

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção de  
*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melão  
(*Cucumis melo* L.)**

**Vanessa Cristina Frare**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia. Área de concentração:  
Fitopatologia**

**Piracicaba  
2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Vanessa Cristina Frare  
Engenheira Agrônoma

**Desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção de *Acidovorax avenae*  
subsp. *citrulli* em sementes de melão (*Cucumis melo* L.)**

Orientador:  
Prof. Dr. **JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia. Área de concentração:  
Fitopatologia

**Piracicaba  
2005**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Frare, Vanessa Cristina

Desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melão (*Cucumis melo* L.) / Vanessa Crsitina Frare. - - Piracicaba, 2005.

67 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

1. Bactéria fitopatogênica 2. Fitossanidade 3. Mancha bacteriana 4. Meios de cultura  
5. Melão 6. Sementes I. Título

CDD 635.61

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

A Deus, que tornou tudo isso possível

## **OFEREÇO**

“Aos meus pais,  
Jorge Pedro Frare e Maria do Carmo Doswaldo Frare,  
Pelo amor, apoio, incentivo e confiança”

“Ao meu irmão,  
Guilherme Fernando Frare,  
Pelo apoio incondicional, cumplicidade e amizade”

“Ao meus cachorrinhos,  
D’Rex, Jack, Jody, Justina e Veloça (*in memorian*),  
Pelo amor e alegria”

“À minha cachorra Boneca (*in memorian*),  
Pelo amor, carinho e companheirismo”

**DEDICO**

## Agradecimentos

À Deus, pela minha vida, pela força nos momentos difíceis e por ter me dado uma família maravilhosa;

Aos meus pais e meu irmão, pela grande paciência que tiveram comigo durante este trabalho, por todo o amor inesgotável e apoio;

Aos meus cachorrinhos Boneca (*in memorian*), D´Rex, Jack, Jody, Justina e Veloça (*in memorian*), por todo amor, companheirismo e alegria que me tornam uma pessoa melhor;

Ao Prof. Dr. José Otávio Machado Menten, pela orientação, conselhos, paciência e confiança;

À Maria Heloisa Duarte de Moraes, pela amizade, preocupação, paciência e apoio;

À Alessandra (Timão), pela grande amizade, principalmente nos momentos difíceis e companheirismo;

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Sementes, Adriana, Alderi, Camila, Cleci, Cristiano (Xapero), Daniel, Diogo, Gustavo, Jouse (Cris), Luana, Renatinha, Thais e Tathiana, pela amizade e convívio;

Aos amigos Aninha, Carol, Daniel, Fátima, Minuto e Sandra, pela amizade e bons momentos compartilhados;

Às amigas Fabiana e Marisa, pela companhia divertida e preocupações divididas;

Ao amigo Maurício, pela amizade e disposição com que sempre atendeu meus pedidos de ajuda;

A todos os colegas da Pós Graduação da Fitopatologia, em especial ao Fabrício, Franklin, Odair e Reinaldo, pelo convívio;

Aos funcionários Carmem, Edivaldo, Jeferson, Pedro, Sandra e Silvia, pelo apoio;

Aos funcionários Fernanda e Rodolfo, pela amizade, apoio e bons momentos compartilhados;

Aos professores do Setor de Fitopatologia, pelos valiosos ensinamentos e cobranças, estimulando nosso amadurecimento pessoal e profissional;

Ao Dr. Carlos Alberto Lopes da EMBRAPA-CNPq pela amizade, conselhos e apoio;

À Dra. Rosa Mariano da UFRPE, pela amizade e apoio;

Ao Dr. Warley Nascimento da EMBRAPA-CNPq, pelo apoio;

Ao Ricardo, Robert, Wellington e Natália, da Sakata, pelo apoio e amizade;

À minha prima Lucille (Dild's), pelas risadas e bons momentos compartilhados;

Ao Tio Pedrinho, pela confiança e incentivo, à Tia Haide e Tia Gusta pelo amor e carinho e a toda minha família, por acreditarem;

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP, pela formação profissional e em especial ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, pela oportunidade;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de estudos concedida, sem a qual este trabalho não seria possível;

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.



