presentes, atualizada em dezembro de 2013**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2013/12/mapa-divulga-lista-de-pragas-quarentenarias>> Acesso em: abril, 2016.
- MARQUES, E. **Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. agente causal do cancro bacteriano da videira**. 2007, 129f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília.
- MARQUES, E.; UESUGI, C. H.; FERREIRA, M. A. S. V. Sensitivity to copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 406-411, 2009.
- MIDHA, S.; PATIL, P. B. Genomic insights into the evolutionary origin of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and its ecological relatives. **Applied Environmental Microbiology**, v. 80, p. 6266-6279. 2014.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, v. 34, p. 301-307. 2004.
- NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grape vine. **Journal Phytopathology**, v. 73, p. 183-186, 1972.
- PARKINSON, N.; COWIE, C.; HEENEY, J.; STEAD, D. Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 264-274, 2009.
- PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; MOREIRA, J. O. T.; VIANA, I. O. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p.161-164, 2007.
- PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciencia Rural**, v. 36, p. 1317-1320, 2006.
- RODRIGUES NETO, J.; DESTÉFANO, S. A. L.; RODRIGUES, L. M. R.; PELLOSO, D.S.; OLIVEIRA JÚNIOR, L. C. Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. **Tropical Plant Pathology**, v.36, p. 42-44, 2011.
- SANTOS, M. M.; PEIXOTO, A. R.; PESSOA, E. S.; GAMA, M. A.; MARIANO, R. M. R.; BARBOSA, M. A. G.; PAZ, C. D. Identificação de potenciais plantas hospedeiras alternativas de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciencia Rural**, v. 44, p. 595-598, 2014.
- SCHAAD, N. W.; CHEONG, S. S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N. J. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, v. 85, p. 243-248, 1995.
- SILVA, A. M. F.; MENEZES, E. F.; SOUZA, E. B.; MELO, N. F.; MARIANO, R. L. Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 757-765, 2012.
- SILVA, P. C. G.; CORREIA, R. C. Caracterização social e econômica da videira. In: Leão PCS, Soares JM (Org.). **A viticultura no semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. p. 19-32.
- TAVARES, S. C. C. H.; LIMA, M. F.; MELO, N. F. Principais doenças da videira e alternativas de controle. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Eds.). **A viticultura no semiárido brasileiro**. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2000. p.293-346.
- TOMAZ, R.; SCREMIN, R. M.; FERREIRA, M. A. S. V.; BARBOSA, M. A. G. Detecção e erradicação de videiras com sintomas do cancro bacteriano no Estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 136, 2011.

- TOSTES, G. O; ARAÚJO, J. S. P.; FARIAS, A. R. G.; FRADE, D. A. R.; OLIVARES, F. Detection and cellular localization of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in seeds of commercial 'Red Globe' grapes. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 134-140, 2014.
- TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 46-54, 2005.
- TRINDADE, L. C.; MARQUES, E.; LOPES, D. B.; FERREIRA, M. A. S. V. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p.16-23, 2007.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 472-489, 1995.
- ZHAO, S.; POULIN, L.; RODRIGUES, R. M.; SERNA, N. F.; LIU, S. H.; WONNNI, I.; SZUREK, B.; VERDIER, V.; LEACH, J. E.; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; KOEBNIK, R. Development of a variable number of tandem repeats typing scheme for the bacterial rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **Phytopathology**, v. 102, p. 948-956, 2012.

Manejo do Cancro Bacteriano da Videira no Vale do São Francisco

Maria Angélica Guimarães Barbosa

Pedro Martins Ribeiro Júnior

Diógenes da Cruz Batista

1. Histórico da doença

O cancro bacteriano da videira é causado pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, tendo sido descrito, pela primeira vez, na Índia, no ano de 1969 (Nayudu, 1972). Esta bactéria foi detectada pela primeira vez, no Brasil, em março de 1998, em Petrolina-PE, no Vale do São Francisco (Malavolta Jr. et al., 1999a) e, até este momento, só havia tido um único registro em todo o mundo. Apesar do cancro bacteriano ter sido encontrado infectando plantas jovens da cultivar Red Globe (Malavolta Jr. et al., 1999a), esta cultivar já havia sido introduzida no Vale do São Francisco desde o ano de 1984, proveniente dos Estados Unidos. No entanto, a partir do ano de 1996, houve uma grande procura por novas cultivares sem sementes, sendo introduzidos materiais de várias partes do mundo de forma clandestina. Assim, acredita-se que *X. campestris* pv. *viticola* foi introduzida a partir de um desses materiais trazidos, provavelmente, da Índia e, ao encontrar condições ambientais propícias e cultivares suscetíveis, como a Red Globe, houve o início da epidemia.

O agente causal do cancro bacteriano da videira é considerado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Instrução Normativa Nº 59/2013, como Praga Quarentenária Presente (A2) nos Estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Roraima, estando sujeita a controle oficial (Brasil, 2013). Apesar da IN 59/2013 reconhecer a presença de *X. campestris* pv. *viticola*

nesses estados, já houve vários relatos de ocorrência do cancro bacteriano em outras partes do País.

Após a doença ser detectada em Petrolina/PE, sintomas característicos do cancro bacteriano foram observados, em maio do mesmo ano, em ramos e folhas das cultivares Red Globe, Itália e Ribier em cultivos comerciais da região de Teresina/PI, sendo, portanto, o segundo relato do patógeno no país (Malavolta Jr. et al., 1999b). Entre os anos de 1998 e 1999, o cancro bacteriano já havia sido encontrado em vários parreirais dos municípios de Petrolina/PE e de Santa Maria da Boa Vista/PE, assim como em municípios da Bahia localizados no Submédio do Vale do São Francisco. Inspeções fitopatológicas realizadas no ano de 2001 no Município de Jaguaruana/CE comprovaram a ocorrência do cancro bacteriano em videiras das cultivares Red Globe, Flame e Superior (Freire & Oliveira, 2001).

Em julho de 2006, em plantações de videiras no município de Boa Vista/RR verificou-se a presença de plantas com sintomas de cancro e necrose nas folhas, sendo confirmada a presença do cancro bacteriano da videira no estado e este foi o quinto relato da bacteriose no Brasil. As plantações de videira em Boa Vista/RR tinham sido estabelecidas com material propagativo oriundo de Petrolina, local de ocorrência da bacteriose (Halfeld-Vieira & Nechet, 2006). Após estes primeiros relatos, a presença de *X. campestris* pv. *viticola* foi comprovada em Goiás, São Paulo e Paraná (Junqueira et al., 2006; Rodrigues Neto et al., 2011; Tomaz et al., 2011), onde medidas de erradicação foram adotadas.

Apesar da adoção de medidas de erradicação nos estados de Goiás, São Paulo e Paraná, novos focos vêm surgindo ao longo do tempo e novas ações do processo de erradicação têm sido implementadas. Entretanto, o risco de disseminação de *X. campestris* pv. *viticola* para regiões de clima mais favorável para a ocorrência da doença é uma ameaça constante.

2. Sintomatologia

Os sintomas do cancro-bacteriano da videira surgem nas folhas, na forma de pequenas lesões necróticas e angulares, com presença ou ausência de halos amarelados, distribuídas no limbo foliar (Figura 1A). Estas manchas podem coalescer e formar grandes áreas necróticas (Nayudu, 1972). Nas nervuras, pecíolos, ramos e ráquis dos frutos, é comum o aparecimento de manchas escuras deprimidas e alongadas. Estas manchas evoluem para fissuras longitudinais de coloração negra, conhecidas como cancos. Nos cachos, os

sintomas também podem aparecer nas bagas, na forma de lesões necróticas arredondadas, desuniformes no tamanho e na cor, além de murcha das bagas quando ocorre grandes cancrios na ráquis (Lima et al., 1999; Malavolta Jr. et al., 1999a, Nayudu, 1972) (Figura 1B).

O cancro bacteriano da videira pode causar grandes prejuízos para a produção de uvas. A bactéria pode infectar as folhas, reduzindo a área fotossintética da planta, consequentemente, diminuindo suas reservas, afetando, assim, a produção. Quando a infecção ocorre de forma severa no ramo, há o comprometimento da safra seguinte e se os sintomas aparecem nos cachos, estes ficam comprometidos para a comercialização.

3. Epidemiologia

Xanthomonas campestris pv. *viticola* pode sobreviver em condições de campo, em videiras infectadas, epifiticamente em plantas assintomáticas (Araújo, 2001), e em grande gama de hospedeiros alternativos quando inoculada artificialmente (Araújo et al., 1999; Peixoto et al., 2007; Santos et al., 2014). No entanto, foram encontrados sintomas de cancro bacteriano ocorrendo naturalmente apenas nas plantas invasoras *Alternanthera tenella* Colla, *Amaranthus* sp., *Glycine* sp. e *Senna obtusifolia* (L.) H.S. Irwin & Barneby (Peixoto et al., 2007). A bactéria ainda foi encontrada em restos de poda na superfície do solo por, pelo menos, 80 dias (Silva et al., 2012) e em ferramentas, mesmo sem a presença de material orgânico, por até 24 horas (Naue et al., 2014a).

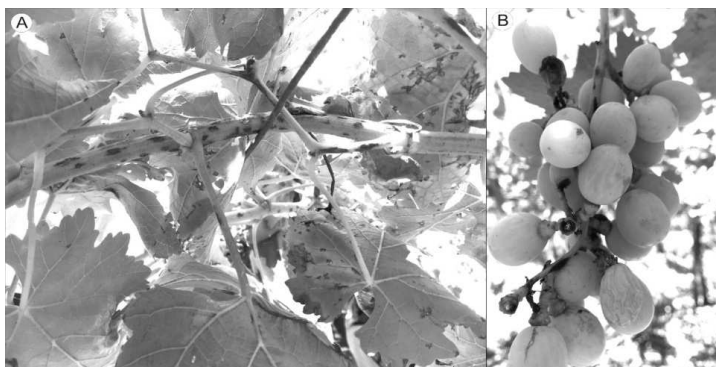


Figura1. Sintomas do cancro bacteriano nas folhas e ramos (A) e no cacho (B) de videira. Fotos: Maria Angélica Guimarães Barbosa.

A disseminação de *X. campestris* pv. *viticola* ocorre a longas distâncias, principalmente, pelo transporte de material propagativo infectado (Nascimento et al., 2000), podendo ocorrer também por meio de ferramentas utilizadas em plantas infectadas (Naue et al., 2014a). A curta distância, o principal meio de disseminação é por respingos de chuva ou de água de irrigação e por tratamentos culturais, como poda, torção dos ramos, desbrota, raleio, desponde e desfolha. Outra forma de disseminação dessa bactéria é a água utilizada para a hidratação dos bacelos na produção de mudas, pois bacelos infectados podem servir de fonte de inóculo para bacelos sadios que estejam no mesmo tanque de hidratação (Naue et al., 2014a). Apesar da bactéria também já ter sido encontrada em sementes de cachos assintomáticos (Tostes et al., 2014), este não é considerado um meio de disseminação importante, visto que a videira não é propagada por sementes e as uvas destinadas para consumo, dificilmente atingem áreas produtivas.

A intensidade do cancro bacteriano da videira varia de acordo com as condições climáticas e com o nível de resistência das cultivares plantadas (Lima, 2000). Essa doença tem como condições climáticas favoráveis, altas temperaturas e alta umidade relativa do ar, sendo favorecida pela ocorrência de chuvas (Naue et al., 2014b).

4. Manejo

Assim que o cancro bacteriano da videira foi diagnosticado no Vale do São Francisco, foi formada uma comissão composta por representantes da Secretaria de Defesa Agropecuária pertencente ao Departamento de Defesa Sanitária Vegetal do MAPA, pesquisadores da Embrapa Semiárido, representantes da Associação dos Produtores e Exportadores de Hortifrutigranjeiros e Derivados do Vale do São Francisco (Valexport) e outros profissionais envolvidos no setor produtivo, para discutir e regulamentar o cancro bacteriano da videira (Lima & Ferreira, 2012). A partir desta reunião, foi elaborada a Instrução Normativa nº 233/1998 (Brasil, 1998), na qual são recomendadas as medidas a serem tomadas na prevenção e na contenção da disseminação de *X. campestris* pv. *viticola*.

De acordo com a IN 233/1998, as áreas com plantas contaminadas deveriam ser interditadas e, as plantas, erradicadas. O trânsito de plantas e partes de plantas a partir das propriedades com ocorrência da doença foi proibido, os veículos, equipamentos e materiais de colheita deveriam ser desinfestados com amônia

quaternária a 0,1%, após cada utilização. Sendo detectada a ocorrência da bactéria na área, a recomendação era de execução de poda drástica, com eliminação de todos os ramos infectados, deixando apenas o tronco principal, com altura de até 40 cm acima do ponto de enxertia. O tronco resultante deveria ser pulverizado com amônia quaternária, na concentração de 0,1 % e recomendava-se a aplicação de pasta cúprica no local do corte. O material removido pela poda, bem como os restos de cultura existentes na projeção da copa, deveriam ser juntados o mais próximo possível do foco e incinerados imediatamente. O mesmo deveria ser feito com as plantas invasoras que estivessem no local afetado. Ainda segundo a IN 233/1998, a eliminação só era recomendada no caso de plantas severamente infectadas e com suscetibilidade já demonstrada, como no caso das cultivares Red Globe, Festival (Sugraone), Catalunha e Perlette.

Simultaneamente à publicação da IN 233/1998, artigos científicos preconizavam medidas de controle para o cancro bacteriano, tais como plantio de mudas sadias, poda dos ramos infectados, eliminação de restos de cultura infectados, eliminação da prática de torção dos ramos após a aplicação de cianamida hidrogenada, aplicação preventiva de fungicidas cúpricos, aplicação de pasta cúprica após a poda, pulverização de cobre após a floração e a brotação, desinfestação de ferramentas e de equipamentos de colheita com hipoclorito de sódio a 2% ou amônia quaternária a 0,1%, interdição do trânsito de veículos e equipamentos das áreas com ocorrência para as áreas ainda sem ocorrência da doença e higienização das mãos dos trabalhadores (Lima et al., 1999; Malavolta Jr. et al., 1999a). Nascimento et al. (2000) recomendaram a adoção das medidas citadas acima, além da realização de inspeções semanais no parreiral para detecção da doença nos estágios iniciais. Recomendaram, ainda, eliminação de plantas severamente atacadas, programação da época de poda de modo a evitar que as ocorrências de chuvas coincidisse com as fases fenológicas de brotação e chumbinho e utilização de pedilúvio para desinfestação de veículos.

Apesar das orientações, ocorreu rápida disseminação de *X. campestris* pv. *viticola* no Vale do São Francisco, provavelmente, devido à manutenção de plantas infectadas nos parreirais, que serviram de fonte de inóculo para infecções posteriores. A grande troca de material propagativo entre as fazendas, a mão-de-obra itinerante, que realizava os tratos culturais em uma fazenda em um dia e no dia seguinte em outra, na maioria das vezes, portando suas próprias ferramentas contribuíram para a rapidez na disseminação da bactéria. Além desses fatores, a falta de conhecimento dos sintomas da doença por parte dos produtores contribuiu para que não houvesse uma rápida adoção das medidas de contenção

da doença. Para agravar a situação, poucos estudos tinham sido realizados, até então, visto que, em todo o mundo, havia tido registro de *X. campestris* pv. *viticola* apenas na Índia, onde não provocava grandes prejuízos (Nayudu, 1972).

Vários trabalhos foram realizados com o objetivo de determinar os níveis de resistência de cultivares de videira a *X. campestris* pv. *viticola* por meio de inoculações artificiais. Foram avaliadas as cultivares Red Globe, Itália, Benitaka e Rubi, de *Vitis vinifera* L., e os híbridos Niagara Rosada e Niagara Branca de *V. vinifera* x *V. labrusca* L. As cultivares de *V. vinifera* foram mais suscetíveis à bactéria, no entanto, os híbridos avaliados também apresentaram sintomas da doença (Malavolta Jr. et al., 2003). Em outro trabalho, foi avaliada a reação de 20 clones de videira, sendo 13 de copa, das cultivares Red Globe, Benitaka, Brasil, Itália, Moscatel, Thompson, Crimson, Superior (Festival ou Sugraone), Catalunha, Patrícia, Isabel, Cabernet e Petit Syrah e sete de porta-enxerto, das cultivares Courdec, IAC 766, Harmony, IAC 572, 420 A, SO4 e Paulsen. Os clones de *V. vinifera* foram muito suscetíveis ao patógeno, enquanto as cultivares Isabel e Paulsen 1103 apresentaram reduzidos níveis de doença (Nascimento et al., 2006).

Mais recentemente, foram avaliadas 51 cultivares de videira quanto à resistência ao cancro bacteriano. As cultivares Itália e Red Globe apresentaram os maiores níveis de doença em todos os componentes epidemiológicos avaliados, enquanto que os menores níveis de doença foram observados nas cultivares Moscato, Petit Verdot e BRS Cora (Zucal, 2014). Em outro experimento, este autor observou que as cultivares Fiesta, Reliance, Flame e Red Globe apresentaram os maiores níveis de doença, enquanto os menores níveis foram observados em nas cultivares Niagara Rosada, Liberty, Lassif, Freedom e Paulsen 1103.

Além dos trabalhos de avaliação da resistência de cultivares de videira ao cancro bacteriano, estudos foram realizados para a elaboração e validação de escala diagramática para auxiliar na avaliação dessa doença (Nascimento et al., 2005a). Outros estudos realizados foram relacionados a métodos de preservação e crescimento de *X. campestris* pv. *viticola* (Nascimento et al., 2005b), assim desenvolvimento de meio de cultura semisseletivo mais adequado para o isolamento dessa bactéria (Peixoto et al., 2006), métodos sorológicos e moleculares para detecção e identificação de *X. campestris* pv. *viticola* (Araújo et al., 2005; Trindade et al., 2007).

Do ponto de vista da regulamentação fitossanitária, foi publicada uma nova Instrução Normativa em substituição à IN 233/1998, a IN 09/2006 (Brasil, 2006), que definia as cultivares de videira e seus respectivos graus de

suscetibilidade a *X. campestris* pv. *viticola*, sendo classificada a cultivar Red Globe com alto grau de suscetibilidade, as cultivares Thompson, Benitaka, Festival (Sugraone), Sonaka, Itália e Rubi, com média suscetibilidade, e Niagara Rosada, Niagara Branca e Princês, com baixa suscetibilidade.

A IN 09/2006 também estabeleceu as normas para a produção de mudas, exigindo a adoção de medidas fitossanitárias, tais como inspeções periódicas das mudas e eliminação do lote quando encontrada planta com sintomas, utilização de pedilúvio, acesso restrito de pessoas estranhas ao interior do viveiro, desinfestação de equipamentos e ferramentas utilizados na produção com álcool iodado, além de laudo laboratorial das plantas matrizes com resultado negativo para *X. campestris* pv. *viticola*.

Além disso, a IN09/2006 também determinava as medidas de prevenção, controle e erradicação a serem adotadas pelos produtores. Como medidas de prevenção, foram recomendadas a desinfestação de veículos, máquinas, implementos, equipamentos e material de colheita com produtos sanitizantes indicados pela pesquisa e a interdição do trânsito de pessoas e equipamentos de áreas contaminadas para áreas sem ocorrência da doença, sem as devidas medidas profiláticas. Como medidas de controle, além das já existentes na IN 233/1998, exigiu-se que, durante o período chuvoso, deveria ser realizado o controle químico a partir do início das brotações, com produtos recomendados pela pesquisa nos talhões plantados com cultivares suscetíveis. Destacava-se, ainda, que a poda das cultivares altamente suscetíveis não deveria ser realizada no período chuvoso. As plantas com sintomas e circunvizinhas deveriam ser eliminadas e, nas áreas cujas plantas tivessem sido erradicadas, durante os 12 meses seguintes, realizar, apenas, o plantio de cultivares com médio ou baixo grau de suscetibilidade.

Estas medidas não foram eficazes para o controle e contenção da doença no Vale do São Francisco, visto que nessa época, o cancro bacteriano já havia sido disseminado para várias propriedades. A disseminação ocorreu rapidamente porque as mudas das cultivares menos suscetíveis não apresentavam sintomas e, mesmo estando infectadas, os métodos de diagnose existentes naquela época não tinham sensibilidade suficiente para detectar a bactéria em baixas concentrações. Além desses fatores, ainda ocorria o trânsito ilegal de mudas.

Com o objetivo de proporcionar a utilização segura dos restos de poda como matéria orgânica e promover o retorno dos nutrientes aos solos do semiárido nordestino, foi investigada a sobrevivência de *X. campestris* pv. *viticola* em tecidos infectados de videira, na superfície do solo e na compostagem desse material (Silva et al., 2012). Os autores verificaram que a compostagem,

utilizando restos de poda triturados em forrageira, alternados com camadas de esterco caprino, na proporção 2,5:1, e molhados constantemente por meio de microaspersão, elimina a bactéria em 10 dias.

Diante das dificuldades na adoção de medidas de controle para o cancro bacteriano da videira, novos estudos foram realizados com o objetivo de proporcionar uma alternativa econômica e eficiente para a produção de mudas. Assim, foi testada a limpeza clonal de mudas de videira infectadas por *X. campestris* pv. *viticola*, o efeito da termoterapia (38 °C/30 dias) e a ação de antibióticos na eliminação da bactéria em videiras infectadas (Silva et al., 2013). Segundo os autores, o cultivo de explantes com 3 mm possibilita a obtenção de plantas livres de *X. campestris* pv. *viticola* e com boa regeneração. No entanto, a termoterapia de mudas infectadas, associada ao cultivo *in vitro*, não eliminou o patógeno. Ainda, segundo os mesmos autores, dos antibióticos testados, tetraciclina, cefotaxima, cloranfenicol, ácido nalidíxico, eritromicina e estreptomicina, apenas o cefotaxima inibiu o aparecimento de bactérias no meio de cultura e formou plantas normais.

Ainda na tentativa de obtenção de um método eficiente para a erradicação de *X. campestris* pv. *viticola* de material propagativo de videira, por ser este o principal modo de disseminação da bactéria e pelos prejuízos causados com a implantação de um parreiral com mudas infectadas, mesmo nas áreas de ocorrência da doença, foram realizados novos experimentos com termoterapia, bactericidas e sanitizantes (Naue et al., 2014b). Os autores testaram as temperaturas de 50 °C por 30 e 40 min e 53 °C por 5 e 10 min. Foram avaliados também os bactericidas oxitetraciclina + sulfato de cobre e oxitetraciclina e os sanitizantes cloreto de dodecil dimetilamônio, hipoclorito de sódio e cloreto de benzalcônio, em diversas doses. Como resultado, nenhum dos tratamentos foi eficiente na erradicação de *X. campestris* pv. *viticola* de bacelos de videira.

Devido à necessidade de adoção de diversas medidas de controle para minimizar os prejuízos causados pelo cancro bacteriano da videira, assim como de orientar os produtores quanto aos sanitizantes eficientes contra *X. campestris* pv. *viticola*, conforme expresso na IN 09/2006, foi avaliado o período de sobrevivência da bactéria em tesouras de raleio, com lâminas de aço inoxidável, assim como a sensibilidade do patógeno aos sanitizantes cloreto de dodecil dimetilamônio, cloreto de benzalcônio, dicloroisocianureto de sódio, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, oxicleto de cálcio e dióxido de cloro, nas concentrações recomendadas pelos fabricantes (Naue et al., 2014a). Como resultado, foi verificado que *X. campestris* pv. *viticola* pode sobreviver por 24 h em tesouras de raleio e pode ser transmitida até o 24º corte após a contaminação

da tesoura. Apenas os sanitizantes hipoclorito de sódio e cloreto de dodecil dimetilamônio foram 100% eficientes na desinfestação das tesouras contaminadas e mantiveram a eficácia por 8 h, sendo simulados cortes de ramos e condições de incidência solar do parreiral, assim como temperatura e umidade relativa. Os sanitizantes cloreto de dodecil dimetilamônio, hipoclorito de sódio e cloreto de benzalcônio também podem ser utilizados no tratamento da água dos tanques de hidratação no processo de produção de mudas.

Diante da dificuldade de controle do trânsito ilegal de mudas, dos insucessos na tentativa de encontrar um método eficiente de controle da bactéria, dos novos focos da doença ocorridos nas regiões Sul e Sudeste, além da incerteza dos possíveis danos causados pela ocorrência do cancro bacteriano da videira em regiões onde a época de produção coincide com o período quente e chuvoso, uma nova instrução normativa, a IN02/2014, foi publicada (Brasil, 2014).