**"Se não houver frutos,  
valeu a beleza das flores;  
se não houver flores,  
valeu a sombra das folhas;  
se não houver folhas,  
valeu a intenção da "semente"!**

**Henfil**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	12
LISTA DE TABELAS .....	13
1 INTRODUÇÃO .....	14

2.5.14	Antibiograma quantitativo para bactérias associadas a sementes de melão (Basm) ..	35
2.5.15	Teste de urease .....	35
2.5.16	Teste da hidrólise de amido .....	36
2.5.17	Avaliação do meio semi-seletivo desenvolvido .....	36
2.5.18	Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua supressividade e repressividade ...	37
2.5.18.1	Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua supressividade .....	37
2.5.18.2	Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua repressividade .....	37
2.5.19	Detecção de Aac pela deposição das sementes em meio semi-seletivo .....	38
2.5.20	Detecção de Aac pelo método de extração e semeio em meio semi-seletivo....	38
2.6	Resultados e discussão.....	39
2.6.1	Teste de patogenicidade dos isolados .....	39
2.6.2	Confirmação da identidade dos isolados de Aac.....	40
2.6.3	Isolamento de fungos associados a sementes de melão .....	41
2.6.4	Avaliação do efeito dos fungicidas selecionados sobre os isolados de Aac .....	41
2.6.5	Teste de fungitoxicidade <i>in vitro</i> .....	42
2.6.6	Isolamento de bactérias associadas a sementes de melão (Basm).....	43
2.6.7	Antibiograma qualitativo para os isolados de Aac .....	44
2.6.8	Antibiograma qualitativo para as bactérias associadas a sementes de melão (Basm)..	46
2.6.9	Antibiograma quantitativo para os isolados de Aac.....	47
2.6.10	Antibiograma quantitativo para bactérias associadas a sementes de melão (Basm) ..	49
2.6.11	Teste de urease .....	51
2.6.12.	Teste da hidrólise de amido .....	53
2.6.13	Avaliação do meio semi-seletivo desenvolvido .....	54
2.6.14	Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua supressividade e repressividade ...	54
2.6.14.1	Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua supressividade .....	55
2.6.14.2	Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua repressividade .....	56
2.6.15	Detecção de Aac pela deposição das sementes em meio semi-seletivo .....	57
2.6.16	Detecção de Aac pelo método de extração e semeio em meio semi-seletivo....	58
3	CONCLUSÕES .....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA .....	67

## RESUMO

### **Desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melão (*Cucumis melo* L.)**

Um dos principais fatores limitantes da produção do melão é a ocorrência de doenças. Entre os patógenos mais importantes estão as bactérias, que causam perdas significativas na produção. Causada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac), a mancha-aquosa-do-melão, também conhecida como mancha-bacteriana-do-fruto, é uma doença grave, que tem preocupado produtores do nordeste, sendo que todos os tipos de melão apresentam suscetibilidade ao patógeno. A principal fonte de inóculo para esta bactéria é a semente infectada. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção e identificação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melão, para testes de rotina em laboratórios de patologia de sementes. Por meio de testes de fungitoxicidade, antibiogramas qualitativos e quantitativos e testes bioquímicos foi desenvolvido o seguinte meio semi-seletivo para a detecção de Aac em sementes de melão: dextrose (5 g/L), NaCl (5 g/L), peptona (5 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/L), vermelho de fenol (0,012 g/L), uréia (25 g/L), agar (17 g/L), benomil (100 mg/L), nistatina (200 mg/L) e amoxicilina (15 mg/L).