Nesta IN, há uma distinção entre as medidas a serem adotadas nas áreas com ocorrência da doença e as medidas para serem implementadas nas áreas sem ocorrência, independentemente se, na Unidade da Federação, a doença já tiver sido assinalada, apresentando maior rigor na indicação das medidas de controle. Para as áreas sem ocorrência do cancro bacteriano da videira, é recomendada a inspeção periódica e, no caso de laudo positivo, a completa erradicação de todas as plantas e partes de plantas do talhão ou do lote no viveiro, inclusive, as ervas daninhas, e a proibição do plantio das cultivares mais suscetíveis à bactéria no local da erradicação, durante três anos. O trânsito de material propagativo de área com ocorrência para área sem ocorrência da doença só será permitido quando as mudas forem produzidas por micropropagação e indexadas para *X. campestris* pv. *viticola*. Em se tratando de frutos para consumo *in natura*, o trânsito só será permitido se estiverem acompanhados do documento referente à Permissão de Trânsito Vegetal (PTV). Quando se tratar de material vegetal para fins de pesquisa institucional, o mesmo deverá ser acompanhado de PTV, que será emitida após a o recebimento do Termo de Compromisso assinado pelo pesquisador solicitante, que se responsabilizará pela não dispersão do patógeno e pela esterilização do material após a realização da pesquisa.

Diante do exposto, fica visível que esforços foram feitos, tanto pela pesquisa como pela Defesa Sanitária Vegetal, para evitar a disseminação do patógeno, assim como para encontrar medidas para o manejo da doença. Paralelo a estes esforços, os produtores do Vale do São Francisco aprenderam a conviver com o cancro bacteriano da videira e a produzir uvas de mesa de alta qualidade, voltadas para um mercado consumidor extremamente exigente. Algumas das medidas de controle preconizadas pela pesquisa e, ou pela Defesa Sanitária

Vegetal não foram adotadas, na prática, pelo setor produtivo, enquanto outras foram seguidas e hoje fazem parte do manejo da cultura no Vale do São Francisco.

Atualmente, na prática do campo, dentre as medidas adotadas, a principal delas é a não realização da poda em período chuvoso. De acordo com o regime de chuvas do semiárido brasileiro, os meses de maior precipitação pluviométrica são os de fevereiro e março. Nesses meses, a poda é suspensa na maioria das fazendas. Caso haja ocorrência de chuvas logo após a poda, ou quando os ramos ainda não estão lignificados ou, ainda, na floração, há a suspensão de todos os tratos culturais e é proibida a entrada de qualquer pessoa na área até que não haja mais água livre na superfície da planta. Mesmo neste momento, procura-se não realizar atividades que provoquem ferimentos na planta. Assim, se estiver na fase de amarrão, a atividade deve ser momentaneamente suspensa. Se precisar fazer o raleio dos cachos, é importante esperar um pouco, visto que, se houver infecção durante a floração ou início da frutificação, poderá ocorrer alto índice de abortamento. No período da desfolha, algumas fazendas adotam a prática de retirar o limbo das folhas e deixar o pecíolo, pois mesmo que haja a penetração da bactéria nesse segmento, este secará e se desprenderá da planta em curto espaço de tempo.

Como o ciclo da cultura é muito rápido, principalmente nas condições de cultivo do Vale do São Francisco, diariamente são realizadas atividades nos parreirais e, muitas dessas atividades não podem ser adiadas por muito tempo, como, por exemplo, a aplicação do ácido giberélico, utilizado para provocar o aumento do tamanho de bagas de uvas sem sementes, resultante de sua ação tanto no aumento da divisão e da expansão celular, como no alongamento da ráquis dos cachos e no raleio de flores (Leão, 2004). Devido à interferência do ácido giberélico na formação de tecidos jovens, também ocorre o adiamento nas aplicações do produto nos períodos mais favoráveis à ocorrência do cancro bacteriano.

Apesar de não haver nenhum ingrediente ativo com registro para o controle de *X. campestris* pv. *viticola* (Agrofit, 2016), há um intensivo uso de produtos à base de cobre, seja fungicida ou cobre quelatizado, por parte dos viticultores do Vale do São Francisco. Um dos produtos mais utilizados na região é a “calda louca”, que consiste na mistura da calda feita com o fungicida mancozebe e outra, com um cúprico (oxicloreto de cobre ou hidróxido de cobre), misturadas e deixadas em descanso por 8 a 12 horas antes da aplicação. Apesar dos produtores assegurarem a eficiência dessa mistura, as aplicações só devem ser realizadas até o florescimento ou início da frutificação, sob risco de fitotoxidez ou permanência

de resíduo na fruta. Outra opção de controle químico para o cancro bacteriano, utilizado em todas as fases fenológicas da planta, é a mistura de fosfito com cobre. Salienta-se que, nos períodos críticos, de maior utilização do cobre, os aminoácidos e alguns produtos de pH mais baixo, utilizados na cultura da videira, têm sua aplicação reduzida ou eliminada para evitar problemas com fitotoxidez.

Ressalta-se aqui, o risco do uso indiscriminado de cúpricos na seleção de isolados tolerantes ao cobre. Esta situação já foi verificada com isolados de *X. campestris* pv. *viticola* coletados entre os anos de 1998 e 2006 no Vale do São Francisco (Marques et al., 2009).

Outros cuidados também são tomados nos períodos de chuva, como a redução da irrigação, da densidade de brotos por planta, para favorecer o arejamento da cultura, da adubação nitrogenada, assim como a retirada das ervas daninhas para evitar a formação de microclima propício à ocorrência da doença, além da manutenção do equilíbrio nutricional da planta.

Para a produção de mudas, os viveiristas tentam reduzir, ao máximo, o tempo das mudas no viveiro, fazem aplicações sistemáticas de cobre que, inclusive, interfere no crescimento inicial da planta. Em alguns casos, dão preferência para a enxertia de campo, com plantio do porta-enxerto nos meses de junho até novembro e enxertia da cultivar copa a partir de maio, quando diminuem os riscos de ocorrência de chuvas. A qualidade da muda é de extrema importância, pois, em caso de infecção bacteriana na planta jovem, haverá o comprometimento da formação da planta adulta e, conseqüentemente, da produção.

5. Bibliografia

- AGROFIT. **Sistema de produtos agrotóxicos e fitossanitários**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento/ Secretaria de Defesa Agropecuária, 2016. Disponível em: < http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 25 abr. 2016.
- ARAÚJO, J. S. P. **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**. 2001. 125f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/, Seropédica.
- ARAÚJO, J. S. P.; BUENO, J. R. F.; CRUZ, G. B.; OLIVEIRA, B. C.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D.; POLIDORO, J. C. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 305-309, 2005.
- ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. F.; MACIEL, G. F. Novos hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 83, 1999.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 9, de 20 de abril de 2006. **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil**, p. 1, 26 abr. 2006. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 233, de 7 de dezembro de 1998. **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil**, p. 89, 30 dez. 1998. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 2, de 6 de fevereiro de 2014. **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil**, p. 9, 7 fev. 2014. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 59, de 18 de dezembro de 2013. **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil**, p. 91, 19 dez. 2013. Seção 1.
- FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, A. D. S. **Ocorrência do cancro bacteriano da videira no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 2 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 62).
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K.L. Bacterial canker of grapevine in Roraima, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 604, 2006.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; VAZ, C. F.; SANTOS, E. C.; JUNQUEIRA, L. P.; SOUZA, L. S.; LIMA, C. A. Ocorrência do cancro bacteriano da videira na região do entorno do Distrito Federal. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2006, Cabo Frio - RJ. Frutas do Brasil: Saúde para o mundo. **Palestras e Resumos ...** Cabo Frio: SBF/UENF/UFRRJ. 2006. p. 323.
- LEÃO, P. C. S. Manejo de cachos e reguladores de crescimento. In: LEÃO, P. C. S.; SOARES, J. M. (Eds.). **Cultivo da videira**. 2. ed. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. (Embrapa Semiárido. Sistema de Produção, 1). Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/manejo_cachos.html>. Acesso em: 25 abr. 2016.
- LIMA, M. F. **Cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***: epidemiologia e manejo. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2000. 22 p. (Embrapa Semiárido. Circular técnica, 54).
- LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. Doenças causadas por bactérias. In: LIMA, M. F.; MOREIRA, F. R. B. (Orgs.). **Uva de mesa** - fitossanidade. 2ed. Brasília: Embrapa, 2012. p. 33-42.
- LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V.; MOREIRA, A. W.; DIANESE, J. C. Bacterial canker of grapevine in Brazil caused by *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 440-443, 1999.
- MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. A.; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E. J. P.; NOGUEIRA, E. M. C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 25, p. 262-264, 1999a.
- MALAVOLTA JUNIOR, 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 videiras no Estado do Piauí. **Summa Phytopathologica**, v. 25, suplemento, p.27, 1999b.
- MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; SUGIMORI, M. H.; ALMEIDA, I. M. G.; RIBEIRO, I. J. A. Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 373-376, 2003.
- MARQUES, E.; UESUGI, C. H.; FERREIRA, M. A. S. V. Sensitivity to copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 406-411, 2009.

- NASCIMENTO, A. R. P.; GOMES, A. M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Elaboração e validação de escala diagramática para cancro bacteriano da videira. **Summa Phytopathologica**, v. 31, p. 56-61, 2005a.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; GAMA, M. A. S. Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 650-654, 2005b.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MASHIMA, C. H.; LIMA, M. F. **Cancro bacteriano: nova doença da videira no submédio São Francisco**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2000. 22 p. (Embrapa Semiárido. Circular Técnica, 58).
- NASCIMENTO, A. R. P.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Reação de clones de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, baseada nos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1-7, 2006.
- NAUE, C. R.; BARBOSA, M. A. G.; BATISTA, D. C.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Efeito do tratamento de bacelos de videira 'Red Globe' no controle do cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, p. 853-865, 2014a.
- NAUE, C. R.; COSTA, V. S. O.; BARBOSA, M. A. G.; BATISTA, D. C.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* on grapevine cutting tools and water: survival and disinfection. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, p.451-458, 2014b.
- NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grapevine. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 73, p. 183-186, 1972.
- PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; MOREIRA, J. O. T.; VIANA, I. O. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 161-164, 2007.
- PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1317-1320, 2006.
- RODRIGUES NETO, J.; DESTÉFANO, S. A. L.; RODRIGUES, M. R. L.; PELLOSO, D. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, L. C. Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 42-44, 2011.
- SANTOS, M. M. S.; PEIXOTO, A. R.; PESSOA, E. S.; GAMA, M. A.; MARIANO, R. L. R.; BARBOSA, M. A. G.; PAZ, C. D. Identificação de potenciais plantas hospedeiras alternativas de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, v. 44, p. 595-598, 2014.
- SILVA, A. M. F.; MENEZES, E. F.; SOUZA, E. B.; MELO, N. F.; MARIANO, R. L. R. Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 757-765, 2012.
- SILVA, A.M.F.; MELO, N.F.; SOUZA, E.B.; COELHO, A.K.; MARIANO, R.L.R. Limpeza clonal de mudas de videira infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 316-319, 2013.
- TOMAZ, R.; SCREMIN, R. M.; FERREIRA, M. A. S. V.; BARBOSA, M. A. G. Detecção e erradicação de videiras com sintomas do cancro bacteriano no Estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, Suplemento, p. 131, 2011.
- TOSTES, G. O.; ARAUJO, J. S. P.; FARIAS, A. R. G.; FRADE, D. A. R.; OLIVARES, F. L. Detection and cellular localization of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in seeds of commercial 'Red Globe' grapes. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 134-140, 2014.
- TRINDADE, L. C.; MARQUES, E.; LOPES, D. B.; FERREIRA, M. A. S. V. Development of a molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, p. 16-23, 2007.

ZUCAL, M.P.M. **Reação de genótipos de videira quanto a resistência ao cancro bacteriano.**
2014. 56f. Dissertação (Mestrado em Horticultura Irrigada) – Universidade do Estado da Bahia,
Juazeiro.

Diversidade e Variabilidade de *Ralstonia* spp.

Thaís Ribeiro Santiago

Carlos Alberto Lopes

Eduardo Seiti Gomide Mizubuti

1. Introdução

A murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. é uma das doenças mais destrutivas, para muitas culturas importantes nos trópicos. A bactéria foi primeiramente observada no Japão causando murcha em plantas de tabaco, cerca de 200 anos antes da sua descrição em 1896 (Kelman, 1953). O patógeno foi descrito como *Bacillus solanacearum* Smith sendo posteriormente classificado como *Bacterium solanacearum* Chester, *Pseudomonas solanacearum* Smith, *Phythomonas solanacearum* (Smith) Bergey et al., *Burkholderia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. e *R. solanacearum*. Recentemente, Safni et al. (2014) sugeriram a revisão taxonômica de *R. solanacearum* em três espécies: *R. solanacearum* (filotipo II), *R. pseudosolanacearum* sp. nov. (filotipo I e III) e *R. syzygii* com três subespécies: *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov. (isolados do filotipo IV causadores da murcha bacteriana), *R. syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov. (*R. syzygii* associado a doença de Sumatra do cravo na Indonésia) e *R. syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. (Blood Disease Bacteria) (Tabela 1). Baseado nas análises de genômicas comparativa, hibridização genômica comparativa, proteômica e características metabólicas, Remenant et al. (2010) e Prior et al. (2016) também suportam a divisão do complexo em três espécies. Remenant et al. (2010) propôs a criação das espécies *R. solanacearum*, *Ralstonia sequeirae* e *Ralstonia haywardii* e três subespécies (*R. haywardii* subsp. *celebesensis*, *R. haywardii* subsp. *solanacearum* e *R. haywardii* subsp. *syzygii*) ao concluírem que o complexo era polifilético.

No Brasil, *R. solanacearum* foi detectada pela primeira vez em plantas de tabaco, no estado do Rio Grande do Sul, por Von Parseval em 1922 (Takatsu & Lopes, 1997). Hoje, sabe-se que as espécies de *Ralstonia* spp. que ocorrem no Brasil são *R. solanacearum* (filotipo I) e *R. pseudosolanacearum* (filotipo II). Esse complexo tem como característica a capacidade de penetração nas raízes das plantas por ferimentos ou tecidos emergentes e colonização do sistema vascular (VASSE et al., 1995). Sob condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento da doença, geralmente se constata inicialmente, a perda de turgescência das folhas superiores. Transcorrido pouco tempo, toda a planta apresenta murcha generalizada (Akiew & Trevorrow, 1994). O inóculo pode ser disperso por solo, água de rios, mudas infectadas, insetos, ferramentas contaminadas durante o trato cultural, irrigação e tubérculos (Hayward, 1991). Diferentes espécies de plantas são relatadas como hospedeiras dessa bactéria. Há na literatura relatos de plantas pertencentes a mais de 54 famílias botânicas listadas como hospedeiras (Hayward, 1994; Wicker et al., 2007). Dentre as culturas de maior importância econômica afetadas por essa bactéria estão as espécies de Solanaceae, como batata e tomate.

Apesar dos esforços para controle da doença, as epidemias da murcha bacteriana continuam limitando a produtividade de várias culturas em diversas regiões do Brasil. Acredita-se que a falta de conhecimento da variabilidade, ecologia e dos principais mecanismos evolutivos que afetam as populações do patógeno dificultam a seleção efetiva de cultivares com resistência duradoura. Diversas cultivares resistentes foram desenvolvidas para diferentes hospedeiros, porém, comumente constata-se variações na resposta de resistência. Algumas variedades são eficientes em uma região e bastante afetadas pela murcha, quando cultivadas em outras áreas (Lopes, 1994).

Juntamente com a região compreendida entre a Indonésia e Austrália, o Brasil é um dos prováveis centros de origem do complexo de espécies *R. solanacearum* (Wicker et al., 2012). Por essa razão, o estudo das variações genéticas com as populações que aqui ocorrem são de grande interesse mundial para entender melhor como o patógeno evolui. Neste capítulo pretende-se apresentar o estado da arte das variações genéticas de *Ralstonia* spp. no Brasil. Nesse contexto, serão enfatizados: (i) a caracterização de isolados de *Ralstonia* spp. por biovar, filotipo, sequevar; (ii) os estudos da estruturação genética da população do patógeno, por região e hospedeiro e (iii) a investigação para determinar a contribuição dos mecanismos evolutivos que moldam a variabilidade genética da população brasileira de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum*.

Tabela 1. Diversidade genética, geográfica e ecótipos dentro de *Ralstonia* spp.(Adaptado de Genin & Denny, 2012).

Filotipo	Origem	Clado	Informação dos ecótipos	Espécie
I	Ásia	1	Murcha bacteriana em <i>Solanaceae</i> , gengibre e amora	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>
IIA	América	2	Murcha bacteriana em <i>Solanaceae</i> e banana	<i>Ralstonia solanacearum</i>
		3	Murcha bacteriana em <i>Solanaceae</i> (Sudeste dos Estados Unidos e Caribe)	
IIB	América	4	Moko da bananeira e novos variantes NPB	<i>Ralstonia solanacearum</i>
		5	Murcha bacteriana em batata, tomate e gerânio, Moko da bananeira	
III	África	6	Murcha bacteriana em <i>Solanaceae</i>	<i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>
IV	Indonésia	7	Blood Disease Bacteria	<i>Ralstonia syzygii</i> subsp. <i>celebesensis</i>
			Murcha bacteriana em <i>Solanaceae</i>	<i>Ralstonia syzygii</i> subsp. <i>indonesiensis</i>
		8	<i>Ralstonia syzygii</i> , Doença do Sumatra de cravo	<i>Ralstonia syzygii</i> subsp. <i>syzygii</i>

2. Caracterização fenotípica de isolados brasileiros de *Ralstonia* spp.

Por muito tempo *R. solanacearum* foi considerada como um complexo de espécies devido sua ampla variação na gama de hospedeiros, propriedades fisiológicas e genéticas (Denny, 2006). A primeira tentativa de se estudar a variabilidade dos isolados pertencentes a esse gênero foi por meio de raças e biovars (Hayward et al., 1994; He et al., 1983). A classificação de raça está relacionada à capacidade de infectar diferentes hospedeiros. Cinco raças de *Ralstonia* spp. são reconhecidas atualmente (Buddenhagen et al., 1962). No Brasil, as raças 1, 2 e 3 foram encontradas associadas a diferentes hospedeiros e estão distribuídas por todo o país. A raça 1 é patogênica a um grande número de plantas, incluindo tomate, fumo, batata e outras solanáceas. A raça 2 ataca banana e similares e a raça 3 é considerada patogênica principalmente a batata e gerânio. Isolados das raças 4 e 5, patogênicas a gengibre e amora, respectivamente, não foram relatados no país (Hayward, 1991; Hayward, 1994).

Outra caracterização fenotípica muito utilizada é a biovar. Definiram-se as biovars como grupos fisiológicos que diferem quanto à capacidade de utilizar diferentes fontes de açúcares (lactose, maltose e celobiose) e álcoois (manitol, dulcitol e sorbitol). Atualmente, as biovars 1, 2A, 2T, 3, 4 e 5 são relatados na literatura (Hayward, 1994). Apenas as biovars 1, 2A, 2T e 3 foram encontrados no Brasil. Embora a classificação por raça seja mais interessante para fins agrônômicos práticos, a caracterização por biovar é a mais aceita pela maior reprodutibilidade dos ensaios em laboratório.

No Brasil, a classificação por biovar revelou um viés na distribuição geográfica e por hospedeiro. Verificou-se predominância da biovar 1 (raças 1, 2), seguida pelas biovars 2 (raça 3) e 3 (raças 1, 2). A biovar 1 ocorre em todas as regiões do Brasil e está associada principalmente a tomate, pimentão, pimenta longa e eucalipto, diferentemente do que acontece com a biovar 2, a qual é encontrada comumente na região Sul, associada principalmente a batata e berinjela. Comparados aos isolados das biovars 1 e 3, os isolados da biovar 2 apresentam menor capacidade de sobrevivência no solo (Coelho Netto et al., 2004). A biovar 2T tem maior versatilidade metabólica comparada com a biovar 2A e é encontrada principalmente em regiões tropicais de baixa altitude, enquanto a biovar 2A em regiões temperadas e de altas altitudes.

Isolados classificados como biovar 3 ocorrem em alta frequência nas regiões Norte e Nordeste do país. Entretanto, isolados da biovar 3 já foram detectados na região central. Até o momento, não há relato de ocorrência de isolados da biovar 3 nas regiões Sul e Sudeste (Santiago et al., 2012). De acordo com a classificação atual, a biovar 3 corresponde à espécie *R. pseudosolanacearum*, filotipo I.

3. Caracterização genética de *Ralstonia* spp. no Brasil

Métodos baseados em análises de fragmentos repetidos do genoma, sequências parciais de genes e, atualmente, o genoma completo do organismo permitem analisar detalhadamente diferentes componentes da história evolutiva de *Ralstonia* spp., assim como inferir as implicações de certos processos para o manejo da murcha bacteriana (Fegan & Prior, 2005). Baseado na análise da sequência dos genes *hrpB* (fator de patogenicidade), da região do ITS (internal transcribed spacer) localizado entre a região ribossomal 16S e 23S, endoglucanase [(*egl*) fator de virulência] e *mutS* (responsável pelo reparo do DNA), quatro grupos distintos denominados "filotipos" foram identificados para o complexo de espécies *R. solanacearum* (I, II, III e IV). Esses filotipos estão

correlacionados com a origem geográfica dos isolados: filotipo I, inclui isolados originados principalmente da Ásia; filotipo II, das Américas; filotipo III, da África; e filotipo IV, da Indonésia (Fegan & Prior, 2005). Recentemente, verificou-se que o filotipo II pode ser subdividido nos subgrupos IIA e IIB (Fegan & Prior, 2006).

Além da relação de origem geográfica, dentro dos filotipos é possível identificar sequevares e clados. As sequevares são determinadas por agrupamento de isolados que apresentam variações abaixo ou igual a 1% dentro da sequência do gene *egl* (Poussier et al., 2000; Wicker et al., 2007). Já os clados estão associados à especificidade a determinado hospedeiro ou condição climática (Wicker et al., 2012). O filotipo I contém o clado 1; filotipo IIA é constituído dos clados 2 e 3; filotipo IIB é dividido entre os clados 4 e 5 e contém isolados patogênicos a banana, batata e tomate quando estas olerícolas são cultivadas em regiões frias; no filotipo III os isolados estão agrupados no clado 6; e finalmente, o filotipo IV contém os clados 7 e 8 (Tabela 1).

Atualmente, o sistema de classificação por meio de filotipo e sequevar é o mais aceito pela comunidade científica para refletir a diversidade deste complexo de espécie (Prior & Fegan, 2005). Estudos de caracterização de isolados de *R. solanacearum* por filotipo, sequevar e clados, bem como sua distribuição geográfica são escassos. Atualmente, há informação acerca da variabilidade genética de isolados que afetam certos hospedeiros e em regiões específicas do Brasil (Costa et al., 2007; Garcia et al., 2013; Pinheiro et al., 2012; Rodrigues et al., 2012; Santana et al., 2012). Por exemplo, 37 isolados de *R. solanacearum* do filotipo II, obtidos de banana e helicônia nos estados do Amazonas, Pará, Sergipe e Pernambuco, foram caracterizados filogeneticamente usando os genes *egl* e *mutS* (Albuquerque et al., 2014). Seis sequevares foram caracterizados (IIA-6, IIA-24, IIA-41, IIB-3, IIB-4 e IIB-25) e uma nova sequevar foi descrita (IIA-53). Em outro estudo hospedeiro-específico, 19 isolados de eucalipto foram analisados. Dezoito agruparam no subgrupo IIA e um isolado no subgrupo IIB. As análises filogenéticas do gene *egl* confirmaram a classificação dos filotipos e permitiram identificar as sequevares IIA-37 e IIA-41 (Fonseca et al., 2014).