Palavras-chave: Meio semi-seletivo, melão, detecção, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, mancha-aquosa

## ABSTRACT

### **Development of a semi-selective medium to detect *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon seeds (*Cucumis melo* L.)**

One of the main limiting factors of the melon production is the occurrence of diseases. The bacteria are among the most important pathogens causing significant losses in the production. Caused by the bacterium *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac), the bacterial-fruit-blotch is a serious disease that affects all types of melon and has worried northeast producers. The main source of inoculum for this bacterium is the infected seed. This work had as objective the development of a semi-selective medium to detect and identify *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon seeds, for routine tests in seed pathology laboratories. By means of fungitoxicity tests, qualitative and quantitative antibiograms and biochemical tests the following semi-selective medium to detect Aac in melon seeds was developed: dextrose (5 g/L), NaCl (5 g/L), peptone (5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2 g/L), phenol red (0,012 g/L), urea (25 g/L), agar (17 g/L), benomil (100 mg/L), nistatina (200 mg/L) and amoxicilin (15 mg/L).

Key words: semi-selective medium, melon, detection, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, bacterial-fruit-blotch

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cartela contendo discos para antibiograma (Oxoid) .....	34
Figura 2 - Folhas de fumo com reação de hipersensibilidade causada pela bactéria Aac e testemunha .....	40
Figura 3 - Halo de inibição de crescimento causado pelos antibióticos amikacina e bacitracina .....	45
Figura 4 - Halo de inibição de crescimento do isolado Basm8 causado pelos antibióticos carbenicilina e cefuroxima .....	47
Figura 5 - Mudança de cor do meio devido à alcalinização decorrente da decomposição da uréia e liberação de amônia .....	52
Figura 6 - Aspecto visual do meio semi-seletivo desenvolvido para detecção de Aac .....	54
Figura 7 - Crescimento bacteriano das amostras 2 e 4 no meio semi-seletivo e NA .....	55
Figura 8 - Folhas de fumo com reação de hipersensibilidade causada pelas bactérias morfológicamente semelhantes à Aac .....	56
Figura 9 - Inibição do crescimento de bactérias associadas a sementes de melão (Basm) e alteração de cor do meio semi-seletivo devido ao crescimento de Aac ao redor das sementes .....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teste de patogenicidade dos isolados de Aac.....	39
Tabela 2 - Teste de ELISA para confirmação da identidade dos isolados de Aac.....	40
Tabela 3 - Efeito dos fungicidas selecionados sobre os isolados de Aac .....	41
Tabela 4 - Percentagem de inibição de crescimento (PIC%) das colônias fungicas por fungicidas ...	42
Tabela 5 - Características dos isolados bacterianos associados a sementes de melão.....	44
Tabela 6 - Efeito dos antibióticos no crescimento de Aac.....	44
Tabela 7 - Efeito de antibióticos no crescimento das bactérias associadas a sementes de melão (Basm) .....	46
Tabela 8 - Efeito do antibiótico amoxicilina no crescimento dos isolados de Aac .....	47
Tabela 9 - Efeito do antibiótico ampicilina no crescimento dos isolados de Aac .....	48
Tabela 10 - Efeito do antibiótico cefalexina no crescimento dos isolados de Aac .....	48
Tabela 11 - Efeito do antibiótico clindamicina no crescimento dos isolados de Aac .....	49
Tabela 12 - Efeito do antibiótico clindamicina no crescimento dos isolados de Basm .....	50
Tabela 13 - Efeito do antibiótico ampicilina no crescimento dos isolados de Basm .....	50
Tabela 14 - Efeito do antibiótico amoxicilina no crescimento dos isolados de Basm .....	51
Tabela 15 - Atividade de urease nos isolados de Aac e Basm .....	52
Tabela 16 - Atividade de amilase nos isolados de Aac e Basm .....	53
Tabela 17 - Número de colônias/placa de bactérias extraídas de sementes de melão em meio sem restrição (NA) e no meio semi-seletivo desenvolvido.....	55
Tabela 18 - Número de colônias/placa para cada isolado de Aac nos diferentes meios avaliados e valor de R .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

Originário da África ou da Índia, o melão é cultivado na Europa e Ásia desde os primórdios da era Cristã. Trazido provavelmente pelos escravos, o melão é conhecido no Brasil desde o século XVI. Mais recentemente, no século XIX, os imigrantes europeus foram responsáveis por uma segunda via de introdução de melão no país, quando se iniciou, de fato, a expansão da cultura nas regiões Sul e Sudeste (MELO et al., 1998).