Nos trabalhos realizados anteriormente o número de isolados caracterizados e os marcadores moleculares empregados limitaram o escopo de inferência para algumas análises importantes. Um conjunto de 41 isolados obtidos de diferentes espécies de plantas (eucalipto, banana, helicônia, tabaco, tomate, jiló, berinjala, batata e plantas ornamentais) distribuídas em todas as regiões do Brasil foi caracterizado quanto à raça, biovar, filotipo e sequevar. Três diferentes raças, cinco biovars e a predominância do filotipo II e 11 sequevares (1, 4, 18, 24, 25,

26, 27, 31, 35 e 36) foram descritos (Rodrigues et al., 2012). Santana et al. (2012) caracterizaram 53 isolados de *R. solanacearum* da biovar 2 (2A e 2T) obtidos de plantas de batata, em sete estados. À exceção de um isolado, os demais foram classificados como pertencentes ao filotipo IIB. A caracterização por sequevar não foi realizada. No entanto, recentemente, Santiago et al. (2012) caracterizaram 301 isolados de diferentes estados e hospedeiros no Brasil. Para cada isolado determinou-se biovar, filotipo, sequevar e clado. Baseado nos genes *egl* e *mutS*, o filotipo I, IIA e IIB, oito sequevares (IIB-1, IIB-4, IIA-7, I-18, IIB-27, IIB-28, IIA-41 e IIA-50) e quatro novos sequevares foram reportados (IIB-54, IIB-55, IIB-56 e IIB-57). Isolados do sequevares 54 e 56 foram obtidos de diferentes hospedeiros como: batata, tomate, pimentão, gerânio, pimenta longa e eucalipto. O sequevar 55 foi caracterizado em isolados coletados em plantas murchas de tomate encontradas principalmente na região Sudeste e sequevar 57 em plantas de batata coletadas na região central, Sudeste e Nordeste. Além disso, utilizando Moko multiplex-PCR, quatro isolados de pimenta longa foram reportados como sendo do ecótipo emergente 4/NPB.

Constatou-se predominância e associação de filotipo e sequevar por região geográfica e hospedeiro. O filotipo I foi encontrado nas regiões Norte e Nordeste. O filotipo IIA está distribuído em todas as regiões infectando diferentes hospedeiros, principalmente, plantas de tomate cultivadas em campos de baixa altitude. Isolados do filotipo IIB apresentam alta variabilidade e infectam plantas de tomate e batata em áreas mais altas. Com relação à sequevar, à exceção de IIA-41, IIA-50, IIB-54 e IIB-56 que estão amplamente distribuídas no país, à distribuição das demais sequevares está associada à região (Santiago et al., 2012). O mesmo padrão de distribuição de sequevar por região foi observado em eucalipto por Fonseca et al. (2014).

No geral, existe evidência de alta variabilidade na população de *Ralstonia* spp. no Brasil reforçando que o país é um dos centros de origem do patógeno, sendo observado um total de dois filotipos e 22 sequevares, de um total de 4 e 57, atualmente descritos no mundo, respectivamente.

4. Características genéticas, bioquímicas e patológica da população de *R. solanacearum* e *R. pseudosolanacearum* no Brasil

As informações sobre a variabilidade e estrutura da população podem ser obtidas pela amostragem em diferentes regiões e amostras ao longo do ano ou

dos anos. É importante conhecer as características biológicas, tais como o modo de transmissão, eficiência em infectar diferentes hospedeiros, identificação correta das espécies e variabilidade. No caso da murcha bacteriana, as primeiras inferências sobre a população foram feitas a partir de suas características biológicas (eficiência de infectar diferentes hospedeiros, transmissão e agrupamentos fisiológicos). Por exemplo, a doença conhecida como Moko da bananeira causada por *R. solanacearum* ecotipo Moko tem como característica a capacidade de infectar naturalmente apenas bananas triplóides e helicônias. Esse ecotipo está restrito a alguns estados da região Norte e Nordeste como Amazônia, Amapá, Rondônia, Pará, Roraima e Sergipe (MAPA, 2007). Entre 1997 e 1999, um estudo da população de *R. solanacearum* infectando batata demonstrou que 94% dos isolados foram classificados como raça 3/biovar 2 (R3B2) e 6% como raça 1/biovar 1 (R1B1) (Maciel et al., 2001). No entanto, quando o estudo foi realizado em uma área mais quente e isolados foram obtidos de tomate, tabaco e berinjela, observou-se a predominância de R1B1. Embora ambos biovares ocorram numa região, o clima influencia a prevalência de um ou outro variante.

O sistema binário (raça e biovar) de classificação é útil para avaliar as diferenças geográficas e patológicas dentro da espécie, mas não possui resolução suficiente para diferenciar e caracterizar completamente os isolados (Hayward, 1994). Por isso, é importante investigar a variabilidade genética entre os isolados usando outras técnicas. Com o desenvolvimento da biologia molecular, a abordagem utilizada para identificar e caracterizar indivíduos de uma população de bactérias ganhou resolução e poder de discernimento (Schaadet al., 2003). Atualmente, a variabilidade genética pode ser determinada usando marcadores baseados em sequências repetidas como BOX, ERIC e REP-PCR, amplificação via PCR de fragmentos de DNA (AFLP), polimorfismo baseado no tamanho do fragmento de restrição (RFLP) e composição nucleotídica de vários locos (multilocus sequence type - MLST).

Apesar da importância do Brasil como o centro de origem do organismo, até agora poucos estudos foram realizados para a caracterização genética da população brasileira de *R. solanacearum*. Em um primeiro estudo da variabilidade de *R. solanacearum* no Brasil, Silveira et al. (2005) avaliaram a variabilidade genética de 51 isolados de *R. solanacearum* oriundos de 25 campos de batata, em dez municípios do Rio Grande do Sul. Análise bioquímica detectou a presença das biovares 1 e 2, predominando a biovar 2, e quando submetidos a estudos de variabilidade genética por ERIC e BOX, também foi possível observar agrupamentos diferenciando as biovares 1 e 2. Constatou-se alta

variabilidade entre isolados da biovar 1 e baixa variabilidade entre isolados da biovar 2. Com o uso de marcadores RAPD, além de agrupar os isolados por biovar, foi possível observar um perfil característico de estruturação dos isolados por região. O fato de a população apresentar estruturação genética, explica, ao menos em parte, a variação de resposta de cultivares (i.e. cultivares são resistentes em uma região, mas suscetíveis em outra).

Em contraste com a região Sul, 70 isolados de tomate, pimentão e chicória, em área de terra firme e várzea na região amazônica, foram caracterizados quanto a biovar e molecularmente por BOX-PCR. Observou-se a presença das biovars 1, 2 e 3, com predominância da biovar 1, elevado polimorfismo e nenhuma correlação de agrupamento por biovar ou região geográfica (Costa et al., 2007). Essa grande variabilidade encontrada nos isolados da Amazônia dão indícios que a região é o centro de origem ou de variabilidade de *R. solanacearum* (filotipo II).

Além de fatores como solo e clima, o hospedeiro também influencia o padrão da população. Dezenove isolados de eucalipto coletados em sete estados (Bahia, Maranhão, Minas Gerais, Espírito Santo, Pará, Amapá e Santa Catarina) foram caracterizados usando a técnica de ERIC-PCR. Houve alta correlação da variabilidade e a origem geográfica dos isolados (Fonseca et al., 2014). No entanto, à exceção dos estudos de variabilidade de isolados de batata e eucalipto, a maioria dos estudos de variabilidade não revela correlação com raça, biovar, hospedeiro ou origem geográfica no Brasil (Garcia et al., 2013; Pinheiro et al., 2011; Rodrigues et al., 2012; Viana et al., 2012). Esses resultados enfatizam a grande variabilidade dos isolados do Brasil e a possível influência do transporte do patógeno em mudas e tubérculos contaminados na estruturação da população. Com isso, são necessários estudos mais amplos e detalhados para entendimento da população.

Santiago et al. (2012) realizaram um estudo sobre a estrutura da população brasileira com um maior número de análises e isolados coletados em todo país, principalmente de plantas murchas de batata e tomate. Usando BOX-PCR foram observados três agrupamentos: um composto exclusivamente de isolados de *R. pseudosolanacearum*; o segundo composto por isolados de *R. solanacearum* coletados predominantemente na região Centro-Sul do país e; um terceiro, formado de isolados da mesma espécie, porém originados da região Norte. Além disso, o estudo constatou que a população de *R. solanacearum* (filotipo II) apresenta alta variabilidade genética e está fracamente estruturada. Acredita-se que a fraca estruturação é devido ao transporte de isolados entre regiões, mediado pelo homem, tubérculos e rios. Em contraste, *R.*

pseudosolanacearum apresentou uma menor variabilidade gênica e genotípica indicando que a espécie foi recentemente introduzida no país.

5. Parametrização dos mecanismos evolutivos que afetam a população no Brasil

Além da estruturação da população, programas de melhoramento bem sucedidos exigem conhecimento da evolução do patógeno e os mecanismos que influenciam a variabilidade (Mcdonald, 2014). A compreensão dos mecanismos evolutivos pode dar indícios da adaptação do organismo (Stukenbrock & Mcdonald, 2008).

Ralstonia spp. é uma bactéria capaz de se adaptar a diferentes ambientes e hospedeiros. Além disso, o patógeno consegue suplantar resistência e adapta-se a novos hospedeiros com facilidade (Peeters et al., 2013). O conhecimento dos principais mecanismos evolutivos que atuam sobre o patógeno e a estrutura populacional pode ser obtido pelo estudo dos genes denominados *housekeeping*, os quais são essenciais, cópia única e menos sujeitos a transferência horizontal. Os genes *housekeeping* estudados em *Ralstonia* spp. são: *gdkA*, *mutS*, *ppsA*, *adK*, *leuS*, *rplB* e *gyrB* (Wicker et al., 2012). Dentre os mecanismos evolutivos que afetam a população estão: mutação, recombinação, deriva, seleção e migração.

Recentemente, a divergência dos isolados de *R. solanacearum* em filotipo despertou a atenção dos pesquisadores para determinar os mecanismos evolutivos responsáveis pela adaptação e separação da espécie. O primeiro estudo para caracterizar os mecanismos evolutivos do complexo de espécies *R. solanacearum* foi realizado utilizando MLSA (análise de sequências multilocus) e houve evidência de uma população clonal (Castillo & Greenberg, 2007). No entanto, o número de amostras foi limitado, uma vez que a maioria dos isolados pertencia ao filotipo IIB, associado à batata. Posteriormente, Wicker et al. (2012) analisando 89 isolados detectaram os quatro filotipos (I, IIA, IIB, III, IV). A adaptação a um hospedeiro específico ou a intensificação da plantação em uma área pode ter promovido à formação dos clados. Dos mecanismos evolutivos, recombinação e migração a longa distância parece ter desempenhado um importante papel na evolução da população mundial. Filotipo IIA e IIB apresentam características evolutivas contrastantes. Enquanto o filotipo IIB é praticamente clonal, o filotipo IIA apresenta maior variabilidade e está em expansão. No entanto, os mecanismos responsáveis pela divisão do filotipo II em IIA e IIB continuavam sem serem resolvidos. Além disso, não havia nenhuma

informação detalhada sobre os mecanismos evolutivos e processos ecológicos que afetavam a população brasileira de *R. solanacearum*.

Um estudo realizado por Santiago et al. (2014) voltado para a parametrização de mecanismos evolutivos foi conduzido empregando a abordagem de simulação de genealogia de genes e o processo de coalescência das linhagens de *Ralstonia* spp. presentes no Brasil (I, IIA e IIB). Neste estudo, os autores identificaram que os principais mecanismos que afetam a população brasileira desta fitobactéria são mutação, recombinação, seleção e migração, e que a mutação é mais importante no processo de evolução desta população do que a recombinação. Fatores ecológicos foram os responsáveis pela divisão do filotipo II, possivelmente hospedeiro e/ou clima. Aparentemente, a população do filotipo IIA (em expansão) originou-se primeiramente, seguida do filotipo IIB. Com relação à espécie *R. pseudosolanacearum*, foi possível identificar uma recente introdução no país (Santiago et al., 2014). Baseado nessas informações é possível antecipar que o desenvolvimento de variedades resistentes a *R. solanacearum* é um desafio para todos os hospedeiros, uma vez que, a população é recombinante e tem alta taxa de mutação, o que contribui para que a resistência da planta seja facilmente suplantada.

6. Bibliografia

- AKIEW, E. B.; TREVORROW, P. R. Management of bacterial wilt of tobacco. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB International, 1994. p. 179-198.
- ALBUQUERQUE, G. M. R.; SANTOS, L. A.; FÉLIX, K. C. S.; ROLLEMBERG, C. L.; SILVA, A. M.; SOUZA, E. B.; CELLIER, G.; PRIOR, P.; MARIANO, R. L. R. Moko disease-causing strains of *Ralstoniasolanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. **Phytopathology**, v. 104, p. 1175-1182, 2014.
- BUDDENHAGEN, I. W.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. Designations of races of *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 52, p. 726, 1962.
- CASTILLO, J. A.; GREENBERG, J. T. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.1225-1238, 2007.
- COELHO NETTO, R. A.; PEREIRA, B. G.; NODA, H.; BOHER, B. Murcha bacteriana no Estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 21-27, 2004.
- COSTA, S. B.; FERREIRA, M. A. S. V.; LOPES, C. A. S. Diversidade patogênica e molecular de *Ralstonia solanacearum* da região amazônica brasileira. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 285-294, 2007.
- DENNY, T. P. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: GNANAMANICKAN, S. S. (Ed.). **Plant-associated nacteria**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 573-644.
- FEGAN, M.; PRIOR, P. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, p. 93-101, 2006.
- FEGAN, M.; PRIOR, P. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". In:

- ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt**: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St. Paul: APS Press, 2005. p. 449-461.
- FONSECA, N. R.; GUIMARÃES, L. M. S.; HERMENEGILDO, P. S.; TEIXEIRA, R. U.; LOPES, C. A.; ALFENAS, A. C. Molecular characterization of *Ralstonia solanacearum* infecting *Eucalyptus* spp. in Brazil. **Forest Pathology**, v. 44, p. 107-116, 2014.
- GARCIA, A. L.; LIMA, W. G.; SOUZA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt in bell pepper in the state of Pernambuco, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, p. 237-245, 2013.
- GENIN, S.; DENNY, T. P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Annual Review of Phytopathology**, v. 50, p. 67-89, 2012.
- HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 65-87, 1991.
- HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Ed.). **Bacterial wilt**: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford: CAB International, 1994. p. 9-24.
- HE, L. Y.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. 1983. Characteristic of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. **Plant Disease**, v. 67, p. 1357-1361, 1983.
- KELMAN, A. **The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum***: a literature review and bibliography. Raleigh: North Carolina Agricultural Experiment Station, 1953. 194 P. (NCSU.Technical Bulletin, 99).
- LOPES, C. A. Situação da murcha bacteriana no Brasil. In: **TALLER SOBRE ENFERMEDEADES BACTERIANAS DE LA PAPA**. Brasília: Embrapa Hortaliças/CIP, 1994. p. 13-16.
- MACIEL, J. L. N.; SILVEIRA, J. R. P.; VAN DER SAND, S. T.; DUARTE, V. Frequência de biovars de *Ralstonia solanacearum* em diferentes cultivares e épocas de cultivo de batata no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 741-744, 2001.
- MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Instrução Normativa No. 52 de 20/11/2007**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18212>. Acesso em: 04 de maio de 2016.
- MCDONALD, B. A. Using diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. **Tropical Plant Pathology**, v.39, p.191-196, 2014.
- PEETERS, N.; GUIDOT, A.; VAILLEAU, F.; VALLS M. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, p.651-662, 2013.
- PINHEIRO, C. R.; AMORIM, J. A. E.; DINIZ, L. E. C.; SILVA, A. M. F.; TALAMINI, V.; SOUZA JÚNIOR, M. T. Diversidade genética de isolados de *Ralstonia solanacearum* e caracterização molecular quanto afitotipos e sequevars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p.593-602, 2011.
- POUSSIER, S.; LUISETTI, J. Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissue by nested PCR. **European Journal of Plant Pathology**, v. 106, p. 255-265, 2000.
- PRIOR, P.; AILLOUD, F.; DALSING, B. L.; REMENANT, B.; SANCHEZ, B.; ALLEN, C. Genomic and proteomic evidence support the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BioMed Central Genomics**, v.17, p. 1-11, 2016.
- REMENANT, B.; BÉNÉDICTE, C-G.; GUIDOT, A.; CELLIER, G.; WICKER, E.; ALLEN, C.; FEGAN, M.; PRUVOST, O.; ELBAZ, M.; CALTEAU, A.; SALVIGNOL, G.; MORNICO, D.; MANGENOT, S.; BARBE V.; MÉDIGUE, C.; PRIOR, P. Genomes of three tomato pathogens

- within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. **BioMed Central Genomics**, v. 10, p. 1-16, 2010.
- RODRIGUES, L. M. R.; DESTÉFANO, S. A. L.; SILVA, M. J.; COSTA, G. G. L.; MARINGONI, A. C. Characterization of *Ralstonia solanacearum* from Brazil using molecular methods and pathogenicity tests. **Journal Plant Pathology**, v. 94, p. 505-516, 2012.
- SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L.; KAPPLER, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *R. solanacearum* and *R. syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii*, *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *Indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *Celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotypes I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3087-3103, 2014.
- SANTANA, B. G.; LOPES, C. A.; ALVAREZ, E.; BARRETO, C. C.; ALLEN, C.; QUIRINO, B. F. Diversity of Brazilian biovar 2 strains of *Ralstonia solanacearum*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 78, p. 190-200, 2012.
- SANTIAGO, T. R.; LOPES, C. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Genetic characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 587, 2012.
- SANTIAGO, T. R.; PRADA, C.; CAETANO-ANOLLES, G.; LOPES, C. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Evolutionary dynamic of the phylotype II of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, its putative center of origin. In: THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY AND CANADIAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY JOINT MEETING. **Proceedings ...** St. Paul: APS Press, 2014. p. 531.
- SILVEIRA, J. R. P.; DUARTE, V.; MORAES, M. G.; OLIVEIRA, A. M. R.; BARNI, V.; MACIEL, J. L. N. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanacearum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-rep e RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 615-622, 2005.
- SMITH, E. F. **A bacterial disease of tomato, pepper, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp.)**. Washington: United States Department of Agriculture: Division of Vegetable Physiology and Pathology, 1896. p. 1-28. (USDA. Bulletin, 12).
- STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. A. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. **Annual Review Phytopathology**, v. 46, p. 75-100, 2008.
- TAKATSU, A.; LOPES, C. A. Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. **Horticultura Brasileira**, v. 15, p. 170-177, 1997.
- VIANA, F. C.; BERGER, I. J.; DUARTE, V. Caracterização de populações de *Ralstonia solanacearum* Smith em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) no Brasil. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, p. 123-129, 2012.
- WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M.; PRIOR, P. *Ralstonia solanacearum* strain from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6790-6801, 2007.
- WICKER, E.; LEFEUVRE, P.; DE CAMBIAIRE, J. C.; LEMAIRE, C.; POUSSIER, S.; PRIOR, P. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. **The ISME Journal**, v. 6, p. 961-974, 2012.
- YABUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, p.

1251-1275, 1992.

- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb.nov.& *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 39, p. 897-904, 1995.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJBS. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 625-626, 1996.

Melhoramento Genético Visando Resistência à Murcha Bacteriana

Carlos Alberto Lopes
Leonardo Silva Boiteux

1. Introdução

A murcha bacteriana, causada pelo complexo *Ralstonia solanacearum*, é uma das doenças mais intrigantes e devastadoras no mundo, com importância destacada em países de clima tropical e subtropical. Ataca mais de 500 hospedeiras classificadas em dezenas de distintas famílias botânicas, porém é mais destrutiva em membros da família Solanaceae, em especial a batateira (*Solanum tuberosum* L.), tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) cultivados sob condições de alta temperatura e alta umidade (Elphinstone, 2005; Hayward, 1991). Quando a hospedeira é a bananeira, a doença recebe o nome de Moko, que não será tratada na presente revisão.

A complexidade dos patossistemas que resultam na manifestação da murcha bacteriana foi bem definida por Buddenhagen (1986), que afirmou: “A realidade... é que existem várias murchas bacterianas causadas por várias *Ralstonias solanacearum*’s... originárias e com processos evolucionários em locais muito distintos, com diferentes adaptações a ambas as floras, nativa e introduzida, e possivelmente a diferentes condições de solos e ambiente”. Esta afirmativa é forte indicação de que as pesquisas para amenizar os efeitos da doença ainda perdurarão por muitos anos e que as novas propostas de controle necessitam ser comprovadas com experimentação local, conforme será destacado mais adiante nesta revisão.

O controle da murcha bacteriana é difícil, praticamente impossível após o início da epidemia. Isso se deve à diversidade das fontes de inóculo, à rápida multiplicação e dispersão do patógeno, à longa sobrevivência do patógeno no solo, ao aparecimento de variantes capazes de sobrepor a determinadas formas de controle, a baixa frequência e/ou baixo nível de fatores de resistência nas cultivares. Somam-se a isso as estratégias de controle químico pouco eficiente e controle biológico errático devido, principalmente, ao precário atingimento do produto ao alvo e ao surgimento de tolerância aos princípios ativos. Desta maneira, o controle deve ser basicamente preventivo, baseado em um conjunto de medidas complementares dentro da filosofia do controle integrado. E, dentre essas medidas, a resistência a doenças é fator relevante. Merece destaque que, independentemente da sua natureza, o controle requer conhecimento adequado do patossistema, ou seja, de cada um dos componentes do “triângulo da doença” e de suas interações tempo e no espaço.

2. Melhoramento para resistência a doenças

É importante destacar que a resistência a doenças é apenas uma das muitas características buscadas em uma nova cultivar. Para fins práticos, uma cultivar resistente a uma doença deve ser tão boa quanto as cultivares disponíveis no mercado, sendo a produtividade e qualidade as características mais relevantes. Esta qualidade, visual ou não, pode variar desde o brilho da pele da batata (aparência) até o teor de sólidos solúveis em tomate para processamento industrial (composição química).

Seleções de genótipos resistentes, em especial na fase de pré-melhoramento, é comumente feita sob condições controladas, em que grande número de plantas podem ser desafiadas com um ou mais isolado do patógeno por meio de metodologia adequada para separar genótipos resistentes dos suscetíveis. Por outro lado, seleções realizadas em campo (sob condições de inóculo natural) aumentam as chances de obtenção involuntária de cultivares resistentes a doenças que não tinham sido alvo direto do melhoramento, em virtude da natural presença de pressão de seleção aos principais patógenos endêmicos ou epidêmicos em uma determinada região. Com isso, além de validar os resultados obtidos sob condições controladas, testes de campo podem evitar a seleção de genótipos comercialmente promissores, porém com extrema suscetibilidade a outras doenças de ocorrência local.

3. Melhoramento genético para resistência à murcha bacteriana

Nesta revisão, serão discutidos alguns aspectos relevantes relacionados ao melhoramento para resistência à murcha bacteriana, com ênfase nas solanáceas, em especial em batata e tomate. Com base no princípio básico de que “é preciso conhecer para controlar”, será usado o “triângulo da doença” (patógeno – hospedeira – ambiente) para analisar cada um dos seus componentes e de suas interações, tendo como foco o controle da murcha bacteriana por meio do melhoramento genético. Artigos de revisão sobre este tema são encontrados em: Boshou (2005); Buddenhagen (1986); Huet (2014); Lebeau et al. (2011); Prior et al. (1994); e Scott et al. (2005).

A. O patógeno, um complexo – A bactéria *R. solanacearum*, antes conhecida como *Pseudomonas solanacearum* e *Burkholderia solanacearum*, sempre foi considerada uma espécie de elevada variabilidade genética e fenotípica. Durante muitos anos, foi classificada em cinco raças patogênicas (em função da gama de hospedeiras) e em seis biovars, com base na sua capacidade de metabolizar açúcares e alcoóis (Buddenhagen & Kelman, 1964; Hayward, 1991; Hayward, 1994). No Brasil, as raças 1, 2 e 3 foram relatadas associadas a várias espécies agronomicamente importantes, incluindo ornamentais. A biovar 1 tem sido encontrada em todas as regiões do país, a biovar 2 (que corresponde à raça 3), tem sido predominantemente isolada de batata em climas de temperaturas amenas (Sul, Sudeste e Centro-Oeste) e a biovar 3 predomina em regiões com altas temperaturas, em especial no Norte e Nordeste do País. As biovars 4 e 5 ainda não foram detectadas no país.