Embora restrita a um pequeno número de estados produtores, a cultura do melão ampliou-se de forma significativa nos últimos anos. No período de 1980 a 1996, a área cultivada com melão no Brasil passou de 5.661 para 12.200 ha, o que representa um aumento da ordem de 115,50%, enquanto o incremento da produção foi de 259,18%.

Atualmente o maior pólo produtor de melão do Brasil é o Rio Grande do Norte, com uma produção de 181.760 toneladas de frutos e uma área colhida de 6.771 ha, seguido pelo Ceará, com 92.047 toneladas e 3.842 ha de área colhida e pela Bahia, com 43.016 toneladas e 2.502 ha de área colhida (FNP, 2005).

O melão é uma fruta de grande importância para o comércio de exportação do Brasil. A concentração da safra brasileira coincide com a entressafra da Espanha, de setembro a abril, fato que favorece a exportação da fruta. Os principais destinos do melão nacional são os Países Baixos (62.226 t), Reino Unido (57.495 t), Espanha (15.083 t), Itália (4.321 t) e Alemanha (4.132 t) (FNP, 2005).

Um dos maiores problemas para a cultura do melão é a presença de patógenos, principalmente bactérias, que causam perdas significativas de produção, chegando até mesmo a dizimar completamente a cultura em certas regiões.

Causada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, a mancha-aquosa-do-melão, também conhecida como mancha-bacteriana-do-fruto, é uma doença grave que tem como principal meio de transmissão a semente infectada, que é a principal fonte de inóculo para a maioria das doenças causadas por bactérias fitopatogênicas. O uso de sementes comprovadamente sadias é uma forma simples, segura e econômica de se evitar a ocorrência de diversas enfermidades no campo. Assim, a produção, a



avaliação e a subsequente utilização de sementes livres de patógenos são medidas importantes para o controle de diversas doenças bacterianas (OLIVEIRA, 1995).

Análises visuais das sementes são insuficientes para determinar a presença ou não das bactérias fitopatogênicas. Deste modo, existe a necessidade de testes que possibilitem detectar bactérias em sementes, especialmente quando o nível de infecção é muito baixo (OLIVEIRA, 1995).

As técnicas de detecção apresentam grandes variações quanto à sensibilidade, especificidade e complexidade em relação à semente/bactéria testada. Não existe, portanto, uma metodologia padronizada e que atenda a diferentes necessidades. A escolha do método a ser utilizado depende de vários fatores e a metodologia básica tem que ser adaptada para cada sistema biológico em estudo (SCHAAD, 1982).

O estabelecimento de uma metodologia reproduzível e confiável para a detecção de patógenos em análises de rotina é de extrema importância em um programa de certificação de sementes. Desta forma pode-se evitar o emprego de sementes de qualidade sanitária duvidosa, o que, em última análise, resulta sempre em perdas quantitativas e qualitativas da produção.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um meio semi-seletivo para detecção e identificação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melão, para testes de rotina em laboratórios de patologia de sementes.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 A cultura do melão e a mancha-aquosa do fruto

O melão é classificado dentro da família Cucurbitaceae, gênero *Cucumis* e espécie *C. melo*. Esta espécie é altamente polimórfica, apresentando diversas variedades botânicas que se cruzam sem que haja nenhuma barreira (PINTO, 1977).

O cultivo comercial do melão teve início, no Brasil, na década de 60, no Estado de São Paulo (CASTRO et al., 1998) e, até essa época, todo o melão comercializado e consumido no Brasil era proveniente da Espanha (PINTO, 1977).