No início da década passada, apoiados na homologia de DNA-DNA, Fegan & Prior (2005) concluíram que *R. solanacearum* é, de fato, formada por um complexo de espécies distintas, mas geneticamente relacionadas; uma nova classificação foi então proposta baseada em quatro níveis taxonômicos, equivalentes a espécies, subespécies, grupos infra-subespecíficos e linhagens clonais. Nessa nova proposta, o termo “filotipo”, que é identificado por PCR multiplex baseado na região ITS (‘ribosomal intergenic spacer region’) é usado para designar grupos maiores no nível de subespécies, que têm associação com distribuição geográfica. O termo “sequevar”, que é identificado pela análise de sequência de genes de endoglucanase, é usado para designar grupos infra-subespecíficos.

Mais recentemente, no entanto, foi proposto que o filotipo I de *R. solanacearum* (que acomoda isolados da biovar 3 no Brasil) seja uma nova

espécie, *Ralstonia pseudosolanacearum* (Prior et al., 2016; Safni et al., 2014). Desta maneira, *R. solanacearum* seria referida apenas para os isolados do filotipo II, que acomoda as biovars 1 e 2. Isolados dos filotipos III e IV, que recebem outros nomes específicos, ainda não foram relatados no Brasil. Esta proposta tem sido bem aceita pela comunidade científica. A divisão de espécies no gênero *Ralstonia* também foi apoiada por uma análise filogenômica envolvendo 686 genes de cópia única encontrados nos genomas de diferentes isolados (Zhang & Qiu, 2016).

A partir dessas informações sobre a diversidade do patógeno, o melhorista necessita estabelecer as estratégias para o programa de melhoramento. Se a murcha bacteriana, de fato, são muitas murchas bacterianas, qual delas deve ser controlada em uma determinada região? Indo além das distintas espécies, a resistência encontrada em algumas situações não é espécie- ou biovar- ou filotipo-dependente, e sim isolado-dependente. Com isso, cada vez mais se conscientiza de que o melhoramento para resistência à murcha bacteriana não deve ser amplo, mas sim customizado para uma determinada região em função dos isolados e das espécies lá prevalentes.

B. O ambiente na manifestação dos sintomas - Em ambiente desfavorável à doença, não se pode identificar genótipos resistentes. Neste caso, outras variáveis permanecendo constantes, haverá escapes à doença em ensaios em processos de seleção, impedindo a identificação de acessos resistentes. Por outro lado, ambientes muito favoráveis podem levar à quebra da resistência, em especial no caso da resistência quantitativa, que é a que se tem encontrado para as principais hospedeiras do complexo *R. solanacearum*. No caso da murcha bacteriana, sintomas serão mais severos quanto mais alta for a temperatura e a umidade. Esses são os dois fatores que devem ser priorizados quando se inocula o patógeno, na sua forma virulenta, na hospedeira na qual se quer avaliar a resistência, conforme será discutido adiante.

C. A hospedeira frente ao patógeno complexo – A resposta da planta frente à infecção por um patógeno tão variável não poderia deixar de ser muito complexa, mas tem sido elucidada com o auxílio das modernas ferramentas moleculares. No caso do complexo *Ralstonia*, a virulência da bactéria é, em grande parte, definida por efetores, que são proteínas injetadas na célula bacteriana por meio do sistema de secreção do tipo III (TTSS) e que corrompem o sistema de defesa natural da planta, que então se torna suscetível (Huet, 2014). Duas espécies olerícolas serão usadas como exemplos de hospedeiras: a batata e o tomate, culturas sujeitas a grandes perdas econômicas no Brasil e em países de clima tropical e subtropical. Estas espécies, descritas a seguir, foram escolhidas

pelo fato de serem bastante diferentes em termos de cultivo e de estratégias de melhoramento: a batata é, na sua forma comercial, uma espécie tetraploide propagada vegetativamente por meio da batata-semente, enquanto o tomate é diploide e propagado sexuadamente por meio de sementes verdadeiras.

4. Batateira - Avanços no melhoramento genético para resistência à murcha bacteriana

A murcha bacteriana, ou murchadeira, é uma das principais doenças da batata, em especial em cultivos de verão chuvoso. Os sintomas de murcha são ocasionados pela limitação imposta pelo patógeno ao transporte de água desde as raízes até as folhas, devido ao comprometimento da integridade dos vasos do xilema. O sistema vascular fica escurecido, que pode ser percebido ao se descascar o caule na base da planta. Tubérculos afetados têm o anel vascular escurecido, com exsudação de pus bacteriano e apodrecem facilmente pela invasão de microrganismos secundários. Tubérculos usados como batata semente podem ser infectados de forma latente (quiescente) e veicular o patógeno a longas distâncias.

Embora seja considerado o método mais “elegante” e eficaz de controle de doenças (principalmente por ser de fácil adoção pelos agricultores e não onerar os custos de produção), o emprego de cultivares resistentes não tem sido amplamente utilizado no caso da murcha bacteriana da batata. Vários fatores concorrem para a não adoção comercial de resistência genética em batata, em especial a lentidão no processo de seleção de clones melhorados, a propagação vegetativa para fins comerciais dessa espécie, dormência diferenciada de brotação e sua complexidade genética (ploidia = tetraploide). Além disso, os níveis de resistência encontrados em bancos de germoplasma são baixos e pouco estáveis no tempo e no espaço em virtude da alta variabilidade do patógeno e da instabilidade da resistência do tipo horizontal (*sensu* Vanderplank) a variações climáticas (French & De Lindo, 1982; Nielsen & Haynes, 1960; Tung et al., 1990).

É fácil aceitar que qualquer nível de resistência é útil dentro do contexto do manejo integrado. Vale mencionar que, em alguns casos, cultivares que não foram melhoradas para resistência à murcha bacteriana podem comportar-se igual ou melhor do que clones experimentalmente selecionados para tal. Assim, ‘Ontário’ sobressaiu-se entre outras cultivares nos EUA e em Papua Nova Guiné (French, 1994). Da mesma forma, ‘Prisca’ foi a cultivar mais resistente dentre 9.000 genótipos avaliados, motivo pelo qual foi uma das mais importantes

cultivares em Madagascar por muitos anos (Nielsen & Haynes, 1960). No Peru, as cultivares Molinera (De la Puente et al., 1977) e Caxamarca (Herrera et al., 1977) foram desenvolvidas especificamente para resistência à murcha bacteriana e foram importantes para o controle da doença na Região Andina do país, onde ocorre a raça 3 (biovar 2, filotipo II) do patógeno. Todas essas cultivares foram avaliadas em campos infestados com a raça 1 (biovar 1, filotipo II) de *R. solanacearum*, em Brasília, DF, e não foram consideradas aptas para cultivo na Região Centro-Oeste para essa finalidade, em virtude de baixa adaptação (baixa produtividade) e grau de resistência abaixo do esperado (Lopes et al., 1998). Pelo lado da interação patógeno x hospedeira, French et al. (1998) já haviam comentado que a resistência à raça 3 (biovar 2, filotipo II) é mais fácil de ser obtida, visto que esta raça tem um círculo de hospedeiras mais restrito e é menos variável que a raça 1. Essas observações também estão em concordância com a hipótese de Tung et al. (1990), que afirmam que a resistência à murcha bacteriana se manifesta em função da adaptabilidade do genótipo a uma determinada região.

Conforme relatos de Schmiediche (1986) e de Tung et al. (1990), a resistência à murcha bacteriana em batata, independentemente da fonte de resistência, é considerada complexa (poligênica) e parcial, envolvendo genes com efeitos maiores e menores, com ação não aditiva e epistasia. A resistência, portanto, não confere proteção suficiente para ser usada como medida exclusiva de controle. Além disso, é difícil combinar a resistência com outras características de herança poligênica (ex. tipo de pele, formato de tubérculos e produtividade). Isso se deve, em parte, à complexa combinação gênica em espécies tetraploides (tais como *S. tuberosum*), dificultada ainda pela associação com a origem selvagem dos fatores de resistência.

Um marco na busca de controle da murcha bacteriana foi o esforço feito pelo CIP que reuniu diferentes fontes de resistência e promoveu cruzamentos com genótipos de características agronômicas comerciais e resistência a outras doenças, formando assim uma base genética de alto valor científico. As principais fontes obtidas com resistência à murcha bacteriana foram: **(1)** clones derivados de genótipos colombianos de *S. phureja* selecionados na Universidade de Wisconsin na década de 1970; **(2)** clone AVRDC-1287 derivado de *S. chacoense* e *S. raphanifolium*; **(3)** a variedade Cruza 148, de origem desconhecida e também resistente à requeima; e **(4)** populações diploides derivadas de espécies silvestres de *S. chacoense* e *S. sparsipilum*, além das espécies nativas *S. stenotomum*, *S. phureja* e *S. goniocalyx* (Fock et al., 2005;

Priou et al., 2005). Devido à facilidade de cruzamento, a resistência derivada de clones de *S. phureja* tem sido a mais utilizada.

Na primeira década de 2000, o programa de melhoramento de batata do CIP voltado para resistência à murcha bacteriana foi descontinuado com a saída da Dra. Sylvie Priou, que deixou um conjunto de clones com resistência diferenciada obtidos de seleção por mais de 10 anos. Além da seleção pelo sintoma de murcha, os clones passavam por testes de infecção latente por meio de técnicas serológicas e moleculares conduzidas no CIP (Priou et al., 2005). Por questões burocráticas impostas ao intercâmbio de germoplasma na última década, a transferência desses clones para testes no Brasil foi inviabilizada. Mesmo sem o apoio histórico do CIP, os trabalhos de seleção de resistência à murcha bacteriana na Embrapa Hortaliças tiveram continuidade por quase 10 anos em São Joaquim, SC, graças à colaboração com o Dr. Zilmar Souza, da EPAGRI, que encaminhava para Brasília as sementes oriundas dos cruzamentos orientados, após discussões conjuntas. As seleções para resistência e para características de tubérculos prosseguiram nos campos naturalmente infestados com a bactéria na Embrapa Hortaliças. Desde então, cerca de 5.000 genótipos foram avaliados por ano. Nos últimos quatro anos, os cruzamentos vêm sido feitos na Embrapa Clima Temperado, sob a coordenação do Dr. Arione Pereira, líder do Projeto de Melhoramento de Batata da Embrapa.

No Brasil, ‘Achat’ foi a única cultivar disponível no País que apresentou certo grau de resistência quando avaliada em solo naturalmente infestado em Brasília-DF (Lopes, 2005). É interessante notar que a resistência de ‘Achat’ mostrou-se estável e de amplo espectro como indicado em ensaios de campo em Brasília-DF, onde predomina a raça 1 (biovar 1) e no Rio Grande do Sul, onde prevalece a raça 3 (biovar 2) (Lopes, 2005; Maciel et al., 2001; Silveira, 2007). Essa característica fez com ‘Achat’ tivesse o menor índice de rejeição em campos de produção de batata-semente no Brasil, cuja principal causa de condenação era a murcha bacteriana (Lopes et al., 1990). A resistência à doença, entretanto, não foi suficientemente relevante para evitar que ‘Achat’ (que foi a líder de mercado durante as décadas de 1980 e 1990) fosse substituída por outras cultivares suscetíveis, mas de melhor aparência, tais como ‘Monalisa’, ‘Cupido’ e ‘Agata’ (as duas últimas ainda dominam o mercado). Merece registro o fato de que ‘Achat’ nunca foi usada como genitor por não florescer e, nas raras vezes que isso acontecia, não produzia frutos, mesmo em situações altamente favoráveis ao florescimento da batata.

O clone MB03 (derivado de *S. phureja*) selecionado na Embrapa Hortaliças, em Brasília, DF (Lopes et al., 2004) apresentou alto nível de resistência,

significativamente superior ao da cultivar Achat, tanto no Distrito Federal, onde predomina a raça 1 (biovar 1, filotipo II) como no Rio Grande do Sul, onde predomina a raça 3 (biovar 2, filotipo II). Este clone, apesar de apresentar características indesejáveis de tubérculos (pele áspera, olhos profundos) e ciclo longo, ainda hoje tem sido utilizado como a principal fonte de resistência no programa de melhoramento de batata da Embrapa, por conta da sua alta resistência a doenças foliares e da alta produtividade.

Na busca de fontes alternativas de resistência, genótipos de *S. commersonii* foram avaliados no Uruguai (Siri et al., 2009) e na Itália (Carputo et al., 2009), com resultados promissores, porém com nenhuma cultivar derivada deles ainda disponível para plantio comercial. A carência de genes de resistência em germoplasma de batata sugere a busca de novos genes em espécies distintas entre as solanáceas. Por exemplo, Yu et al. (2013) propuseram a introgressão de genes de resistência de berinjela (*S. melongena*) para acessos diplóides batata. Embora certa resistência possa ser conseguida por meio deste processo, questiona-se a recuperação de genótipos tetraploides de batata que contenham a combinação de características de resistência e comerciais.

Existe um paradigma de que genótipos resistentes oferecem o risco de facilitar a disseminação da doença por infecção latente, i.e., batata-semente que tenha passado nas inspeções por não apresentarem sintomas, mesmo estando infectadas. Este fenômeno não foi constatado no período de plantio extensivo de ‘Achat’, embora o não tenha sido analisado cientificamente. De fato, a resistência genética parcial, como disponível para o caso da murchadeira em batata, pode favorecer o estabelecimento de infecção latente. No entanto, esta restrição só será válida quando a cultivar “resistente” for plantada em lavouras com alta infestação pelo patógeno. Em terrenos com baixa infestação, conforme recomendado nas boas práticas de cultivo, tanto cultivares suscetíveis como as resistentes estão igualmente sujeitas à infecção latente, condicionada pela favorabilidade das condições climáticas ao aparecimento dos sintomas.

5. Tomateiro - Avanços no melhoramento genético para resistência à murcha bacteriana

A murcha bacteriana também é uma das principais doenças do tomateiro, limitante em locais com alta temperatura e alta umidade, como observado há longo tempo em lavouras conduzidas na Região Norte do País, e sob cultivo protegido, onde a rotação de culturas é restrita por limitação de área de cultivo e carência de alternativas de culturas com alto rendimento para compensar o custo

de implantação do sistema. Embora esforços tenham sido feitos no sentido de desenvolver novas cultivares de tomateiro para as condições do Nordeste (Silveira et al., 1999) e da Amazônia brasileira (Cheng & Chu, 2002; Cheng & Silva, 1988; Noda et al., 1988; Pena et al., 2010), a murcha bacteriana continua sendo o principal entrave à produção desta hortaliça, em especial na Região Norte (Coelho Netto et al., 2004; Lopes, 2009; Noda et al., 1986; Souza et al., 2013). Portanto, não existem cultivares com adequado grau de resistência, e o controle da doença, como no caso da batata, depende da adoção de medidas preventivas integradas.

Na busca de fontes de resistência estável à doença, Hong Hai et al. (2008) avaliaram 252 acessos silvestres de *Solanum* da coleção do AVRDC, em Taiwan, e da coleção da Universidade da Califórnia, Davis, para resistência ao isolado Pss 186, da raça 1, biovar 4, filotipo I de *R. solanacearum*. A maioria dos genótipos foi altamente suscetível a este isolado, mas cinco acessos de *S. pennellii* foram resistentes. No entanto, todos estes acessos foram suscetíveis ao isolado Pss4 e resistentes ou moderadamente resistentes ao isolado Pss 190, também da raça 1 filotipo I. Carmeille et al. (2006) avaliaram 82 genótipos de diferentes espécies de *Solanum* (*Lycopersicon*) da coleção de germoplasma de tomate das Ilhas Reunião para resistência à raça 3 biovar 2 filotipo II, endêmica na região. Com exceção de um acesso de *S. peruvianum* e um acesso de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, que foram parcialmente resistentes, todos foram suscetíveis. Nesta avaliação, embora cerca da metade das suas plantas inoculadas tenham murchado, ‘Hawaii 7996’ foi considerada a melhor fonte de resistência a esta raça, sendo indicada para programas de melhoramento na região.

O acesso ‘Hawaii 7997’ foi identificado como sendo a melhor fonte de resistência em termos de habilidade geral de combinação. No entanto, o acesso ‘Hawaii 7996’ foi o que apresentou a maior estabilidade e maior espectro de ação entre um conjunto internacional de fontes de resistência à doença em avaliações conduzidas em 11 países (Lebeau et al., 2011; Scott et al., 2005; Wang et al., 1998). Pelo fato de RS ser um patógeno altamente variável, é essencial que se tenha uma resistência estável; por isso, ‘Hawaii 7996’ vem sendo usado na maioria dos programas de melhoramento e em estudos de herança da resistência. Deve ser levado em conta, entretanto, que a resistência de ‘Hawaii 7996’ pode sucumbir parcialmente na presença de variantes altamente virulentas, como já observado na Martinica (Wicker et al., 2007), em Taiwan com o isolado Pss190 da raça 1, biovar 1 filotipo I (Hong Hai et al., 2008) e no Brasil, em testes na Embrapa Hortaliças com o isolado CNPH RS 488 da raça 3, biovar 2, filotipo II (Lopes et al., 2015). De fato, Lopes et al. (1994) já haviam

observado que existe uma reação diferencial de genótipos quando inoculados com isolados das biovars I e III, tendo sido encontrados genótipos resistentes apenas a representantes da biovar III, ou às duas biovars, o que deveria ser considerado em programas de melhoramento.

Esses resultados evidenciam a característica de resistência do tipo isolado-específica neste patossistema, o que requer o desenvolvimento de programas direcionados por região geográfica (melhoramento customizado), em que o monitoramento regional constante da prevalência de isolados bacterianos é necessário. Outro fator complicador é o fato que virtualmente todas as fontes de resistência encontradas são do tipo oligogênica ou poligênica, conferindo resistência horizontal a diversas variantes do patógeno, porém sofrendo grande influência ambiental com baixa expressão fenotípica em condições de elevadas temperaturas (Lebeau et al., 2011; Prior et al., 1990; Prior et al., 1994).

Especialmente em cultivo protegido, o controle da murcha bacteriana tem sido implementado pelo uso de cultivares de porta enxertos híbridas resistentes, já disponíveis no mercado (Lopes et al., 2015). Alerta-se para o fato de que a proteção contra a murcha bacteriana ocorre em situações de baixa pressão de inóculo no solo e/ou condição de temperatura e umidade pouco favoráveis à doença. Sob alta pressão do inóculo (alta virulência e/ou alta população do patógeno), condições ambientais favoráveis e presença de isolados muito virulentos, combinações que podem ocorrer com frequência no País, dificilmente a enxertia de tomateiro em tomateiro *per se* proporcionará proteção adequada da planta enxertada contra a doença. Nestes casos, medidas complementares de controle que visem a reduzir a população do patógeno no solo ou escolha de ambiente menos propício à sua multiplicação (Baptista et al., 2007; Ioannou, 2001). A instabilidade da proteção por meio da enxertia em porta-enxertos comerciais resistentes foi também verificada por Rivard et al. (2012) em campos no sul dos EUA com diferentes níveis de infestação do solo e/ou com condições mais favoráveis à instalação da doença.

Nenhuma fonte de resistência monogênica para resistência foi identificada à murcha bacteriana em germoplama de tomate. Vários QTLs (denominados ‘bacterial wilt resistance’ – *Bwr*) foram identificados no acesso ‘Hawaii 7996’ e numerados de acordo com a sua posição cromossômica. Essas regiões do genoma explicaram entre 3,2% a 29,8% da variação fenotípica da resistência à murcha bacteriana em diferentes condições experimentais (Carmeille et al., 2006; Debert et al., 1999; Mangin, 1999; Thoquet et al., 1996), sendo que o QTL *Bwr*-6 identificado como um dos principais fatores de resistência. Wang et al. (2013), confirmaram, com distintos isolados, que os QTLs de maior efeito para

resistência estável do acesso ‘Hawaii 7996’ estão localizados nos cromossomos 6 (*Bwr-6*) e 12 (*Bwr-12*). Os QTLs *Bwr-4* e *Bwr-8* foram detectados apenas em circunstâncias de elevada temperatura (Carmeille et al., 2006; Wang et al., 2013). Do ponto de vista do melhoramento, a presença de fatores de resistência associados com o QTL *Bwr-6* representa um enorme desafio, pois ele está ligado (em repulsão) com frutos de tamanho pequeno e com susceptibilidade a outros importantes patógenos de regiões tropicais tais como os nematóides-das-galhas (*Meloidogyne* spp.) e begomovírus (Debert et al., 1999; Wang et al., 2013). Marcadores do tipo SCAR (‘sequence characterized amplified region’) em estreita ligação com os fatores de resistência presentes em ‘Hawaii 7996’ foram recentemente desenvolvidos (Hanson et al., 2016; Truong et al., 2015) e podem facilitar a detecção de eventos de recombinação de interesse nessa região.

6. Metodologia para identificação de genótipos resistentes à murcha bacteriana

A seleção de plantas resistentes a doenças em programas de melhoramento genético só é eficaz se houver uma metodologia adequada para separar genótipos resistentes dos suscetíveis. Quando se lida com a resistência quantitativa, como é o caso da murcha bacteriana, é necessário que esta metodologia tenha precisão capaz de detectar diferenças sutis entre genótipos e levar em conta que a resistência pode ser “quebrada” por condição ambiental muito favorável. A padronização de métodos também é desejável, pois reduz a discrepância entre dados, assim permitindo melhor comparação de resultados de diferentes autores. O processo de seleção, para melhor confiabilidade dos dados que permite a publicação de resultados em periódicos científicos exigentes, deve envolver equipe multidisciplinar, em especial um melhorista, um fitopatologista/bacteriologista e um estatístico.

A seguir, são listados passos importantes que eventualmente podem ser adaptados à espécie ou à infraestrutura disponível, a serem seguidos quando se pretende selecionar plantas resistentes à murcha bacteriana:

1. Planejar o delineamento estatístico para que se tenham respostas robustas em relação aos tratamentos que se quer avaliar. Recomenda-se a participação de um estatístico para a definição do tamanho mínimo das parcelas e o número de repetições.

2. Em condições de inoculação artificial das plantas mantidas em vasos em casa de vegetação, sugere-se usar parcelas de pelo menos seis plantas e, pelo

menos três repetições. Em testes de campo, onde normalmente o patógeno não está bem distribuído no solo, deve-se aumentar o número de repetições para cinco e manter o número de plantas por parcela. Altos coeficientes de variação, que levam a interpretações confusas, são frequentemente observados quando se usam parcelas pequenas, lembrando que escapes são comuns para diversos patossistemas envolvendo a murcha bacteriana;

3. Inocular plantas uniformes, vigorosas e sadias. Idades fisiológicas diferentes de plantas de genótipos distintos levam ao mascaramento da reação do genótipo. Por exemplo, plantas velhas normalmente são mais resistentes que plantas novas. Essa observação é mais relevante na resistência quantitativa, que é o caso que se aplica à murcha bacteriana;

4. Selecionar isolados do patógeno que sejam representativos dos locais de interesse. Como *R. solanacearum* é um patógeno muito variável, é necessário que as plantas sejam desafiadas com isolados obtidos na região para onde a cultivar se destina, pois assim se tem maior garantia de uma resistência estável e durável;

5. Usar a concentração de inóculo adequada. Essa concentração, que varia normalmente de 10^7 a 10^8 UFC/mL, irá depender principalmente da espécie hospedeira, do grau de virulência do isolado, da idade da planta e do método de inoculação a ser usado;

6. Usar um método adequado de inoculação que, de acordo com a idade da planta e a concentração de inóculo, permita diferenciar os genótipos resistentes dos suscetíveis. Este método deve se aproximar ao máximo do modo de infecção natural (Ver Tabela 1);

7. Após a inoculação, expor as plantas a um ambiente favorável à manifestação da doença. A murcha bacteriana requer a manutenção de solo bastante úmido. Temperaturas devem estar na amplitude de 20 °C a 40 °C, sendo o ideal em torno de 30 °C durante o dia. Em caso de noites frias, deve-se instalar aquecedor com termostato com acionamento automático quando a temperatura atingir 20 °C;

8. Usar testemunhas suscetíveis (que servirão para comprovar o sucesso da inoculação) e testemunhas resistentes (para aferir se o método de inoculação não é excessivamente drástico). É essencial que a metodologia permita diferenciar claramente os genótipos resistentes dos suscetíveis;

9. Usar escala de notas que permita clara diferenciação entre os graus/níveis de resistência. De preferência, avaliar a incidência de plantas murchas em leituras sucessivas. Análise estatística deve ser realizada com base na área abaixo da curva de progresso da doença ou em leitura única que tenha

diferenciado melhor os genótipos em termos de resistência. Em caso do uso de escala de notas, esta deve ser quantitativa para possibilitar análise estatística precisa. Se necessário, fazer transformação de dados, de acordo com a instrução de um estatístico;

10. Realizar análise estatística adequada. Normalmente se usam testes de agrupamentos que separam os indivíduos resistentes dos suscetíveis. Em caso de o número de genótipos avaliados ser muito grande (acima de 30), não se recomenda o teste de separação de médias (Tukey, Duncan, Kruskal-Wallis), e sim os que separam os genótipos das testemunhas (Dunnett) ou em grupos de reação a doença/patógeno (Scott-Knott).