Por ser pouco resistente à umidade, não pôde se expandir em grande escala no sul ou no sudeste do país, sendo atualmente o Nordeste brasileiro a região que oferece melhores condições para o cultivo do melão (CASTRO et al., 1998; FILGUEIRA, 1981), responsável por aproximadamente 94,8% da produção nacional, sendo o Agropolo RN-CE responsável por 82% dessa produção (FNP, 2005), predominantemente direcionada ao mercado externo (ARAÚJO et al., 2004).

Um dos principais fatores limitantes da produção da cultura é a ocorrência de doenças (TAVARES, 2002). Dentre os patógenos que ocorrem sobre as espécies de plantas de expressão econômica na agricultura brasileira, as bactérias vêm assumindo importância crescente, causando elevadas perdas (KIMATI et al., 1997; LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997; ROMEIRO, 1995). Bactérias importantes para a cultura do melão são: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Pseudomonas cichorii*, *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*, *Erwinia ananas*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas syringae* e *Erwinia tracheiphila* (TAVARES, 2002).

As razões para essa crescente importância são diversas, destacando-se o desequilíbrio progressivo do agroecossistema, o emprego de cultivares de alto potencial produtivo, porém suscetíveis e a própria competência das fitobactérias, capazes de sobreviver de forma variada e de se disseminar eficazmente com particular rapidez, estabelecendo-se, freqüentemente com sucesso, quando introduzidas em determinada região agrícola (ARAÚJO et al., 2003). Dessa forma, as bactérias constituem

importantes patógenos de plantas cultivadas, quer pela gravidade das enfermidades que incitam em culturas econômicas, quer pelas dificuldades em relação ao seu efetivo controle (ARAÚJO et al., 2003; ROMEIRO, 2001).

Dentre as doenças bacterianas que podem limitar a produção de melão encontra-se a mancha-aquosa-do-melão ou mancha-bacteriana-do-fruto, causada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac). A bactéria, em geral, coloniza a polpa do fruto, onde causa podridão seca, associando-se às sementes externa e internamente através do hilo, o que dificulta a erradicação (MARIANO; SILVEIRA, 2004).

A transmissão de Aac por sementes é muito eficiente, sendo já verificada em níveis de 33 a 91% (MARIANO; SILVEIRA, 2004). Comumente 80 a 90% de plântulas oriundas de sementes obtidas de frutos doentes são portadoras (STALL, 1997). O uso de sementes garantidamente sadias é a principal e mais efetiva medida de controle preconizada para a mancha-aquosa do melão (ARAÚJO et al., 2004).

Os sintomas da doença podem ocorrer em folhas, frutos e plântulas, sendo mais fácil e comumente visualizados nos frutos maduros, onde são mais típicos, embora a infecção ocorra durante a floração e formação destes. As lesões nos frutos se apresentam inicialmente por pontos oleosos de 1 a 5 mm de diâmetro, os quais se expandem e se tornam manchas marrons, necróticas, com ou sem rachaduras no centro. Internamente ocorre descoloração da polpa, que se apresenta marrom avermelhada abaixo da casca. 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 a lesão externa apresentar um pequeno diâmetro (MARIANO; SILVEIRA, 2004).

A severidade da doença é maior quando esta se encontra sob altas temperaturas e umidade. De acordo com Silveira et al. (2002), a temperatura de 30°C influenciou significativamente a severidade da mancha-aquosa, sendo evidenciado maior diâmetro e profundidade da lesão em frutos quando incubados a esta temperatura.

Esta doença já foi detectada nos EUA (nos estados da Carolina do Sul, Carolina do Norte, Geórgia, Flórida, Maryland, Delaware, Indiana), Costa Rica, Turquia, China, Tailândia, Israel e Brasil. Suspeita-se que a transmissão e disseminação foram

feitas por sementes infectadas com a bactéria (CALIFORNIA CROP IMPROVEMENT ASSOCIATION, 2005).

Na Região Nordeste do Brasil Aac foi detectada pela primeira vez em 1997, no Estado do Rio Grande do Norte (ASSIS et al., 1999) e, em seguida, no Ceará (SANTOS; VIANA, 2000) e Pernambuco (MARIANO et al., 2001).

Os prejuízos causados na safra de 2000, sobretudo durante o período chuvoso, foram elevados, chegando a dizimar totalmente as produções em algumas lavouras nos municípios de Quixeré - CE e Mossoró - RN. Em 2001, levantamento realizado em 18 plantios de meloeiro, no Estado do Rio Grande do Norte, registrou 100% de prevalência da mancha-aquosa, com incidência de até 47,3% (MARIANO; SILVEIRA, 2004).

Todos os tipos de melão apresentam suscetibilidade à bactéria (LATIN, 1997; MARIANO et al., 2001), incluindo Amarelo, Orange, Pele de Sapo, Charantais e Gália (MARIANO et al., 2001).

Além do melão, Aac possui também como hospedeiros alternativos: melão-de-são-caetano, bucha (SANTOS; VIANA, 2000), pepino, maxixe, moranga, tomate, berinjela, pimentão (NASCIMENTO et al., 2002), melão-pepino (OLIVEIRA et al., 2002), abóbora, abobrinha e melancia (MARIANO; SILVEIRA, 2004).

## **2.2 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli***

O gênero *Acidovorax* foi originalmente proposto em 1990, por Willems et al. Em 1992, Willems et al., baseados em análises moleculares, propuseram transferir os fitopatógenos previamente classificados como *Pseudomonas avenae*, *P. pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* e *P. pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* para este novo gênero, como subespécies de *Acidovorax avenae* (SCHAAD et al., 2000).

A bactéria Aac pode ser resumidamente descrita da seguinte forma: possui formato de bastonete, móvel por um flagelo polar, Gram negativa, aeróbica (MARIANO; SILVEIRA, 2004; SCHAAD et al., 2000), urease positiva, não fluorescente em meio KB, colônias não amarelas em YDC/NA, sem crescimento em DIM Agar, sem utilização de

arginina e betaina e com crescimento em temperatura de 40°C (SCHAAD et al., 2000). Multiplica-se em plantas mortas, restos de cultura, hospedeiros alternativos e plantas voluntárias e tem como principal meio de transmissão à semente infectada (HOPKINS; THOMPSON, 2002; HOPKINS et al., 1996; MARIANO; SILVEIRA, 2004). Sua disseminação à longa distância ocorre principalmente por sementes portadoras (ARAÚJO et al., 2004; MARIANO; SILVEIRA, 2004) e pelo transplântio de mudas de cucurbitáceas infectadas (MARIANO; SILVEIRA, 2004).

### **2.3 A importância da sanidade de sementes**

A semente é um dos principais insumos da agricultura moderna, sendo que cerca de 90% dos alimentos são produzidos através delas. Todas as espécies cultivadas propagadas por sementes apresentam doenças como um fator responsável pela redução no rendimento ou aumento do custo de produção. Estas podem ser evitadas ou minimizadas pela utilização de sementes sadias e/ou tratadas (MENTEN, 1991a).

A sanidade de sementes foi totalmente negligenciada durante muito tempo, porém, atualmente, todos os setores envolvidos na indústria de sementes reconhecem que a qualidade das sementes também inclui a incidência de patógenos (MENTEN, 1991b). Atualmente, devido aos relevantes trabalhos realizados, a importância da Patologia de Sementes é reconhecida e aceita pelas autoridades governamentais, produtores de sementes, agricultores e técnicos ligados ao assunto. Apesar dessa tomada de consciência, ainda não se exige que o lote de sementes para comercialização seja acompanhado de um certificado de sanidade, procedimento que seria ideal, pois geralmente o índice de germinação não revela problemas que os patógenos podem causar à semente ou à cultura. Um lote pode estar com porcentagem de germinação dentro dos padrões exigidos e também estar transportando microrganismos que não afetam a qualidade fisiológica da semente nas condições de laboratório, mas que se manifestarão em condições de campo, afetando a germinação ou causando doença na cultura em desenvolvimento (MORAES, 1991).