Tabela 1. Exemplos da combinação da concentração de inóculo, método de inoculação e idade da planta na efetividade* da separação entre genótipos resistentes e suscetíveis à murcha bacteriana em tomateiro.

Concentração de inóculo	Plântula (“seedling”)		Planta adulta	
	Método drástico	Método suave	Método drástico	Método suave
10 ⁶	++ Algum escape	+ Escape	++ Possível escape	+ Escape
10 ⁷	+++	++ Possível escape	++ Possível escape	+ Escape
10 ⁸	+ Quebra de resist.	+++	+++	++ Possível escape

*: Efetividade relativa da metodologia: +: pouco efetiva; ++: efetividade média; +++: muito efetiva.

7. Métodos para inoculação de plantas com o complexo *R. solanacearum*

Métodos drásticos – Inserção no caule de palito contaminado na colônia bacteriana, injeção da suspensão de inóculo bactéria diretamente nos vasos, corte do limbo e pecíolo da folha com tesoura contaminada em suspensão de inóculo;

Métodos intermediários – Mergulhia de raízes em suspensão de inóculo, suspensão de inóculo vertida no solo após ferimento das raízes com faca,

pulverização com suspensão de inóculo das raízes expostas ao se arrancar as mudas das células, plantio no campo de mudas inoculadas;

Métodos suaves – Plantio de mudas sadias diretamente em campo infestado, embebição das sementes em suspensão bacteriana, inoculação da parte aérea com suspensão de inóculo.

8. Considerações finais

Embora muitos esforços tenham sido despendidos por competentes equipes de pesquisa nas últimas décadas para a obtenção de cultivares resistentes à murcha bacteriana, os avanços têm sido muito lentos. A seguir, são listados os gargalos mais importantes encontrados nesses trabalhos:

- Tremenda variabilidade do patógeno que, na verdade não é um patógeno, mas um complexo de espécies capaz de atacar uma vasta gama de plantas hospedeiras. Esta característica é indicadora da dificuldade de se obter controle por meio de melhoramento genético.
- A resistência é de controle genético complexo, controlada quantitativamente e fortemente influenciada pelo ambiente, tais como temperatura e umidade do solo.
- A seleção é difícil, pois o ambiente dificulta a seleção eficaz em populações segregantes. É comum se ter plantas com sintomas em genótipo resistente e plantas sem sintomas em genótipos suscetíveis (daí a necessidade de se dispor de metodologia adequada para a avaliação).
- Presença de genes de resistência ligados a genes indesejáveis, tais como ciclo muito longo (em batata) e frutos pequenos e sensíveis a rachaduras (em tomate).
- Fontes de resistência do tipo isolado-específica, que requer programa de melhoramento com ações regionais (melhoramento customizado).

9. Bibliografia

- AILLOUD, F.; LOWE, T.; CELLIER, G.; ROCHE, D.; ALLEN, C.; PRIOR, P. Comparative genomic analysis of *Ralstonia solanacearum* reveals candidate genes for host specificity. **BMC Genomics**, v. 16, p. 270, 2015.
- BAPTISTA, M. J.; REIS JUNIOR, F. B.; XAVIER, G. R.; ALCÂNTARA, C.; OLIVEIRA, A. R.; SOUZA, R. B.; LOPES, C. A. Eficiência da solarização e biofumigação do solo no controle da murcha-bacteriana do tomateiro no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 933-938, 2007.
- BOSHOU, L. A broad review and perspective on breeding for resistance to bacterial wilt. In:

- ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p. 225-246.
- BUDDENHAGEN, I. Bacterial wilt revisited. In: PERSLEY, G. (Ed.). **Bacterial wilt in Asia and the South Pacific**. Canberra: ACIAR, 1986. p. 126-143. (ACIAR Proceedings, 13).
- BUDDENHAGEN, I; KELMAN, A. A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 2, p. 203-230, 1964.
- CARMEILLE, A; PRIOR, P; KODJA, H; CHIROLEAU, F; LUISETTI, J; BESSE, P. Evaluation of resistance to race 3, biovar 2 of *Ralstonia solanacearum* in tomato germplasm. **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 398-402, 2006.
- CARPUTO, D.; AVERSANO, R.; BARONE, A.; DI MATTEO, A.; IORIZZO, M.; SIGILLO, L.; ZOINA, A.; FRUSCIANTE, L. Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. **American Journal Potato Research**, v. 86, p.196-202, 2009.
- CHENG, S. S.; CHU E. Y. 'Pará Belo', um clone do tomateiro adaptado à Amazônia Oriental. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 516-519, 2002.
- CHENG, S. S.; SILVA, M. M. C-38 N, nova cultivar de tomate tolerante à murcha bacteriana para trópico úmido brasileiro. **Horticultura Brasileira**, v. 6, p. 50, 1988.
- COELHO NETTO, R. A.; PEREIRA, B. G.; NODA, H.; BOHER, B. Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 21-27, 2004.
- DE LA PUENTE, F.; HERRERA, I. M.; VÁSQUEZ, V. A.; FRENCH, E. **Molinera**: variedad de papa resistente a la marchitez bacteriana y la rancia. Lima: DGI Ministerio de Alimentacion, 1977. 18 p. (DGI Ministerio de Alimentacion. Informe Especial, 57).
- DE LA PUENTE, F.; HERRERA, I. M.; VÁSQUEZ, V. A.; FRENCH, E. **Molinera**: variedad de papa resistente a la marchitez bacteriana y la rancia. Lima: DGI Ministerio de Alimentacion, 1977. 18 p. (DGI Ministerio de Alimentacion. Informe Especial, 57).
- DEBERDT, P.; QUÉNÉHERVÉ, P.; DARRASSE, A.; PRIOR, P. Increased susceptibility to bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the *Mi* gene in resistance to nematodes and bacterial wilt. **Plant Pathology**, v. 48, p. 408-414, 1999.
- ELPHINSTONE, J. G. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: ALLEN, C., PRIOR, P., HAYWARD, A.C. (Eds.) **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p. 9-28.
- FEGAN, M.; PRIOR, P. How Complex is the "*Ralstonia solanacearum* Species complex"? In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p. 449-461.
- FOCK, I.; LUISETTI, J.; COLLONNIER, C.; VEDEL, F.; DUCREUX, G.; KODJA, H.; SIHACHAKR, D. *Solanum phureja* and *S. stenotomum* are sources of resistance to *Ralstonia solanacearum* for somatic hybrids of potato. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p. 253-259
- FRENCH, E. R. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB, 1994. p. 199-207.
- FRENCH, E. R.; ANGUIZ, R.; ALEY, P. The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum* for the integrated control of bacterial wilt. In: PRIOR, S.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (Eds.). **Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects**. Berlin: Springer Verlag, 1998. p. 381-385

- FRENCH, E.; DE LINDO, L. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: specificity and temperature sensitivity. **Phytopathology**, v. 72, p. 1408-1412, 1982.
- HANSON, P.; LU, S. F.; WANG, J. F.; CHEN, W.; KENYON, L.; TAN, C. W. Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 201, p. 346-354, 2016
- HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 65-87, 1991.
- HAYWARD, A. C. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB, 1994. p. 9-24.
- HERRERA, I. M.; VÁSQUEZ, V. A.; DE LA PUENTE, F.; FRENCH, E. **Caxamarca (chaucha mejorada)**: nueva variedad de papa resistente a la marchitez bacteriana y la rancha. Lima: DGI Ministerio de Alimentacion, 1977. 18 p. (DGI Ministerio de Alimentacion. Informe Especial, 49).
- HONG HAI, T. T.; ESCH, E.; WANG, J. -F. Resistance to Taiwanese race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in wild tomato germplasm. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, p. 471-479, 2008.
- HUET, G. Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. **Frontiers in Plant Science / Plant-Microbe Interaction**, v. 5, p. 1-5, 2014.
- IOANNOU, N. Integrating soil solarization with grafting on resistant rootstocks for management of soil-borne pathogens of eggplant. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, p. 396-401, 2001.
- LEBEAU, A.; DAUNAY, M. -C.; FRARY, A.; PALLOIX, A.; WANG, J. -F.; DINTINGER, J.; CHIROLEU, F.; WICKER, E.; PRIOR, P. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. **Phytopathology**, v. 101, p.154-165, 2011.
- LOPES C. A. **Murcha-bacteriana ou murchadeira** – uma inimiga do tomateiro em climas quentes. 2009. Disponível em <http://bbeletronica/versaomodelo/html/2009/cot/cot_67.shtml>. Acesso em: 10 set. 2015.
- LOPES C. A.; QUEZADO-SOARES A. M.; MELO P. E. Differential resistance of tomato cultigens to biovars I and III of *Pseudomonas solanacearum*. **Plant Disease**, v. 78, p. 1091-1094, 1994.
- LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S.; ESCHEMBACK, V. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p.125-130, 2015.
- LOPES, C. A.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; BUSO, J. A. **MB 03**: clone de batata resistente à murcha bacteriana. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. 17 p. (Embrapa Hortaliças: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).
- LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M.; BUSO, J. A.; MELO, P. E. 1998. Breeding for resistance to bacterial wilt of potatoes in Brazil. In: PRIOR, S.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (Eds.). **Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects**. Berlin: Springer Verlag, 1998. p. 290-293
- LOPES, C. A.; SANTOS, M. M. B.; GOEPFERT Jr., F. J.; NOGUEIRA, P. C. Condenação de campos de certificação de batata-semente pela murcha-bacteriana no Brasil, safra 1986/1987. **Horticultura Brasileira**, v. 8, p. 14-16, 1990.
- LOPES, C.A. **Murchadeira da batata**. Itapetininga: ABBA / Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. 65 p.

- MACIEL, J. L. N.; DUARTE, V.; SILVEIRA, J. R. P.; VAN DER SAND, S. T. Frequência de biovars de *Ralstonia solanacearum* em diferentes cultivares e épocas de cultivo de batata no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 741-744, 2001.
- MANGIN, B.; THOQUET, P.; OLIVIER, J.; GRIMSLEY, N. H. Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. **Genetics**, v. 151, p. 1165-1172, 1999.
- NIELSEN, L. W.; HAYNES, F. L. Resistance in *Solanum tuberosum* to *Pseudomonas solanacearum*. **American Potato Journal**, v. 37, p. 260-267, 1960.
- NODA, H.; MACHADO, F. M.; SILVA FILHO, D. F. Yoshimatsu, cultivar de tomate para cultivo no Trópico Úmido. **Horticultura Brasileira**, v. 6, p. 70, 1988.
- NODA, H.; MACHADO, F.M.; SILVA FILHO, D. F. Yoshimatsu, cultivar de tomate para cultivo no Trópico Úmido. **Horticultura Brasileira**, v.6, p. 70, 1988.
- NODA, H.; VON-DER PAHLEN, A.; SILVA FILHO D. F. Avaliação da resistência de progênies de tomate à murcha-bacteriana em solo naturalmente infestado por *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Dows.). **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 55-66, 1986.
- PENA, M. A.; NODA, H.; MACHADO, F. M.; PAIVA, M. S. S. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de tomateiro sob cultivo em solos de terra firme e várzea da amazônia infestados por *Ralstonia solanacearum*. **Bragantia**, v. 69, p. 27-37, 2010.
- PRIOR, P.; AILLOU, F.; DALSSING, B. L.; REMENANT, B.; SANCHEZ, B.; ALLEN, C. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC Genomics**, v. 17, p. 90, 2016.
- PRIOR, P.; GRIMAULT, V.; SCHMIT, J. Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: present status and prospects. In: HAYWARD, A. C.; HARTMAN, G. L. (Eds.). **Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Wallingford: CAB, 1994. p. 209-224.
- PRIOR, P.; STEVA, H.; CADET, P. Aggressiveness of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies (Martinique and Guadeloupe) on tomato. **Plant Disease**, v. 74, p. 962-965, 1990.
- PRIOU, S.; ALEY, P.; GUTARRA, L. Assessment of resistance to bacterial wilt in CIP advanced potato clones. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. St. Paul: APS Press, 2005. p. 261-267.
- RIVARD, C. L.; O'CONNELL, S.; PEET, M. M.; WELKER, R. M.; LOUWS, F. J. Grafting tomato to manage bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in the southeastern United States. **Plant Disease**, v. 96, p. 973-978, 2012.
- SAFNI, I.; CLEENWERCK, I.; DE VOS, P.; FEGAN, M.; SLY, L.; KAPPLER, U. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3087-3103, 2014.
- SCHMIEDICHE, P. Breeding potatoes for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. In: PERSLEY, G. (Ed.). **Bacterial wilt in Asia and the South Pacific**. Canberra: ACIAR, 1986. p. 105-11. (ACIAR Proceedings, 13).
- SCOTT, J. W.; WANG, J. -F.; HANSON, P. M. Breeding tomatoes for resistance to bacterial wilt, a global view. In: MOMOL, T.; JI, P.; JONES, J. B. *Acta Horticulturae*, v. 695, p. 161-172, 2005.

- SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; FERRAZ, E.; MARANHÃO, E. A. A.; MARIANO, R. L. R. Identificação de progênies de tomateiro resistentes à murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira**, v. 17, p. 6-10, 1999.
- SILVEIRA, J. R. P. **Aspectos epidemiológicos e de resistência à *Ralstonia solanacearum* na cultura da batata no Rio Grande do Sul**. 2002. 104 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SILVEIRA, J. R. P.; DUARTE, V.; MORAES, M. G.; LOPES, C. A.; FERNANDES, J. M.; BARNI, V.; MACIEL, J. L. N. Epidemiological analysis of clones and cultivars of potato in soil naturally infested with *Ralstonia solanacearum* biovar 2. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 181-188, 2007.
- SIRI, M. I.; GALVÁN, G. A.; QUIRICI L.; SILVERA, E.; VILLANUEVA, P.; FERREIRA, F.; FRANCO FRAGUAS, L.; PIANZZOLA, M. J. Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. **Euphytica**, v. 165, p. 371-382, 2009.
- SOUZA, N. M.; BLIND, A. D.; SILVA, FILHO D. F.; RODRIGUES, H. S.; NODA, H. Avaliação de linhagens e cultivares de tomate resistentes à murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) desenvolvidas na Amazônia. **Enciclopedia Biosfera**, v. 9, p. 400-410, 2013.
- THOQUET, P.; OLIVIER, J.; SPERISEN.; C.; ROGOWSKY.;P, LATERROT, H. Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii 7996. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 9, p. 826-836, 1996.
- TRUONG, H. T. H.; KIM, S.; TRAN, H. N.; NGUYEN, T. T. T.; NGUYEN, L. T.; HOANG, T. K. Development of a SCAR marker linked to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) resistance in tomato line Hawaii 7996 using bulked-segregant analysis. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 56, p. 506-515, 2015.
- TUNG, P. X.; RASCO, E. T.; ZAAG, P. V.; SCHMIEDICHE, P. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato: I Effects of sources of resistance and adaptation. **Euphytica**, v. 45, p. 203-210, 1990.
- WANG, J. -F.; HANSON, P.; BARNES, J. A. Worldwide evaluation of an international set of resistance sources to bacterial wilt in tomato. In: PRIOR, S.; ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (Eds.). **Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects**. Berlin: Springer Verlag, 1998. p. 269-275.
- WANG, J. -F.; HO, F. -I; TRUONG, H. T. H.; HUANG, S. -H.; BALATERO, C. H.; DITTAPONGPITCH, V.; HIDAYATI, N. Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii 7996' to *Ralstonia solanacearum*. **Euphytica**, v. 190, p. 241-252, 2013.
- WICKER, E.; GRASSART, L.; CORANSON-BEAUDU, R.; MIAN, D.; GUILBAUD, C.; FEGAN, M.; PRIOR, P. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6790-6801, 2007.
- YU, Y.; YE, W.; HE, L.; CAI, X. Introgression of bacterial wilt resistance from eggplant to potato via protoplast fusion and genome components of the hybrids. **Plant Cell Report**, v. 32, p. 1687-1701, 2013.
- ZHANG, Y.; QIU, S. Phylogenomic analysis of the genus *Ralstonia* based on 686 single-copy genes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109: p. 71-82, 2016.

Raquitismo da Soqueira: a Realidade da Ação de um Discreto Agente Nocivo em Canaviais Brasileiros

Andrea Chaves Fiuza Porto
Renata Rodrigues de Almeida
Tercílio Calsa Júnior

1. Introdução

A cana-de-açúcar é provavelmente originária da Ásia (Barnes, 1964) e foi introduzida no Brasil em 1522 por Martim Afonso de Souza (Fernandes, 1990). As condições edafo-climáticas favoráveis ao desenvolvimento contribuíram para a expansão da cultura para engenhos situados no litoral do país e estados do Centro-Sul, tornando o Brasil líder mundial com produção na safra 2015/16 de 665.586,0 milhões de toneladas e área cultivada de 8.654,2 mil hectares. O crescimento foi de 4,9% em relação à safra anterior (Companhia Nacional de Abastecimento-Conab, 2016).

Nesta safra, o ranking de produtores de cana-de-açúcar brasileiros teve a liderança do estado de São Paulo. Representantes da região Nordeste, ocuparam a sexta e sétima colocação (Tabela 1).

Diante do exposto, é expressiva a diferença da produtividade agrícola nordestina em relação aos outros estados brasileiros mais bem colocados na sequência de classificação. Este fato se deve, entre outros motivos, à incidência de problemas fitossanitários na cana-de-açúcar, que são agravados pelo cultivo em áreas de baixa fertilidade e baixa pluviometria e/ou má distribuição de chuvas.

Tabela 1. Ranking dos maiores produtores da cultura da cana-de-açúcar no Brasil-Safra 2015/2016 (CONAB, 2016).

Ranking nacional	Produção (Mil T)	Área plantada (Mil Ha)	Produtividade (TCH)
São Paulo	367.587,6	4.498,3	81,7
Goiás	73.190,5	885,8	82,6
Minas Gerais	64.932,4	866,5	74,9
Mato Grosso do Sul	48.685,4	596,8	81,6
Paraná	41.286,1	515,7	80,1
Alagoas	16.193,4	323,6	50,0
Pernambuco	11.349,0	254,2	44,7
Brasil	665.586,0	8.654,2	76,9

As doenças mais comumente registradas em canaviais nordestinos são carvão (*Sporisorium scitamineum*), nematoses (*Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* sp.), escaldadura das folhas (*Xanthomonas albilineans*), ferrugem marrom (*Puccinia melanocephala*), ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*) e pelo advento da mecanização agrícola em áreas de plantio, a podridão vermelha (*Colletotrichum falcatum*).

A maioria destas doenças apresenta sintomas específicos, o que facilita o diagnóstico, porém, o raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* – Lxx), não apresenta especificidade, sendo este fato importante para a pronta disseminação desta bactéria em áreas de cultivo da cana-de-açúcar no mundo.

2. Histórico do raquitismo da soqueira (RSD) em cana-de-açúcar

O raquitismo da soqueira, também conhecido por RSD (Ratoon Stunting Disease) foi detectado pela primeira vez na Austrália (Queensland) em 1944, numa primavera seca. Na época, canaviais cultivados com a variedade Q28 apresentavam soqueiras subdesenvolvidas, fato que foi frequentemente observado por técnicos e pesquisadores. A ausência de sintomas específicos dificultou estudos de associação de um possível patógeno associado aos tecidos nas plantas, o que ocorreu através de experimentos conduzidos ao final da década de 40 (Steindl, 1949).

O relato da doença coincide com a produção de híbridos de cana-de-açúcar por cruzamentos entre *Saccharum officinarum* e *S. spontaneum*, na década de 1940. Portanto, o surgimento do raquitismo da soqueira pode ter sido favorecido pela intervenção humana, através da criação dos híbridos genitores da maioria das variedades atuais de cana-de-açúcar comercial (Brumbley et al., 2006).

Inicialmente se creditou a etiologia do RSD a um vírus, pelo fato do patógeno não ser facilmente cultivado em cultura pura e por ser disseminado rapidamente através dos instrumentos de corte dos colmos. De acordo com Cardoso (1986), extratos de folhas das plantas eram diluídos 25000 vezes e ainda assim infectavam plantas sadias. A doença foi denominada de “Q28 disease” (Brumbley et al., 2006) e as dúvidas em relação ao organismo envolvido perduraram durante muitos anos.

No Brasil, o RSD foi registrado pela primeira vez em 1956, na Estação Experimental de Campos dos Goytacazes, por Frederico Veiga (Segato et al., 2006) que utilizou em plantas sadias o inóculo retirado de plantas mal desenvolvidas, que apresentaram o mesmo mal desenvolvimento no campo (Veiga, 1956).

Apesar de Gilaspie et al. (1973) terem visualizado em microscopia de contraste de fase células bacterianas colhidas do caldo de xilema de plantas de cana doentes, apenas em 1980, Davis et al. (1980) conseguiram isolar Lxx em meio de cultura. Na sequência, prosseguiram com o teste de patogenicidade utilizando oito isolados da bactéria de diferentes países, inclusive do Brasil, evidenciando o mesmo comportamento na variedade CP44-101.

A bactéria inicialmente foi classificada como *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* por Davis et al. (1984) e posteriormente foi reclassificada por Evtushenko et al. (2000) como *L. xyli* subsp. *xyli*. Esta classificação foi confirmada por Young et al. (2006), que trabalharam com 105 isolados realizando análises com os marcadores BOX e ERIC (Brumbley et al., 2006).

O primeiro nome da bactéria foi em homenagem ao primeiro descritor do gênero *Leifsonia*, Einar Leifson que descreveu a *Leifsonia aquatica* (Reddy et al., 1983).

Esta doença é reportada em pelo menos 61 países produtores de cana-de-açúcar no mundo e está distribuída em todos os estados produtores da cultura no Brasil (Tokeshi & Rago, 2005).

3. Etiologia

Leifsonia xyli subsp. *xyli* é uma bactéria Gram-positiva, corineiforme, não móvel, aeróbica obrigatória e restrita ao xilema das plantas. As células bacterianas são bastonetes pleomórficos (Figura 1), medindo de 0,25 - 0,5 μm por 1 - 4 μm , sendo retos ou levemente curvos e ocasionalmente dilatados nas pontas ou no meio (Cardoso, 1986).

O crescimento de Lxx em laboratório ocorre de maneira muito lenta e somente em meios de cultura ricos em nutrientes (Haapalainen et al., 2000), levando de 10 a 15 dias para o aparecimento de colônias e mais de três semanas para o crescimento razoável em meio de cultura líquido. Em meio sólido, as colônias apresentam um aspecto não pigmentado e circular (Davis et al., 1984).

A espécie *L. xyli* compreende duas subespécies: *L. xyli* subsp. *xyli* e *L. xyli* subsp. *cynodontis* (Lxc), sendo ambas patogênicas a gramíneas. No entanto, a Lxx só ataca naturalmente a cana-de-açúcar e sua infecção é assintomática (Haapalainen et al., 2000).

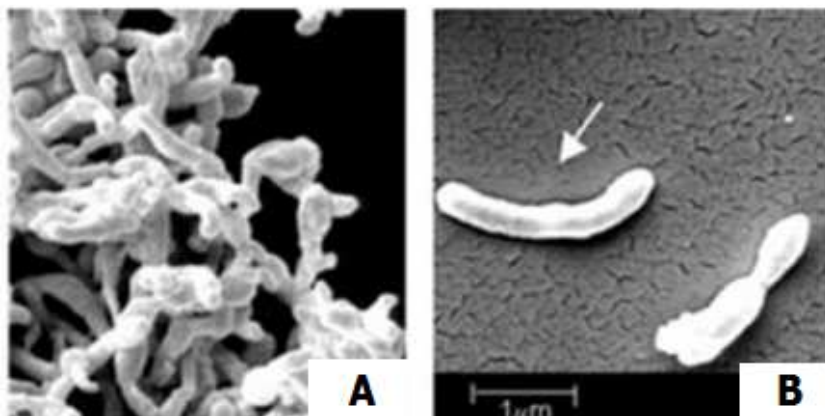


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. A. Aspecto do aglomerado de células bacterianas aumentadas 15000 X; B. Células isoladas, formato corineiforme característico em aumento de 20000 X (Gagliardi, 2003).