Os patógenos causam danos às plantas através da interferência em diversos processos fisiológicos essenciais. Existem patógenos que destroem os órgãos de reserva ou tecidos jovens; outros que danificam o sistema radicular ou vascular, afetando, respectivamente, a absorção e o transporte de água e nutrientes; outros que interferem na fotossíntese, enquanto um grupo mais especializado afeta a distribuição da seiva elaborada. Patógenos pertencentes a todos estes grupos de doenças podem estar associados às sementes (MENTEN, 1991a). Potencialmente, todos os organismos fitopatogênicos podem ser transportados pelas sementes, embora a transmissão de inúmeros deles, por esse meio, não seja conhecida (MACHADO, 1988).

Segundo Baker (1972), o transporte de patógenos por sementes pode ser feito de três modos: misturado com a semente (parte da fração impura do lote), aderido passivamente na superfície da semente ou presente em seu interior. Destes, a presença do inóculo no interior da semente é considerada a maneira de transporte mais comumente utilizada pelos fitopatógenos. Vale ressaltar que o patógeno pode estar, simultaneamente, presente na semente nas três condições descritas.

De maneira geral, tem sido demonstrado que patógenos podem sobreviver no interior das sementes por períodos de tempo mais prolongados do que em outras partes da planta (BAKER, 1972). Provavelmente tal fato decorra da existência, nas sementes, de camadas protetoras e do acúmulo de reservas nutritivas dos quais muitos patógenos se beneficiam (MACHADO, 1987). Existem relatos da transmissão de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* por semente após armazenagem por 12 meses (HOPKINS et al., 1996).

Em termos econômicos, a importância da associação de patógenos com sementes pode ser avaliada em função dos tipos de danos causados pelas doenças correspondentes, tanto na fase de produção e comercialização de sementes, como no campo comercial, a partir do uso de sementes contaminadas ou infectadas (MACHADO, 1987).

De acordo com Machado (1987), um dos meios mais eficientes de se introduzir ou acumular patógenos em áreas tradicionais de cultivo ou áreas novas é o cultivo de sementes contaminadas ou infectadas em mistura com sementes sadias. Esta eficiência está relacionada ao fato de que as sementes que contém patógenos não

são facilmente reconhecidas em um lote e, por conseguinte, são distribuídas aleatoriamente no campo, constituindo foco primário de infecção na fase mais inicial da cultura. Nestas circunstâncias, as chances para o estabelecimento das doenças são máximas.

É sabido que fitobactérias podem estar associadas às sementes de suas respectivas plantas hospedeiras e que é possível detectar sua presença em lotes ou amostras (NEERGAARD, 1977; ROMEIRO, 1995; SAETTLER et al., 1989). Os testes de sanidade de sementes têm como fundamento fazer com que os patógenos, uma vez associados a essas estruturas, sejam direta ou indiretamente evidenciados, permitindo ao analista a sua identificação rápida e segura. Para que um teste seja recomendado é necessário que os resultados sejam reproduzíveis dentro de limites estatísticos e que forneçam informações seguras em relação ao desempenho das sementes no campo ou em termos de inspeção quarentenária (MACHADO, 1988).

Devido às dificuldades que envolvem a manipulação e a identificação final de bactérias, a execução de testes de sanidade para detecção deste grupo de patógenos, em termos de rotina de laboratórios, tem sido restrita (MACHADO, 1988); porém, a detecção de fitobactérias em sementes pode ser realizada por uma ampla diversidade de técnicas, as quais apresentam grandes variações quanto à sensibilidade, especificidade e complexidade em relação à semente/bactéria avaliada.