O genoma da bactéria é composto por um cromossomo circular com 2,6 milhões de pares de bases. Apresenta 2.351 genes, dos quais 13% (307 genes) são pseudogenes, truncados e incompletos, além de 50 sequências de inserção ao

longo do cromossomo, um *operon* codificante de rRNA e 45 genes codificantes de tRNA (Monteiro-Vitorello, 2004).

Esta bactéria é restrita aos vasos de xilema (Figura 2), se limitando aos elementos dos vasos, parênquimas e lacunas (Kao & Daman Jr., 1980) e em condições de estresse hídrico obstrui a translocação de água e nutrientes para a planta (Teakle et al., 1973).

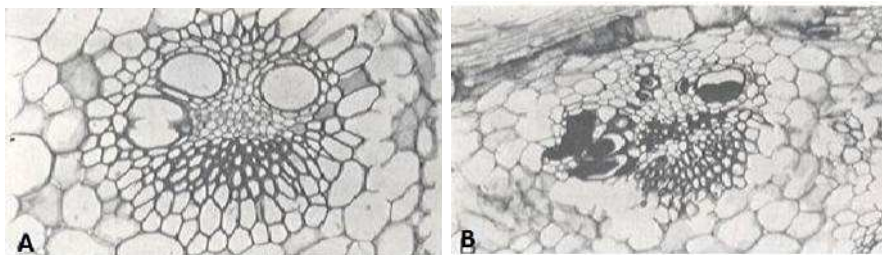


Figura 2. Cortes de uma planta saudável (A) e de uma planta infectada (B) mostrando os vasos do xilema ocupados por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

4. Sintomatologia da RSD

Leifsonia xyli subsp. *xyli* é considerada um patógeno oculto, já que os sintomas provocados em cana-de-açúcar são discretos, quando comparados aos sintomas causados por bactérias necrogênicas (Monteiro-Vitorello et al., 2009).

No Nordeste brasileiro, onde as condições de cultivo da cana-de-açúcar nem sempre são favoráveis ao desenvolvimento da cultura, o RSD pode apresentar maior severidade.

Comumente, plantas doentes apresentam-se raquíticas, com porte reduzido crescimento retardado e encurtamento dos entrenós (Figura 3). Esses sintomas podem ser agravados ou mascarados de acordo com a disponibilidade de água para a planta, idade, genótipo e tipo de solo (Grisham, 2004). Em anos mais secos, é comum observar esse comportamento das plantas, porém na ausência de déficit hídrico, estes sintomas não são facilmente verificáveis (Tokeshi, 1997).

Plantas suscetíveis e maduras podem mostrar internamente algumas pontuações ou vírgulas na região nodal (Figura 4) de coloração laranja claro a vermelho escuro, que corresponde a reação da planta à multiplicação da bactéria em seus tecidos (Metzler et al., 1997; Tokeshi & Rago, 2005). Na realidade, nenhum sintoma interno ou externo de RSD tem poder diagnóstico, por não ser específico para a doença (Comstock et al., 1997).

De maneira geral, os sintomas são mais pronunciados nas socas, onde ocorrem muitas falhas de brotação ou emissão de poucos perfilhos raquíticos, fazendo com que a renovação do canavial ocorra de forma antecipada (Young & Brumbley, 2004). Esse fato foi considerado quando a doença foi denominada como “raquitismo da soqueira” ou “raquitismo das soqueiras”. Adicionalmente, esses sintomas são confundidos com problemas abióticos, dificultando assim o correto diagnóstico correto e causando grandes perdas de produtividade.

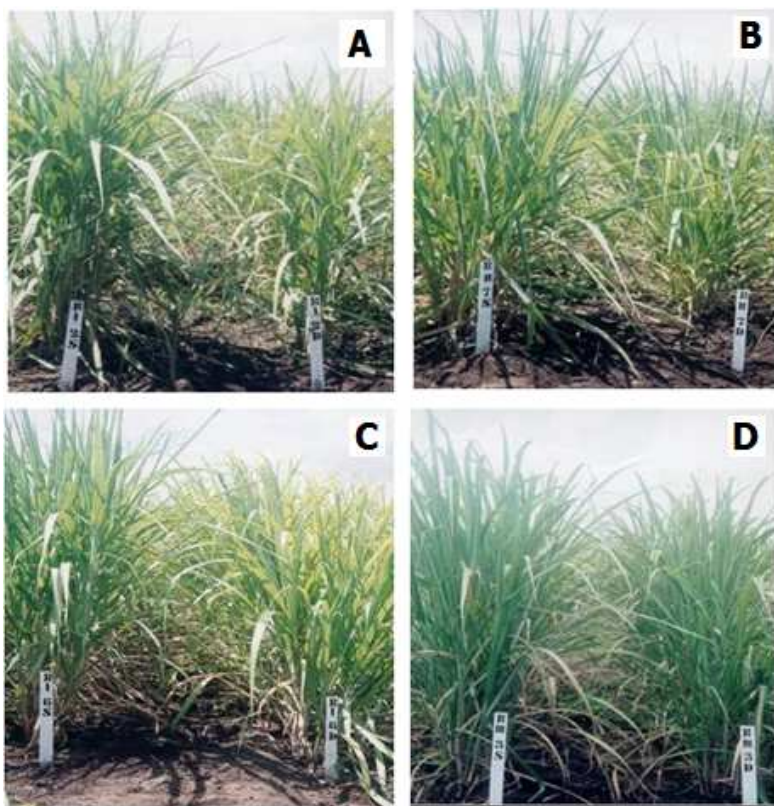


Figura 3. Comparação entre duas plantas em campo mostrando a diferença de desenvolvimento de uma planta sadia (maior porte) e de uma planta infectada por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (planta menos desenvolvida). Os genótipos utilizados para este estudo foram: A. RB763710; B. SP79-1011; C. B8008 e D. SP78-4764 (Chaves et al., 2002).



Figura 4. Pontuações e vírgulas na região nodal de coloração laranja claro a vermelho escuro em colmos maduros, evidenciando a reação da planta à presença da bactéria (Tokeshi, 1983).

5. Importância econômica

RSD é considerada uma das mais graves doenças para a cultura de cana-de-açúcar, senão a mais importante (Davis & Bailey, 2000), causando prejuízos em média de 30% na produtividade, dependendo do genótipo cultivado e condições hídricas, podendo infectar até 100% do canavial (Rossetto & Santiago, 2007). A doença está presente em todas as regiões de cultivo da cana-de-açúcar, sendo uma das mais importantes economicamente no mundo (Davis & Bailey, 2000).

Na Flórida, Dean e Davis (1989) estimaram perdas anuais variando de 5 a 15%, o que representou cerca de US\$ 36,8 milhões na safra 1988-89. Na Austrália estas perdas chegaram a 10 a 20 milhões de dólares no ano, e no Brasil, pesquisas mostram que entre os anos de 1975 até 2005 ocorreram prejuízos de mais de US\$ 2 bilhões no estado de São Paulo pela incidência da bactéria em canaviais (Tokeshi & Rago, 2005).

Em experimento realizado em Macaé-RJ, onde seis variedades de mudas de cana-de-açúcar (CB 46-364, CB 45-3, CB 49-260, CO 421, CP 51-22 e NA 56-79) foram tratadas termicamente e comparadas com mudas inoculadas com Lxx, observaram-se reduções significativas de produtividade variando de 4 a 14 ton/ha (Chagas & Matsuoka, 1988).

Estudos conduzidos por Chaves et al. (2002) mostram diferenças expressivas no desenvolvimento de 10 variedades comerciais de cana-de-açúcar inoculadas com Lxx e plantas sadias (Figura 3), que resultaram em até 25% de perda de produtividade agrícola para plantas com a bacteriose.

Além de reduzir a produtividade agrícola da cana-de-açúcar, o RSD reduz o número de cortes em talhões altamente infectados, pelo comprometimento do crescimento das plantas (Rosa, 2006).

6. Disseminação

A disseminação da Lxx é antrópica, ocorrendo através do corte do canavial, onde a seiva de uma planta infectada entra em contato com plantas saudáveis. De acordo com Davis et al. (1988) populações de Lxx entre 10^5 a 10^9 células/mL no fluido vascular são capazes de disseminar o patógeno através implementos agrícolas, tais como plantadoras, colheitadeiras e facões de corte, por ocasião do plantio e da colheita da cana, aumentando consideravelmente as perdas no campo.

A contaminação de rebolos é a principal forma de disseminação da doença em longas distâncias. Os principais veículos facilitadores desse evento são os implementos agrícolas, veículos de mecanização, além do próprio trabalhador rural. De acordo com Gatti (2008), o trânsito de colmos infectados por carregadores pode ocasionar a infecção de colmos sadios pelo contato com colmos doentes.

Em experimento conduzido na África do Sul, plantas doentes foram cultivadas a 2 m de intervalo de plantas sadias, num campo livre da doença. Na colheita, instrumentos de corte não foram desinfestados e isso causou uma frequência de 63% da doença na socaria (Comstock, 1996 citando Anônimo, 1990/1991).

A simples passagem de uma colheitadeira por touceira infectada pode transmitir Lxx de 4 a pouco mais de 7 m em uma linha de plantio da cana (Hoy, 1999). O advento da intensificação da mecanização agrícola no Nordeste é um fato preocupante para produtores e técnicos do setor sucroalcooleiro em função de um provável aumento das áreas infectadas. A bactéria sobrevive nos tecidos da planta de um ciclo para outro, nas coroas em socaria (Giglioti, 1997).

7. Controle do RSD

A utilização de mudas sadias para o plantio é a forma de controle mais utilizada para o controle do RSD. O tratamento térmico de rebolos deve reunir o binômio temperatura *versus* tempo de forma harmoniosa. Por esta técnica, rebolos são imersos em água quente por determinado tempo, com o objetivo de destruir as proteínas e enzimas da bactéria, sem prejudicar os toletes. Os

tratamentos térmicos mais comuns são o tratamento térmico curto (TTC), 52°C por 30 minutos (Copersucar, 1989) e o tratamento térmico longo (TTL) de 50°C por 2 horas (Damann & Benda, 1983).

Os cuidados com o equilíbrio entre temperatura da água do tanque e tempo de imersão dos rebolos é muito importante, pois os erros decorrentes deste processo incorrem em comprometimento da sanidade do material tratado ou aumento de falhas de brotação das gemas.

Tanto o TTC quanto o TTL não eliminam por completo a bactéria, apresentando “escapes”. Comumente, ocorre a necessidade de realizar novamente o tratamento de rebolos dos viveiros, para que o produtor tenha mais segurança em relação à sanidade do material (Steindl, 1974). O TTC, por ser mais rápido, é mais utilizado nas unidades produtoras de cana-de-açúcar (Benda, 1994).

Apesar da utilização do tratamento térmico ser uma das melhores opções no controle do RSD, esta é uma operação trabalhosa e nem sempre seguida pelos produtores (Fernandes Jr. et al., 2010), principalmente no Nordeste brasileiro, onde a maioria das usinas parece esquecer a necessidade de formação de viveiros com mudas sadias para alavancar a produtividade agrícola e industrial.

Os instrumentos de corte da cana devem ser desinfestados com produtos à base de amônia quaternária, solução de ácido cresílico e etanol 50% (Steindl, 1961; Teakle, 1983; Gillaspie Júnio & Teakle, 1989) ou utilizando o calor pelo método físico (Figura 5).

A desinfecção de lâminas de corte manual ou mecanizado deve ocorrer tanto para áreas de viveiros como também em áreas de plantio comercial. Esta técnica deve ser repetida no mínimo para cada corte de talhão ou lote, ou para cada variedade que estiver sendo colhida dentro dos mesmos.

O uso de mudas meristemáticas ou calos embriogênicos originados de diferenciação celular também pode ser adotada para formação de viveiros em unidades produtoras de cana-de-açúcar (Hoy et al., 2003), porém, o elevado custo das mudas, além dos cuidados com a manutenção de viveiros primários parecem limitar o plantio deste material no campo (Gerald, 1992).

A resistência genética de genótipos ao RSD seria a técnica mais desejada por produtores e pesquisadores do setor canavieiro, porém existe maior dificuldade na seleção de variedades resistentes em função da dificuldade no diagnóstico rápido e eficiente da doença (Comstock & Lentini, 2002).



Figura 5. Adaptações de flambadores para desinfestação de instrumentos de corte através do método físico (calor).

Estudos relacionando o controle biológico através de bactérias endofíticas foram conduzidos por Carneiro Jr. et al. (2006) para avaliar a sanidade e vigor de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar e inoculadas com Lxx em cana planta. Os resultados mostraram que ocorreu uma indução de tolerância ao raquitismo, pois foram observadas reações soropositivas ao patógeno e aumento de produtividade agrícola. A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1, mostrou-se um controlador biológico potencial à colonização de Lxx, baseando-se em evidências indiretas, como no aumento da massa dos colmos e com tendência a maiores rendimentos de produção (Souza, 2012).

8. Diagnóstico do RSD

Na prática, o diagnóstico de RSD não é fácil, em consequência da ausência de sintomas externos específicos (Gagliardi, 2008).

Por esta dificuldade, várias técnicas foram desenvolvidas para diagnosticar a RSD, como microscopia, testes sorológicos, respostas induzidas no hospedeiro e testes baseados na análise do DNA (Dias, 2012). A escolha do método vai

depende de vários fatores como a finalidade e urgência dos resultados, já a sua eficiência é dependente da distribuição e concentração da bactéria na planta (Grisham et al., 2007).

A reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) convencional usando *primers* específicos tem sido o método mais sensível usado na detecção de Lxx (Gao et al., 2008). Grisham et al. (2007) adaptaram essa técnica para quantificação precoce da bactéria em tecidos de folhas de três variedades inoculadas ou não de cana-de-açúcar e com diferentes graus de resistência, com base em *primers* desenhados a partir da região ITS (internal transcribed spacer) do patógeno. O método detectou a bactéria em plantas com três meses de idade após a inoculação. Contudo, a PCR não fornece uma estimativa precisa da quantidade da bactéria presente no material analisado e necessita da visualização de amplicons em gel de agarose. Os autores também analisaram as mesmas amostras por TB-EIA (tissue blot enzyme immunoassay) e concluíram que esse teste só foi capaz de detectar a bactéria após a formação de colmos maduros, cerca de sete meses após o plantio.

Ao contrário, a PCR em tempo real, apresenta alta sensibilidade, o que permite quantificar o patógeno em material vegetal com base na relação entre valores de Ct (ciclo limite, ou threshold) e de quantidades conhecidas de massa de DNA do organismo alvo (D'Haene et al., 2010).

Carvalho (2012) desenvolveu um protocolo para detecção e quantificação de Lxx por PCR quantitativo em tempo real e avaliou a bactéria em plântulas de duas variedades inoculadas, baseadas em *primers* concebidos a partir de sequências genômicas únicas da bactéria. O resultado do ensaio de detecção e monitoramento em planta mostrou-se eficiente e específico em detectar precocemente o patógeno em amostras com baixo título bacteriano, principalmente por se tratar de uma bactéria fastidiosa e de difícil diagnose.

O Dot-Blot EIA (dot-blot enzyme immunoassay) (Harisson & Davis, 1986) é uma técnica sorológica de detecção do patógeno em amostras de seiva do xilema muito utilizada em levantamentos da doença em canaviais por todo Brasil (Chaves et al., 2002; Gagliardi, 2008; Ponte, 2006; Souza, 2011). O nível de detecção deste método foi estimado em 2×10^6 células bacterianas/mL⁻¹. É considerada uma técnica relativamente acessível em termos de custo, além de apresentar a vantagem de conferir resultados rápidos e diretos, sem a necessidade de equipamentos especiais. Esta é uma técnica que apresenta sensibilidade suficiente para orientar produtores e técnicos para a necessidade do tratamento térmico do material propagativo, mesmo sendo menos sensível quando comparada com a imunofluorescência e ao PCR (Carneiro Júnior et al., 2004).

Segundo Davis et al. (1988), populações de Lxx entre 10^5 a 10^9 células bacterianas/mL no fluido vascular são determinantes para a disseminação do patógeno em canaviais, aumentando as perdas agrícolas. Existe uma relação entre a concentração da bactéria nos vasos de xilema e o comportamento de resistência ou suscetibilidade do genótipo no campo (Harrison e Davis, 1988), fato que motiva a aplicação de técnicas para diagnósticos por pesquisadores, com a finalidade de gerar recomendações de manejos varietais adequados e instalação de viveiros para produção de muda sadia.

9. Análise de levantamentos do RSD em estados nordestinos e do centro-sul do Brasil

Apesar do raquitismo da soqueira ser considerada por muitos pesquisadores como a doença que causa mais problemas à cultura da cana-de-açúcar, os levantamentos para detecção da bactéria em plantios comerciais e em viveiros ainda é pouco realizado em muitas regiões canavieiras no Brasil.

Em pesquisa realizada no Nordeste, Chaves et al. (2002) constataram altos índices de infecção por Lxx em cana-planta, nas variedades SP77-5181 (52%) e SP79-1011 (18%) em canaviais pernambucanos. Neste mesmo estudo, variedades comerciais mais utilizadas na época também apresentaram comportamento semelhante em áreas cultivadas no estado do Rio Grande do Norte. Os genótipos SP70-1143 e SP79-1011 apresentaram infecção de 12 e 11%, respectivamente, quando analisadas pela técnica de Dot Blot EIA. De acordo com Sanguino (1998) a cada 1% de infecção bacteriana ocorre comprometimento de 0,4% da produtividade agrícola do canavial.

Altos índices de infecção bacteriana foram novamente registrados na variedade SP77-5181 (23%) em plantios de cana-de-açúcar no noroeste do Paraná (Marcuz et al., 20009), corroborando com os estudos citados anteriormente.

Gagliardi & Aranha (2009) comparando seis variedades de cana-de-açúcar por 3 cortes, inoculadas com diferentes concentrações de células bacterianas e suas respectivas testemunhas, observou que RB867515 apresentou diminuição de produtividade em torno de 26% por ocasião da última colheita. Esta é a variedade de cana-de-açúcar mais plantada no Brasil, comumente resistente a muitas das doenças incidentes na cultura, inclusive à ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*) que chegou recentemente aos canaviais brasileiros. Este fato

remete à necessidade de cada vez mais serem utilizados viveiros com mudas sadias nas unidades produtoras.

Levantamentos mais recentes e ainda não publicados, conduzidos pela Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina, coordenados pela presente equipe mostram que na Paraíba, das 58 áreas de cultivo da cana-de-açúcar 57% estavam acometidas pelo raquitismo da soqueira. Dentre os genótipos que foram avaliados, destacam-se RB867515 que chegou a apresentar em algumas amostragens 12% de Lxx, RB92579 com 11% e RB863129 com 9% da bactéria no caldo de xilema. O diagnóstico da doença foi realizado através da técnica de Dot Blot EIA. Estas variedades são bem consideradas nos plantios comerciais de cana-de-açúcar no Nordeste nas últimas safras.

Ponte et al. (2010) avaliaram a incidência da bactéria em áreas de multiplicação da cana na região do Espírito Santo, oeste mineiro e sul da Bahia, por dois anos, por meio de detecção sorológica e constataram que em 2003, pouco mais de 65% dos talhões amostrados estavam infectados com Lxx. Os autores observaram ainda que a incidência média aumentou de cana planta (4,8%) para a cana de quinto corte (10,3%). No ano seguinte, 70% dos talhões amostrados apresentaram reações positivas a Lxx e com maior incidência média em cana-planta (18%), confirmando que o material propagativo utilizado na renovação dos talhões amostrados foi obtido de campos comerciais com alta incidência da bactéria.

10. Bibliografia

- BARNES, A. C. **The sugar cane**. New York: The New York Interscience Publishers, 1964. 456 p.
- BENDA G. T. A. Serial hot-water treatment for sugarcane disease control. In: RAO, G. P.; GILLASPIE JR, A. G.; UPADHYAYA, P. P.; BERGAMIN FILHO, A.; AGNIHOTRI, V. P.; CHEN, C. T. (Eds.). **Current trends in sugarcane pathology**. New Delhi: International Books and Periodicals Supply Service, 1994. p. 297-310.
- BRUMBLEY, S. M.; PETRASOVITS, L. A.; HERMANN, S. P.; YOUNG, A. J.; CROFT, B. J. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, p. 681-689, 2006.
- CARDOSO, C. O. M. **Isolamento da bactéria do raquitismo (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) no Brasil**. Piracicaba: Copersucar, 1986. 55 p. (Boletim Técnico, 34).
- CARNEIRO JUNIOR, J. B.; SILVEIRA, S. F.; PONTE, E. C. Sanidade e vigor de mudas de cana-de-açúcar infectadas por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e tratadas por termoterapia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 183, 2006.
- CARVALHO, G. **Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras**. 2012, 144f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- CHAGAS, P. R. R.; MATSUOKA, S. Medidas de controle do raquitismo da soqueira. **Brasil Açucareiro**, v. 106, p. 40-44, 1988.

- CHAVES, A., PEDROSA, E. M. R., CAVALCANTE, J. F. D., ARAÚJO, C. F. S., FERREIRA, G. E. (2002) Comportamento de variedades comerciais de cana-de-açúcar em relação ao raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) na região Nordeste do Brasil – avaliações em cana-planta. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 8. 2002. Recife, **Resumos ...** Recife: Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcoleiros do Brasil, 2002. p. 27-34.
- COMSTOCK, J. C.; LENTINI, R. S. **Sugarcane mosaic virus disease**. Gainesville: Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2002. 23 p.
- COMSTOCK, J. C.; PERDOMO, R.; POWELL, G.; WANG, Z. Ratoon stunting disease in Florida sugarcane fields: relationship between disease incidence and cultivar resistance. **Journal American of Sugarcane Technologists**, v. 17, p. 95-101, 1997.
- COMSTOCK, J. C.; SHINE, J. M.; DAVIS, M. J.; DEAN, J. L. Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* colonization in sugarcane and spread of ratoon stunting disease in the field. **Plant Disease**, v. 80, p. 704-708, 1996.
- CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra agrícola: cana-de-açúcar**. v. 3, n.1. - Safra 2016/17. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf. Acesso em: 24 abr 2016.
- COPERSUCAR. Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas. **Cadernos COPERSUCAR**, v. 25. p. 1-5, 1989.
- DAMANN JR, K. E.; BENDA, G. T. A. Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. **Plant Disease**, v. 67, p. 966-967, 1983.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE, A. G.; VIDAVER, A. K.; HARRIS, R. W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal Sys Bacteriology**, v. 34, p. 107-117, 1984.
- DAVIS, M. J.; BAILEY, R. A. Ratoon stunting. In: ROTT, P., BAILEY, R.A., COMSTOCK, J.C., CROFT, B.J., SAUMTALLY, A.S. (Eds.). **a guide to sugarcane diseases**. Montpellier: Centre de Cooperation International en Recherche Agronomique Pour Le Development (CIRAD) and International Society of Sugar Cane Technologists (ISSCT), 2000. p. 49-54.
- DAVIS, M. J.; DEAN, J. L.; HARISON, N. A. Quantitative variability of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* populations in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, v. 78, p. 462-468, 1988.
- DAVIS, M. J.; PURCEL, A. H.; THOMSON, S. V. Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v. 70, p. 425-429, 1980.
- DEAN, J. L.; DAVIS, M. J. Yield losses caused by ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. **Journal of the American Society of Sugarcane Technologists**, v. 10, p. 66-72, 1989.
- D'HAENE, B.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. **Methods**, v. 50, p. 262-70, 2010.
- DIAS, V. D. **Otimização da detecção de raquitismo da soqueira e escaldadura das folhas em cana-de-açúcar utilizando PCR**. 2012, 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- EVTUSHENKO, L. I., DOROFFEVA, L. V.; SUBBOTIN, S. A.; COLE, J. R.; TIEDJE, J. M. *Leifsonia poae* gen. nov.; sp. nov.; isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of *Corynebacterium aquaticum* leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex *Leifson* 1962) gen. nov.; nom. rev.; comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* Davis et al., 1984 gen. nov.; comb. nov. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 371-380, 2000.
- FAPESP (2000) Caderno Ciências: achados preciosos, n. 52. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2000/04/01/achados-preciosos/>. Acesso em 29 abr 2016.

- FERNANDES JR, A. R.; GANEM JR, E. J.; MARCHETTI, L. B. L. URASHIMA, A. S. Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 1, p.060-064, 2010.
- FERNANDES, A. J. **Manual da cana-de-açúcar**. São Paulo: Livroceres, 1990. 196 p.
- GAGLIARDI, P. R. **Avaliação da resistência à *Leifsonia xyl* subsp *xyl*, agente causal do raquitismo-da-soqueira (RSD), em variedades comerciais de cana-de-açúcar**. 2008, 119f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- GAGLIARDI, P. R.; CAMARGO, L. E. A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1222-1226, 2009.
- GAO, S. J.; PAN Y. B.; CHEN, R. K.; CHEN, P. H.; ZHANG, H.; XU, L. P. Quick detection of *Leifsonia xyl* subsp. *xyl* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyl* subsp. *xyl* isolates. **Sugar Technology**. v. 10, p. 334-340. 2008.
- GATTI, I. M. Doenças causadas por bactéria. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: EMOPI, 2008. 450 p.
- GERALD, L. T. S. Biofábrica de cana-de-açúcar. **Álcool & Açúcar**, v. 63, p. 26-32, 1992.
- GIGLIOTI, E. A. **Método conciliado para avaliar os efeitos da colonização de colmos de cana-de-açúcar por *Clavibacter xyl* subsp. *xyl* na funcionalidade do xilema**. 1997, 134f. Tese (Doutorado na área de Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- GILLASPIE, A. G.; DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F. Diagnosis of ratoon stunting disease based on presence of a specific microorganism. **Plant Disease Reporter**, v. 60, p. 573-576, 1973.
- GILLASPIE JR., A. G.; TEAKLE, D. S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B. T.; GILLASPIE JUNIOR, A. G. (Eds.). **Diseases of sugarcane: major diseases**. Amsterdam: Elsevier Science, 1989. p. 59-80.
- GRISHAM, M. P.; PAN, Y. B.; RICHARD, E. P. Early detection of *Leifsonia xyl* subsp. *xyl* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v. 91, p. 430-34, 2007.
- GRISHAM, M. P. Ratoon stunting disease. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. (Eds.). **Sugarcane Pathology**. Vol. III. Bacterial and nematodes diseases. Enfield NH. Science Publishers, 2004. p. 77-96.
- HAAPALAINEN, M.; MATTINEN, J.; METZLER, M. C. The growth of a plant-parasitic bacterium, *Clavibacter xyl* subsp. *cynodontis*, is enhanced by xylem fluid components. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p. 147-55, 2000.
- HARRISON, N. A.; DAVIS, M. J. Infectivity titrations of *Clavibacter xyl* subsp. *xyl* and sugarcane cultivar differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Plant Disease**, v. 70, p. 556-558, 1986.
- HOY, J. W.; BISCHOFF, K. P.; MILLIGAN S. B. ; GRAVOIS, K. A. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. **Euphytica**, v. 129, p. 237-240, 2003.
- HOY, J. W.; GRISHAM, M. P.; DAMANN, K. E., Jr. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant Disease**, v. 83, p. 1170-1175, 1999.
- METZLER, M. C.; LAINE, M. J.; DE BOER, S.H. The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. **Fems Microbiology Letters**, v.150. p. 1-8, 1997.
- MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; ZERILLO, M. M.; VAN SLUYS, M. A.; CAMARGO, L. E. A. Genome sequence – based insights into the biology of the sugarcane pathogen *Leifsonia xyl* subsp. *xyl* In: ROBERT, W. (Ed.). **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology**. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. p. 135-146. 2009.
- PONTE, E. C. **Incidência de *Leifsonia xyl* subsp. *xyl* em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar no Espírito Santo, sul da Bahia e oeste mineiro e determinação do tamanho da amostra para detecção sorológica**. 2006, 52f. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Darcy Ribeiro.
- PONTE, E. C.; SILVEIRA, S.F.; CARNEIRO JR, J. B.; LIMA, R.M.P. Incidência de *Leifsonia xyl* subsp. *xyl* em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar no Espírito Santo, sul da Bahia e oeste de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, v. 36, p. 4-6, 2010.

- REDDY, G. S. N.; PRABAGARAN, S. R.; SHIVAJI, S. *Leifsonia pindariensis* sp. nov., isolated from the *Pindari glacier* of the Indian Himalayas, and emended description of the genus *Leifsonia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2229–2234, 2008.
- ROSA, D. D. **Uma abordagem genômica para o entendimento do crescimento fastidioso de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***. 2006. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. Cana-de-açúcar: doenças. 2007. Disponível em: http://www.agencia.cnpia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_55_711200516718.html. Acesso em: 25 abr 2016.
- SANGUINO, A. Situação atual da pesquisa em doenças da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 90-91, 1998.
- SEGATO, S. V.; SENE PINTO, A.; JENDIROBA, E.; NOBREGA, J. C. N. (Orgs.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: ESALQ-USP, 2006. 415 p.
- SOUZA, S. R. **Reação de genótipos de cana-de-açúcar ao raquitismo da soqueira (*Leifsonia xily* subsp. *xyli*), métodos de detecção e efeito de bactérias diazotróficas**. 2011, 141f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- STEINDL, D. R. L. Q. 28 Disease. **Cane Growers Quarterly Bulletin**, v. 12, p. 191-193, 1949.
- STEINDL, D. R. L. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J. P.; ABBOTT, E. V.; HUGUES, C. G. (Eds.). **Sugar cane disease of the world**. Amsterdam: Elsevier, 1961. p. 433-459.
- TEAKLE, D. S. The sugarcane ratoon stunting disease bacterium. In: FAHY, P. C.; PERSLEY, G. J. (Eds.). **Plant bacterial diseases: a diagnostic guide**. North Ryde: Academic Press, 1983. p. 247-257.
- TEAKLE, D. S.; SMITH, P. M.; STEINDL, D. R. L. Association of a small coryneform bacterium with the ratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 24, p. 869-874. 1973.
- TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1997. v.2, p. 207-225.
- TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 185-196.
- VEIGA, F. M. Notas sobre o raquitismo das socas em Campos. **Brasil Açucareiro**, v. 1, p.81-83, 1946.
- YOUNG, A. J.; PETRASOVITS, L. A.; CROFT, B. J.; GILLINGS, M.; BRUMBLEY, S.M. Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane (*Saccharum* interspecific hybrids). **Australasian Plant Pathology**, v. 35, 503–511, 2006.
- YOUNG, A.; BRUMBLEY, S. Ratoon stunting disease of sugarcane: history, management and current research. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. (Eds.). **Sugarcane Pathology**. Vol. III. Bacterial and nematodes diseases. Enfield: NH. Science Publishers, 2004. p. 97-124.

Bactérias Fitopatogênicas Emergentes no Brasil

Ana Rosa Peixoto
Meridiana Lima Araújo Gonçalves
Myrzânia de Lira Guerra
Gabriela Pinto Sá
Jéssica Bezerra
Tháísa Nóbrega

1. Introdução

Bactérias fitopatogênicas são responsáveis por perdas econômicas significativas em culturas lenhosas, plantas hortícolas e ornamentais. São denominadas como emergentes aquelas que são detectadas apenas em determinadas áreas e no âmbito de programas de erradicação, em diferentes regiões (Lopez, 2010).

A história da patologia vegetal está intimamente ligada a doenças de plantas por ter mudado o curso da história humana. A falta da batata na Irlanda devido a requeima resultou na fome e morte de milhões de pessoas e uma das migrações humanas mais influentes na história. Outras doenças de plantas têm impactado na qualidade de vida nas inúmeras formas. O advento de fungicidas, o uso de sementes saudáveis, a resistência do hospedeiro, e o desenvolvimento de um grande número de outras técnicas, tem diminuído o impacto de doenças de plantas. No entanto, impressionantes avanços nos meios de transportes rápidos não só aumentaram o comércio mundial e a migração humana, mas também aumentaram o risco para invasões antrópicas de patógenos de plantas. Como consequência, e possivelmente agravada pela mudança do clima, muitas doenças

contemporâneas estão emergindo como ameaças à moderna agricultura e à segurança alimentar. Estas doenças não só são emergentes e importantes na produção mundial de culturas, mas também representam riscos graves a nível local, especialmente em pequenas propriedades nos países em desenvolvimento (Subbarao et al., 2015). Nesse contexto, a presente revisão teve o objetivo de relatar algumas bacterioses emergentes de importância econômica ocorrentes no Brasil.

2. Clorose variegada dos citrus - *Xylella fastidiosa*

A bactéria *X. fastidiosa* (Wells et al.) tem se tornado umas das bactérias fitopatogênicas mais importantes para agricultura, sobretudo no Brasil, onde tem causado doenças em culturas de valor econômico representativo ao país, a exemplo do café (*Coffea arábica* L.) e citrus (*Citrus aurantium* var. *dulcis* L.), tendo sido detectada pela primeira vez em 1987 nos estados de Minas Gerais e São Paulo, ocasionando uma doença denominada de Clorose Variegada dos Citrus (CVC) (Rossetti et al., 1990). Posteriormente, foi relatada no Nordeste do Brasil, no ano de 1996 em pomares do município de Boquim em Sergipe e no ano seguinte, na Bahia em pomares comerciais de laranja doce nos municípios de Rio Real e Itapicuru (Miranda et al., 2009; Santos Filho et al., 2010).

Plantas de citrus afetadas pela CVC apresentam clorose foliar semelhante à deficiência de zinco, que se inicia na parte superior da copa (Figura 1A). Na face abaxial das folhas, correspondentes às manchas cloróticas da face adaxial, desenvolvem-se pontuações pequenas, de cor marrom claro, que podem se tornar marrom escuro ou mesmo necróticas (Lee et al., 1991). A doença causa redução do tamanho dos frutos, casca endurecida, maturação precoce, ocorrendo em pencas de 4 a 10 frutos, o que é atípico.

Xylella fastidiosa é uma bactéria Gram-negativa, fastidiosa, habitante nos vasos do xilema e que geralmente possuem células em forma de bastonetes e com parede celular ligeiramente ondulada. Suas células possuem em torno de 0,2 a 0,5 µm diâmetro por 1 a 4 µm de comprimento. O crescimento da planta é mais lento, ocasionando morte dos ponteiros e queda das folhas (Agrios, 2005). Após penetrar em seu hospedeiro, espalha-se sistemicamente pelos tecidos vasculares xilemáticos, podendo causar doenças e perdas econômicas em várias espécies de plantas cultivadas. Atualmente, a distribuição desta bactéria no mundo vai desde o continente americano (Hopkins & Purcell, 2002), até o continente europeu, visto que recentemente, em outubro de 2013 foi diagnosticado *X. fastidiosa* como agente patogênico em oliveiras no sul da Itália, identificando-se a estirpe

CoDiRO (*X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. Schaad) como a responsável pela doença – “*Complesso Del disseccamento rápido dell’olivo* ” (CoDiRO) (Carlucci et al., 2013; Pereira, 2015). Segundo a EFSA (2015), mais de 8.000 ha de oliveiras foram destruídos, e quase 21.000 ha estão em quarentena.

No Brasil, a doença afeta culturas de interesse comercial, como ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.), laranjeira (*Citrus sinensis* L.) e cafeeiro (Chang et al., 1993; French & Kitajima, 1978; Paradela Filho et al., 1995); plantas daninhas como o apaga-fogo (*Alternanthera tenella* Colla), braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf. Prain.), capim-colchão (*Digitaria horizontalis* Willd), entre outros (Lopes et al., 1999), além das plantas ornamentais vinca (*Catharanthus roseus* L.) e o hibisco (*Hibiscus schizopetalus* (Dyer) Hook.) (Ueno et al., 1998).

Em condições de campo, *X. fastidiosa* pode ser transmitida planta a planta apenas por meio dos insetos vetores, famílias Cercopidae e Cicadellidae (subfamília Cicadellinae), ou ainda, através de uso de material vegetativo infectado (Agrios 2005; Lopes, 1999), sendo um fator importante, sobretudo, na dispersão a longas distâncias.

Atualmente são propostas cinco subespécies de *X. fastidiosa* intimamente relacionadas ao tipo de hospedeiro que colonizam, sendo elas: *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* e *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Schaad et al., 2004), *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* (Schuenzel et al., 2005) e *X. fastidiosa* subsp. *tashke* (Randall et al., 2009).

Diversos trabalhos concluíram que a técnica de PCR, ao se comparar com os demais métodos, é sempre a mais eficiente, na precisão da diagnose, principalmente, devido a sua capacidade de detectar a presença da bactéria mesmo quando em baixas concentrações na planta (10^2 a 10^3 bactérias/mL), o que permite a detecção mesmo em plantas assintomáticas, com um diagnóstico relativamente rápido e seguro, sem a presença de reações inespecíficas, sendo, portanto, mais sensíveis que os sorológicos (Minsanvage et al., 1994; Nunes et al., 2006).

No Brasil, o manejo é feito quase que exclusivamente por meio da poda dos ramos sintomáticos, uso de material vegetativo sadio com certificação e, sobretudo controle de insetos vetores. Uso de clones e ou/variedades tolerantes a *X. fastidiosa* em citrus, como algumas espécies de limoeiro Taiti a Tangerina (Silva, 2013).

3. Cancro bacteriano da videira – *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

O cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* Nayudu (Dye), é uma das mais importantes enfermidades na região Nordeste do Brasil, sendo responsável por danos severos e representando alto potencial de risco ao desenvolvimento da viticultura nacional. Sua ocorrência está limitada aparentemente ao Brasil (Lima et al., 1999; Malavolta Jr et al., 1999), Índia (Nayudu, 1972) e Tailândia (Buensanteai, 2004). No Brasil, foi, primeiramente, relatado em 1998 nos estados da Bahia, Pernambuco e Piauí (Lima et al., 1999) sendo, posteriormente, observado no Ceará (Freire & Oliveira, 2001), Goiás (Junqueira et al., 2006), Minas Gerais (Junqueira et al., 2006; Marques, 2007), Paraná (Tomaz et al., 2011), Roraima (Halfeld-Vieira & Nechet, 2006) e São Paulo (Rodrigues Neto et al., 2011). No entanto, a doença foi erradicada da maioria desses estados, estando presente atualmente apenas na Bahia, Ceará, Pernambuco e Roraima (Instrução Normativa N° 59/2013; Brasil, 2013).

O patógeno apresenta células em forma de bastonetes Gram-negativos, medindo 0,6 x 1,2-2,5 μm , não encapsulados e possuem um flagelo polar. Produz colônias arredondadas, brilhantes com bordos lisos e de coloração esbranquiçada em meio ágar-nutritivo, devido a não produção de xantomonadina (pigmento característico das bactérias do gênero *Xanthomonas*) (Chand & Kishum, 1990; Nayudu, 1972). Seu crescimento ótimo em meio de cultura ocorre entre 27 e 29 °C, pH 7,5 e concentração de até 3% de NaCl (Nascimento et al., 2005).

Em plantas infectadas, os sintomas manifestam-se, inicialmente, nas folhas, como pontos necróticos de 1 a 2 mm de diâmetro, com ou sem halos amarelados, podendo aparecer próximos às nervuras ou espaçados na superfície foliar e evoluem para manchas angulares escuras, que coalescendo causam crestamento e morte de extensas áreas do limbo foliar (Figura 1B). Nas nervuras e pecíolos das folhas, ramos e ráquis dos frutos, formam-se manchas escuras alongadas, conhecidas como cancos. As bagas são desuniformes em tamanho e cor, podendo apresentar lesões necróticas. Alcançando o sistema vascular da planta, a bactéria assume caráter sistêmico (Lima et al, 2009; Lopes, 2006; Nascimento et al., 2000; Nayudu, 1972).

A disseminação do patógeno ocorre a partir de restos culturais de videira infectados presentes nos parreirais, que podem ser transportados em veículos, contentores e aderidos a roupas. As operações de desbaste, desbrota, poda, torção de ramos e raleio de cachos também disseminam as bactérias devido às injúrias

causadas às plantas (Araújo, 2001; Lopes, 2006). Após a penetração, a bactéria se multiplica rapidamente, colonizando os espaços intercelulares e atingindo o sistema vascular, sendo transmitida a todos os órgãos da planta (Nascimento & Mariano, 2004). A irrigação também atua disseminando a bactéria, por meio dos respingos. A longa distância, *X. campestris* pv. *viticola* também pode ser disseminada pela aquisição de mudas ou bacelos infectados (Araújo, 2001).

A bactéria tem a capacidade de sobreviver de um ciclo para outro em videiras, bacelos e mudas infectadas, epifiticamente em folhas e ramos de videiras assintomáticas (Araújo, 2001), em restos culturais (Nascimento et al., 2000; Silva et al., 2012), e em hospedeiras alternativas (Peixoto et al., 2007; Santos et al., 2014a).

A detecção e identificação de isolados de *X. campestris* pv. *viticola* pode ser realizada por meio de testes sorológicos e moleculares. Araújo et al. (2005) produziram dois anticorpos policlonais (AC 4558 e AC 4560) com limite de detecção até 10^4 UFC ml⁻¹, os quais podem ser utilizados por meio do teste ELISA direto. Por meios moleculares, destaca-se o PCR, com os primers Xcv1F/Xcv3R e RST2/Xcv3R, os quais amplificam fragmentos de 243 e 340, pb do gene *hrpB*, respectivamente (Trindade et al., 2007). Análises realizadas por meio de rep-PCR, indicaram a existência de variabilidade genética entre isolados de *X. campestris* pv. *viticola* coletados nos estados da Bahia, Pernambuco, Piauí e Minas Gerais (Marques et al., 2007; Trindade et al., 2005).

O manejo do cancro bacteriano da videira deve ser realizado por meio da desinfestação de veículos, máquinas, implementos, equipamentos e material de colheita, meio destruição de material contaminado, controle químico com produtos recomendados pela pesquisa, eliminação de hospedeiras alternativas da bactéria, bem como, através da eliminação de plantas com sintomas e das circunvizinhas, incluindo as raízes (Normativa nº 9/2006; Brasil, 2006). Estudos recentes realizados por Santos et al., (2014b) sugerem que o uso do óleo de *Lippia gracilis* Schauer tem potencial para redução do crescimento *in vitro* de *X. campestris* pv. *viticola* e pode ser uma alternativa no manejo integrado do cancro bacteriano da videira. Já Lima et al., (2016) testando a ação de indutores de resistência em mudas de videiras inoculadas com *X. campestris* pv. *viticola*, observaram que mudas tratadas com acibenzolar-S-methyl apresentaram significativa redução nas variáveis epidemiológicas da doença.

4. Camisa d'água e podridão-aquosa em cebola – *Burkholderia cepacia* e *B. gladioli*

As espécies do gênero *Burkholderia* têm ampla versatilidade nutricional, são capazes de metabolizar mais de 200 diferentes fontes orgânicas de carbono, sendo isolados da rizosfera de inúmeras culturas agrícolas, da água (incluindo água do mar), de solos, de hospitais, além de várias espécies de plantas, animais e humanos (Parke & Gurian-Sherman, 2001). Estas bactérias também já foram usadas no manejo agrícola (Holmes et al., 1998), para o biocontrole (Meyer et al., 2001) biodegradação e biorremediação (Adjei & Ohta, 1999) e promoção do crescimento da planta (Perin et al., 2006; Santos et al., 2001).

Vandamme et al. (1997), demonstraram que diversos isolados da espécie padrão do gênero, *Burkholderia cepacia* (Palleroni e Holmes) Yabuuchi et al., possuíam um pequeno grau de hibridização de DNA-DNA, muitas vezes abaixo de 30%. Assim, ficou estabelecido que isolados inicialmente classificados como uma única espécie poderia pertencer a espécies filogeneticamente distintas, mas com grande semelhança fenotípica. A aquisição de DNA exógeno no genoma de quase todas as espécies de *Burkholderia* é uma das características inerentes, muito rápida e evolutiva, com quase 10% do seu genoma constituído de ilhas genômicas. A quantidade de genes em plasmídeos, sequências de inserção e bacteriófagos resulta na contribuição da plasticidade genotípica e diversidade do genoma no gênero *Burkholderia*, isto por sua vez promove uma extensa variabilidade genética e fisiológica (Lessie et al., 1996; Mahahenthiralingam & Drevinek, 2006; Tiyo, 2015).

O gênero *Burkholderia* compreende bactérias Gram-negativas, com formato de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, apresentam reação positiva para a catalase, possuem um único flagelo polar ou um tufo de flagelos polares de acordo com a espécie, são mesófilas e não esporuladas, e seu metabolismo é aeróbico (Cruz, 2014; Mano, 2011).

O grupo de *Burkholderia* tem recebido uma atenção especial devido à formação de um complexo de espécies, comumente chamado de complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) e que é atualmente constituído por 18 espécies (ou genomovares) estreitamente relacionadas (Coenye et al., 2001), sendo elas: *Burkholderia ambifaria* Palleroni & Homes (Coenye), *B. anthina* Palleroni & Homes (Vanlaere et al.), *B. arboris* Vanlaere et al., *B. cepacia*, *B. cenocepacia* Vanlaere et al., *B. contaminans* Vanlaere et al., *B. diffusa* Vanlaere et al., *B. dolosa* Vemis et al., *B. lata* Vanlaere et al., *B. latens* Vanlaere et al., *B. metallica* Vanlaere et al., *B. multivorans* Vandamme et al., *B. pyrrocinia* Vandamme et al.,

B. seminalis Vanlaere et al., *B. stabilis* Vandamme et al., *B. ubonensis* Yabuuchi et al., *B. vietnamiensis* Gillis et al. (Coenye et al., 2001; Mahenthiralingam et al., 2005; Torbeck et al., 2011; Vanlaere et al., 2008; 2009; Vermis et al., 2006). Existem fortes evidências de que membros do CBC habitam comensalmente em plantas, numa íntima associação com as raízes, consequente uma das bactérias mais predominantes na raiz e na rizosfera (Bredja et al., 1994; Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Nacamulli et al., 1997; Tiyo, 2015).

Dentre as espécies do gênero *Burkholderia* que afetam as plantas destacam-se: *B. cepacia* e *B. gladioli* (Burkholder) Young et al. A espécie *B. cepacia* causa a camisa d'água em bulbos de cebola, os quais exalam, normalmente, um odor avinagrado. Os sintomas são visualizados nas escamas mais externas dos bulbos de cebola deixando aparência úmida e cor amarelada (Figura 1C). Esta doença pode ocorrer no campo, contudo constata-se uma maior presença dos sintomas após a colheita (Wordell Filho et al., 2006). *B. gladioli* causa a podridão aquosa da escama escorregadia, a qual ocorre nas escamas mais internas ou no centro do bulbo (Figura 1D), expelindo odor sulfuroso. Os sintomas podem ocorrer de forma variável em seus hospedeiros incluindo degeneração do tecido, lesões enegrecidas, manchas cloróticas, necrose com ou sem encharcamento, resultando no comprometimento de órgãos e até morte da planta. A podridão aquosa começa no campo, próximo à colheita, sendo mais frequente em plantas danificadas por chuvas, pelo vento e granizo na colheita. A disseminação das bactérias pode ocorrer pelo transporte de bulbos infectados, água de irrigação ou pelos salpicos da chuva. A adubação nitrogenada tardia favorece o desenvolvimento das bacterioses (Wordell Filho et al., 2006).

Para o manejo das doenças, Romeiro (2005) e Reis et al. (2015) recomendam o uso de bulbos e sementes sadias; evitar umidade excessiva no solo; utilizar implementos agrícolas desinfestados; rotação com espécies de outras famílias botânicas; controle de insetos; evitar fermentos nas plantas durante os tratos culturais; eliminar as plantas com sintomas no campo e descartar bulbos colhidos que pareçam infectados; colher os bulbos somente no estágio de maturação correto; armazenar os bulbos em baixas temperaturas, com baixa umidade do ar e em locais aerados.

5. Mancha angular em mangueira – *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae*

Doidge (1915) relatou a primeira ocorrência da mancha angular em mangueiras na África do Sul, o qual isolou uma bactéria pigmentada (amarela) e descreveu o patógeno como *Bacillus mangiferae*. Posteriormente, a doença foi constatada na Austrália, Brasil, Emirados Árabes Unidos, Filipinas, Estados Unidos, Ilhas Comores, Ilhas Maurício, Ilhas Reunião, Índia, Japão, Malásia, Nova Caledônia, Paquistão, Quênia, Tailândia, Taiwan (Gagnevin & Pruvost, 2001), Benin (Afounda et al., 2013), Burkina Faso (Zombre et al., 2016), Gana (Pruvost et al., 2011), Mianmar (Ah-You et al., 2007b) e República do Mali (Pruvost et al., 2012). Adicionalmente, a mancha angular da mangueira está presente em toda região sul e leste do continente africano bem como na maioria das regiões asiáticas (Gagnevin & Pruvost, 2001).

Robbs (1955) fez o primeiro registro desta enfermidade no Brasil, no Distrito Federal, embora, o referido autor não deixasse claro o hospedeiro, fazendo parecer que a ocorrência do patógeno naquela região estava associada à mangueira (Ah-You et al., 2007).

No Nordeste, a primeira ocorrência da mancha angular foi realizada por Robbs et al. (1978), em mangueiras no estado do Ceará. Posteriormente, Robbs et al. (1981) registraram a ocorrência desta bacteriose causando lesões angulares em folhas de cajueiros na região Nordeste. Inicialmente os isolados de *X. axonopodis* fitopatogênicos às anacardiáceas foram classificados como *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Young et al., 1978), sendo em seguida reclassificados como *X. axonopodis* pv. *anacardii* Ah-You et al. (mancha angular do cajueiro), *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (Patel et al.) Robbs et al. (mancha angular da mangueira) e *X. axonopodis* pv. *spondiae* Ah-You et al. (mancha angular do cajá-manga) (Ah-You et al., 2007).

Essas fitobactérias foram novamente reclassificadas como patovares de *X. citri*: *X. citri* pv. *anacardii* e *X. citri* pv. *mangiferaeindicae* (Ah-You et al., 2009). Porém, esses epítetos não foram considerados válidos por não estarem de acordo com as normas 17 e 21 do padrão internacional para classificação de patovares de fitobactérias (International Standards for Naming Pathovars of Plant Pathogenic Bacteria), as quais definem que novas combinações estejam acompanhadas por descrições formais e designadas como pv. nov. ou comb. nov., respectivamente (Bull et al., 2012). Portanto, a classificação de isolados de *X. axonopodis* patogênicos a hospedeiros da família Anacardiaceae é provisória e não reflete os respectivos status taxonômicos.

Segundo Pruvost et al., (1998), *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica estrita, móvel, monotríquia, em formato de bastonete, medindo 0,4-0,5 x 1,0-1,5 μm . Em meio de cultura contendo glicose ou sacarose, as colônias são inicialmente cinza claro, tornando-se brancas a creme com o tempo, apresentando-se mucoides, redondas e superficialmente convexas (Manicon & Pruvost, 1994). No entanto há uma alta variabilidade intrapatovar de isolados apigmentados e pigmentados de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* que foi largamente estudada e comprovada por meio de análises fenotípicas (Pruvost et al., 1998), isoenzimáticas (Somé & Samson, 1996) e moleculares (Ah-You et al., 2009).

Os sintomas da mancha angular em mangueiras são mais comuns em folhas (Fig. 1F) e frutos, porém toda planta pode ser afetada. Nas folhas, o patógeno causa manchas angulares variando de 3 a 4 mm e de coloração pardo-escuras. Ao redor das lesões observa-se um halo amarelado e, sob alta umidade, observam-se, ainda, áreas com aspecto encharcado e folhas e frutos com manchas apresentam pústulas bacterianas. Percebe-se que as folhas podem ficar com vários orifícios na medida em que os sintomas avançam. Há uma acentuada queda dos frutos e os que permanecem na planta murcham e mumificam, principalmente quando o ataque é no pedúnculo. As lesões de todos os órgãos bacterianos exsudam goma rica em células bacterianas, favorecendo a disseminação do patógeno (Kimati et al., 2005). Em cajueiros, os sintomas desta enfermidade têm sido observados apenas em folhas e caracterizam-se como manchas angulares de coloração pardo escura, as quais se localizam no limbo foliar, próximo da nervura central (PAPA et al., 2001). Além da mangueira e do cajueiro, a aroeira e o cajá também são hospedeiras de *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (Ah-You et al., 2007).

A disseminação da doença a longas distâncias ocorre através de material de propagação contaminado. Não existem registros de infecções em sementes, porém, pode ocorrer a infestação da superfície das mesmas. Segundo Gama et al., (2013), esta bactéria dissemina-se principalmente a curta distância através da chuva com vento. Quanto ao manejo desta fitobacteriose, recomenda-se o uso de materiais de propagação sadios, variedades precoces, plantio de quebra-vento nas bordas do pomar e aplicação de fungicidas cúpricos (Gagnevin & Pruvost, 2001).

6. Mancha angular do cajueiro – *Xanthomonas axonopodis* pv. *anacardii*

Uma das classificações mais discutidas no meio científico é quanto ao gênero *Xanthomonas*. Atualmente tem sido proposta uma classificação para o gênero com base em dados de homologia DNA-DNA, dados fenotípicos de diferentes grupos da espécie, análise de carboidrato por BIOLOG e características de patogenicidade, compondo assim o gênero de bactéria fitopatogênica com maior número de espécies (Oliveira, 2010; Vauterin, 1995).

A família Anacardiaceae é largamente afetada por espécies desse gênero. A mangueira, cajueiro e aroeira são ser hospedeiros de algumas espécies abrigadas nesse gênero, conforme descrito no tópico anterior.

De acordo com Ah-You et al., (2007), *X. axonopodis* pv. *anacardii* representa o único patovar que tem como característica causar sintomas apenas em folhas de cajueiro e não em outros órgãos. No entanto, além dos sintomas nas folhas, em condições de campo, são também observadas manchas encharcadas e posteriormente necróticas nos frutos além de escurecimento nas nervuras, uma vez que a bactéria coloniza principalmente os vasos foliares (Viana et al., 2006).

Para o controle da doença recomenda-se realizações periódicas de poda de limpeza associadas a pulverizações semanais com fungicida à base de oxicleto de cobre. Em condições experimentais realizadas em campo, o uso de antibióticos têm apresentado controle eficiente desta bacteriose. No entanto, no Brasil, não há antibióticos registrados pelo ministério da agricultura para o manejo da mancha angular do cajueiro (Viana et al., 2006).



Figura 1. Clorose variegada em citrus - *Xylella fastidiosa* (A), cancro bacteriano da videira - *Xanthomonas campestris*pv. *Viticola* (B), camisa d'água em cebola - *Burkholderia cepacia* (C), podridão aquosa em cebola - *B. gladioli* (D), mancha angular em cajueiro - *X. axonopodis* pv. *anacardii* (E); mancha angular em mangueira - *X. axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* (F).

7. Considerações finais

Os avanços tecnológicos no segmento da agricultura moderna permitiram o aumento de áreas plantadas, diversificação e expansão das culturas em diferentes áreas geográficas e condições ambientais, no mundo. No entanto, os patógenos “coevoluíram”, pela capacidade natural de adquirir novos genes e consequentemente angariar novos hospedeiros, sobreviver em diferentes nichos ecológicos e condições ambientais, tornando-se emergentes, em diferentes áreas de cultivo. Nesse sentido, as bactérias fitopatogênicas desenvolveram no decorrer do processo evolutivo, eficientes mecanismos de recombinação gênica, responsáveis pela variabilidade e consequentemente adaptabilidade, tornando-as cada vez mais frequentes e de difícil controle. Assim, pesquisas multidisciplinares abrangendo estudos que viabilizem o manejo eficaz e adequado à agricultura moderna e ambientalmente sustentável faz-se um instrumento de essencialidade na manutenção das culturas economicamente importantes.

8. Bibliografia

- ADJEI, M. D.; OHTA, Y. Isolation and characterization of a cyanide-utilizing *Burkholderia cepacia* strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 699-704, 1999.
- AFOUNDA, L. C. A.; ZINSOU, V.; BALOGOUN, R. K.; ONZO, A.; AHOHUENDO, B. C. Inventaire des agents pathogènes de l'anacardier (*Anacardium occidentale* L.) au Bénin. **Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin**, v. 73, p. 13-19, 2013.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 952 p.
- AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; CHIROLEU, F.; JUEN, R. N. J.; PRUVOST, O. 2007. Pathological variations within *Xanthomonas campestris* pv. *maniferaeindicae* supported its separation into three distinct pathovars that can be distinguished by amplified fragment length polymorphism. **Phytopathology**, v. 97, p. 1568-1577, 2007.
- AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE, S.; NESME, X.; CHIROLEU, F.; BUI THI NGOC, L.; JUEN, E.; LEFEUVRE, P.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O. Polyphasic characterization of *Xanthomonas* pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 306-318, 2009.
- ARAÚJO, J. S. P. **Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) no Brasil**. 2001. 121f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- ARAÚJO, J. S. P.; REIS JÚNIOR, F. B.; CRUZ, G. B.; OLIVEIRA, B. C.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D.; POLIDORO, J. C. Produção e Caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 305-309, 2005.

- BRASIL. Instrução normativa SDA Nº 59, de 18 de dezembro de 2013. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, 19 de dezembro de 2013, seção 1, p. 91 e 92.
- BRASIL. Instrução normativa SDA Nº 9, de 20 de abril de 2006. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, 26 de abril de 2006, seção 1, p. 1.
- BREDJA, J. J.; KREMER, R. J.; BROWN, J. R. Indications of associative nitrogen fixation in eastern gama grass. **Journal Range Manage**, v. 47, p. 192-95, 1994.
- BUENSANTEAI, M. N. **Identification, development of detection method and survey of bacterial necrosis disease of grapevine in Thailand**. 2004. 102 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia da Produção de Alimentos) – Suranaree University of Technology, Muang District.
- BULL, C. T.; DE BOER, S. H.; DENNY, T. P.; FIRRAO, G.; FISCHER-LE SAUX, M.; SADDLER, G. S.; SCORTICHINI, M.; STEAD, D. E.; TAKIKAWA, Y. List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 21-27, 2012.
- CARLUCCI, A.; LOPES, F.; MARCHI, G.; MUGNAI, L.; SURICO, G. Has *Xylella fastidiosa* “chosen” olive trees to establish in the Mediterranean basin. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 52, p. 541-544, 2013.
- CASAI, V. O.; EPAMINONDAS, P.; OLIVEIRA DE S. A. S.; SCHNADELBACH, A. S.; BARBOSA, D. E. J. B.; BARBOSA, L. V. Diversidade genética de *Xylella fastidiosa* em regiões produtoras de citrus na Bahia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 26-33, 2014.
- CHAND, R.; KISHUN, R. Effect of temperature on the growth of grapevine bacterial canker pathogen. **Drakshavritta Souvenir**, v. 6, p.73-75. 1990.
- CHANG, C. J., GARNIER, M., ZREIK, L., ROSSETI, V., BOVÉ, J. M. Citrus variegated chlorosis: cultivation of the causal bacterium and experimental reproduction of the disease. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF IOCV, 12., Riverside, USA. **Proceedings ...** Riverside: IOCV, 1993. p. 294-300.
- COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J. J. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3427-3436, 2001.
- CRUZ, D. M. **Deteção de *Burkholderia* spp. associadas a sementes de arroz nacionais e importadas**. 86 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- DOIDGE, E. A bacterial disease of the mango *Bacillus mangiferae* n. sp. **Annals of AppliedBiology**, v. 2, p. 1-45, 1915.
- EFSA 2015 - **Scientific Opinion of the EFSA Plant Health Panel on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options**.Disponível em:<[http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/ pub/3989.htm](http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3989.htm)> Acesso em: 29. Fev. 2016.
- FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, A .D. S. **Ocorrência do cancro bacteriano da videira no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 2 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 62).
- FRENCH, W.J.; KITAJIMA, E.W. Occurrence of plum leaf scald in Brazil and Paraguay.**Plant Disease Reporter**, v. 62, p. 1035-1038, 1978.
- GAGNEVIN, L.; PRUVOST, O. Epidemiology and control of mango bacterial black spot. **Plant Disease**, v. 85, p. 928-935, 2001.
- GAMA, M. A. S., FELIX, K. C da S., SILVA, A. M. F. SANTOS, L. A., SANTOS, M. M. B., SOUZA, L. J N O Cajueiro e suas fitobacterioses: Mancha angular e mancha de *Xanthomonas*. **Anais da academia Pernambucana de Ciências Agronômicas**, v. 10, p. 123-142, 2013.

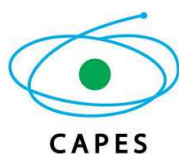
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; NECHET, K.L. Bacterial canker of grapevine in Roraima, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 604, 2006.
- HOLMES, A.; GOVAN, J.; GOLDSTEIN, R. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. A Threat to human health? **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 221-227, 1998.
- HOPKINS, D. L.; PURCELL, A. H. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. **Plant Disease**, v. 86, p. 1056-1066, 2002.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; VAZ, C. F.; SANTOS, E. C.; JUNQUEIRA, L. P.; SOUZA, L. S.; LIMA, C. A. Ocorrência do cancro bacteriano da videira na região do entorno do Distrito Federal. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2006, Cabo Frio - RJ. Frutas do Brasil: Saúde para o mundo. **Palestras e Resumos ...** Cabo Frio: SBF/UENF/UFRRJ. 2006. p. 323.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; **Manual de fitopatologia**: Doenças das plantas cultivadas. 4. ed. v. 2, São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 457- 465.
- KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANIKLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1244-1251, 2004.
- LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; DERRICK, K.S.; HOOKER, M.S. Development of a serological assay for the citrus variegated chlorosis a new disease of citrus in Brazil. Proceedings of Florida State. **Horticultural Society**, v. 105, p. 32- 35, 1991.
- LESSIE, T. G.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B.; DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity for *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 144, p. 117-128, 1996.
- LIMA, M .F.; LOPES, D. B.; TAVARES, S. C. C. H.; TESSMANN, D. J.; MELO, N. F. Doenças e alternativas de controle. In: SOARES, J.M.; LEÃO, P.C.S. (Eds.). **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semiárido; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. p. 543-596.
- LIMA, M. A. G.; PEIXOTO, A. R.; BORGES, I. V.; SILVA, M. S.; BARBOSA, M. A. G.; CAVALCANTI, L. S. Indução de resistência em mudas de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2016 (No prelo).
- LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S.V.; MOREIRA, W.A.; DIANESE, J.C. Bacterial canker of grapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 440-443, 1999.
- LOPES, D.B. Manejo sustentável de fitobacteriose: cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 83-85, 2006.
- LOPES, J. R. S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 20, p. 229- 344, 1999.
- LOPÉZ, M. M. **Bactérias fitopatogênicas exóticas y emergentes**: riegos de diseminación en España. San Jacinto: Phytoma, 2010. Disponível em: <http:// www.phytoma.com/tienda/articulos-editorial/257-222-octubre-2010/3441-bacterias-fitopatogenas-exoticas-y-emergentes-riesgos-de-introduccion-y-diseminacion-en-espana> Acesso em: 10 mar. 2016.
- MAHENTHIRALINGAM, E.; DREVINEK, P. Comparative genomics of *Burkholderia* species. *Burkholderia*, Molecular microbiology and genomics. **Biosciences Horizons**, 2006, 311 p.
- MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* Complex. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 144-156, 2005.
- 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 Phytopathologica**, v. 25, p. 262-264, 1999.

- MANICON, B. Q.; PRUVOST, O. Bacterial black spot. In: PLOETZ, R. C.; ZENTMYER, G. A.; NISHIJIMA, W. T.; ROHRBACH, K. G.; OHR, H. D. (Ed.). **Compendium of tropical fruit diseases**. St. Paul: APS Press, 1994. p. 41-42.
- MANO, E. T. **Identificação de genes de *Burkholderia* sp. associados ao controle biológico de *Pectobacterium carotovora***. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo/ Instituto Butantan, São Paulo.
- MARQUES, E. **Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* agente causal do cancro bacteriano da videira *Vitis* spp.** 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília.
- MEYER, S. L. F.; ROBERTS, F. P.; CARTA, L. K.; LUMSDEN, R. D.; MAO, W. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. **Nematropica**, v. 31, p. 75-86, 2001.
- MINSAVAGE, G.V., THOMPSON, C.M., HOPKINS, D.L., LEITE, R.M.V.B.; STALL, R.E. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, v. 84, p. 456-461, 1994.
- MIRANDA, M.P., LOPES, J.R.S., NASCIMENTO, A. S. SANTOS, J.L., CAVICHIOLO, R.R. Levantamentos populacional de cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) associadas a transmissão de *Xilella fastidiosa* em pomares cítricos do litoral norte da Bahia. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 6, p. 827-833, 2009.
- NACAMULLI, C.; BEVININO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MC17. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 23, p. 183-193, 1997.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, v. 34, p. 301-307, 2004.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; GAMA, M. A. S. Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p.650-654, 2005.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MASHIMA, C. H.; LIMA, M. F. **Cancro bacteriano: nova doença da videira no Submédio São Francisco**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2000. 22 p (Circular Técnica, 58).
- NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grape. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 73, p. 183-186, 1972.
- NUNES, W. M. C.; ZANUTO, C. A.; CORAZZA-NUNES, M. J.; MOLINA, R. O. Análise espaço-temporal da clorose variegada dos citrus no noroeste do Paraná, com uso de PCR para detecção de *Xilella fastidiosa*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, p. 421-425, 2006.
- OLIVEIRA, J. C. **Caracterização de isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* e redução da mancha angular do algodoeiro mediada pelo silício**. 2012, 112 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- PAPA, M. F. S.; MATOS, E. C.; ALMEIDA, I. M. C.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; BOLIANI, A. C. Ocorrência da mancha-angular (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*) em cajueiro no estado do Mato Grosso do Sul. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 119, 2001.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A.; MACHADO, M. A.; LARANJEIRA, F. F.; GARCIA JR., A.; BERETTA, M. J. G. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil, da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 1, p. 135-136. 1995.

- PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* Complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review in Phytopathology**, v. 39, p. 225-258, 2001.
- PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; MOREIRA, J. O. T.; VIANA, I. O. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 161-164, 2007.
- PEREIRA, P. S. *Xylella fastidiosa* - a new menace for portuguese agriculture and forestry. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, p. 149-154, 2015.
- PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H. V.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3103-3110, 2006.
- PRUVOST, O.; BOYER, C.; VITAL, K.; VERNIERE, C.; GAGNEVIN, L. First report in Mali of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica*. **Plant Disease**, v. 95, p. 774, 2011.
- PRUVOST, O.; BOYER, C.; VITAL, K.; VERNIERE, C.; GAGNEVIN, L. First report in Mali of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica*. **Plant Disease**, v. 96, p. 581, 2012.
- PRUVOST, O.; COUTEAU, A.; PERRIER, X.; LUISETTI, J. Phenotypic diversity of *Xanthomonas* sp. *mangiferaeindicae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 115-124, 1998.
- RANDALL, J. J.; GOLDBERG, N. P.; KEMP, J. D.; RADIONENKO, M.; FRENCH, J. M.; OLSEN, M. W.; HANSON, S. F. Genetic analysis of a novel *Xylella fastidiosa* subspecies found in the southwestern United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5631-5638, 2009.
- REIS, A.; HENZ, G. P.; LOPES, C. A. **Cultivo da cebola: doenças**. Brasília 2015. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/doencas.htm> Aces so em: 09 março 2016.
- ROBBS, C. F. Algumas bactérias fitopatogênicas do Distrito Federal. **Agronomia**, v. 14, p. 147-164, 1955.
- ROBBS, C. F.; NETO, J. R.; RIBEIRO, R. L. D.; KIMURA, O. Annotated list of bacterial plant pathogens in Brazil. In: INTERNATIONAL PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 5., 1981, Cali. **Proceedings ...** Cali: CIAT, 1981. p. 601-612.
- RODRIGUES NETO, J.; DETÉFANO, S. A. L.; RODRIGUES, L. M. R.; PELLOSO, D. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, L. C. Grapevine bacterial canker in the state of São Paulo, Brazil: detection and eradication. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 42-44, 2011.
- ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2ª. Ed. Viçosa: Editora UFV, Imprensa Universitária. 2005. 417p.
- ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVE, J. M.; BERETTA, M. J. G.; TEIXEIRA, A. R. R.; QUAGGIO, J. A.; DE NEGRI, J. D. Présence de bactéries dans le xylème d'orangers atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 310, p. 345-349, 1990.
- SANTOS FILHO, H.P.; BARBOSA, C. de J.; LARANJEIRA, F.F.; SILVA, S.X. de B. **Clorose variegada dos citros ameaça a citricultura do Recôncavo Sul**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. 2p. (Boletim Técnico, 34).
- SANTOS, M. M.; PEIXOTO, A. R.; PESSOA, E. S.; GAMA, M. A.; MARIANO, R. L. R.; BARBOSA, M. A. G.; PAZ, C. D. Identificação de potenciais plantas hospedeiras alternativas de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, v. 44, p. 595-598, 2014a.

- SANTOS, M. M.; PEIXOTO, A. R.; PESSOA, E. S.; SANTOS NETA, H. B.; PAZ, C. D.; SOUZA, A. V. V. Estudos dos constituintes químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* "in vitro". **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 277-280, 2014b.
- SANTOS, P. E.; BUSTILLOS, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated with wide environmental and geographic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2790-2798, 2001.
- SCHAAD, N. W.; LACY, P. E. G.; FATMI, M.; CHANG, C. J. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. **Systematic Applied Microbiology**, v. 27, p. 290-300, 2004.
- SCHUENZEL, E. L.; SCALLY, M.; STOUTHAMER, R.; NUNNEY, L. A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3832-3839. 2005.
- SILVA, A. M. F.; MENEZES, E. F.; SOUZA, E. B.; MELO, N. F.; MARIANO, R. L. R. Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 757-765, 2012.
- SILVA, D. F. **Investigação da ação bactericida de produtos naturais sobre a bactéria *Xilella fastidiosa***. 2013, 77f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- SOMÉ, A.; SAMSON, R. Isoenzymediversity in *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*. **Plant Pathology**, v. 45, p. 426-431, 1996.
- SUBARAO, K.; SUNDIN, G. W.; KLOSTERMAN, S. J.; Focus issue articles on emerging and re-emerging plant diseases. **Phytopathology**, v. 105, p. 852-854, 2015.
- TIYO, M. E. **Prospecção de genes de *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 com potencial para o biocontrole**. 2015. 122 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo.
- TOMAZ, R.; SCREMIN, R. M.; FERREIRA, M. A. S. V.; BARBOSA, M. A. G. Detecção e erradicação de videiras com sintomas do cancro bacteriano no Estado do Paraná. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p.896, 2011.
- TORBECK, L.; RACASSI, D.; GUILFOYLE, D. E.; FRIEDMAN, R. L. *Burkholderia cepacia*: This Decision Is Overdue. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 65, p. 535-543, 2011.
- TRINDADE, L. C. **Diagnose molecular do cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***. 2007. 92 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília.
- TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 46-54, 2005.
- VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.; COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWERS, S.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; GOVAN, J. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 1188-1200, 1997.
- VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; LIPUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D. P.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. A complex within the *Burkholderia cepacia* complex comprises at least two novel species:

- Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 102-111, 2009.
- VANLAERE, E.; LIPUMA, J. J.; BALDWIN, A.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; MAHENTHIRALINGAM, E.; SPEERT, D.; DOWSON, C.; VANDAMME, P. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov., *Burkholderia metallica* sp. nov. novel species within the *Burkholderia cepacia* Complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1580-1590, 2008.
- VAUTURIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 472-489, 1995.
- VERMIS, K.; VANDEKERCKHOVE, C.; NELIS, H. J.; VANDAMME, P. A. R. Evaluation of restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA as a tool for genomovar characterization within the *Burkholderia cepacia* Complex. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 1-5, 2006.
- VIANA, F. M. P.; SARAIVA, H. A. O.; FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E. **Mancha de Xanthomonas do cajueiro** – Sintomas e controle. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Boletim Técnico 114).
- WORDELL FILHO, J. A.; ROWE, E.; GONÇALVES, P. A. S.; DEBARBA, J. F.; BOFF, P.; THOMAZELLI, L. F. **Manejo fitossanitário na cultura da cebola**. Florianópolis: EPAGRI, 2006. 226 p.
- ZOMBRE, C.; SANKARA, P.; OUÉDRAOGO, S. L.; WONNI, I.; BOYER, K.; BOYER, C.; TERVILLE, M.; JAVEGNY, S.; ALLIBERT, A.; VERNIÈRE, A.; PRUVOST, O. Natural infection of cashew (*Anacardium occidentale*) by *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* in Burkina Faso. **Plant Disease**, v. 100, p. 718-723, 2016.



CAPES



Editora
Universitária
da UFRPE



9 788579 462597 >