Dentre as técnicas empregadas para detecção de fitobactérias estão: *grow out* (HALFON-MEIRI; VOLCANI, 1977; PARASHAR & LEBEN, 1972; SCHAAD, 1982; WALCOTT et al., 2000 e WALCOTT et al., 2001), inoculação de plantas hospedeiras (SAETTLER, 1971 e WEBSTER et al., 1983), inoculação em plantas indicadoras (VALARINI; MENTEN, 1992), hipersensibilidade em plantas de fumo (KLEMENT, 1983), uso de meios seletivos e semi-seletivos (APASSUL, 2005; KRUPPA et al., 1994; MARINGONI et al., 1994; MCGUIRE et al., 1986; MOHAN; SCHAAD, 1987; OLIVEIRA, 1995; SCHAAD, 1982; SCHAAD; FORSTER, 1985; SOARES, 1993), sorologia (DeBOER, 1987; KOMIYA et al., 2003; MALIN et al., 1983; SCHAAD, 1979; SCHAAD; DONALDSON, 1980) e técnicas moleculares (LaFLAMME; MADDOX, 1998; LEITE JUNIOR et al., 1995; SONG et al., 2002; STALL, 1997; WALCOTT; GITAITIS, 2000; WALCOTT, 2003). A escolha do método depende de vários fatores e a metodologia

básica tem que ser adaptada para cada patossistema estudado, sendo muitas vezes necessário combinar dois ou mais métodos para facilitar a detecção do patógeno (SCHAAD, 1982).

A técnica mais utilizada para a detecção de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sementes de melão é o *grow out*, que requer grandes áreas para sua execução, grande quantidade de mão de obra, 2 a 3 semanas para a obtenção de resultados e um grande número de sementes (30000) (STA LABORATORIES, 2005).

Os testes de sanidade em relação a bactérias, de maneira geral, tendem a ser padronizados com base em princípios serológicos e biológicos. Os testes são aplicados utilizando-se o extrato devidamente obtido da embebição ou maceração das sementes em água, solução tampão ou outro meio líquido. Neste caso, os resultados são qualitativos, exceto se as sementes são examinadas em grupos separados (MACHADO, 1988).

Contudo, quando se deseja detectar e/ou quantificar fitobactérias em sementes é preciso lembrar que a superfície das sementes abriga uma flora microbiana muito diversa, o que pode comprometer e mascarar resultados. Há também que se lembrar que a percentagem de sementes veiculando fitobactérias em um lote é usualmente muito baixa, quase sempre menor que 1% (ROMEIRO, 2001; SAETTLER et al., 1989), e sementes às quais fitobactérias estão associadas não costumam exibir sintomas visuais distintos (ROMEIRO, 2001).

Tratando-se de sementes, o isolamento em meio de cultura para detecção de algumas espécies de bactérias, através de métodos convencionais, é usado em alguns casos (TAYLOR, 1970). Existem meios de cultura de rotina, tradicionalmente utilizados para o cultivo de fitobactérias, que proporcionam boas condições nutricionais para suportar o crescimento da maioria delas, como o meio 523 de Kado e Heskett (1970), caldo nutriente-glucose-ágar ou NGA (KLEMENT et al., 1990), caldo nutriente-extrato de levedura-glucose-ágar ou NYGA (SCHAAD, 1988), dentre outros. Esses meios são de uso geral, não tendo sido desenvolvidos especificamente para um determinado gênero ou espécie de fitobactéria. Um grande problema é que muitos desses meios contêm em sua composição ingredientes importados, o que os torna muito caros e, geralmente, difíceis de serem adquiridos. Outro problema que às vezes se verifica é a



dificuldade de preparo do meio, como tempo gasto, cuidados necessários no manuseio, no armazenamento e na incorporação de certos ingredientes (OLIVEIRA, 1995).

## **2.4 Meios semi-seletivos**

O uso de meios não seletivos em rotina tem apresentado sucesso em poucos casos, uma vez que o lote de sementes deve estar altamente contaminado/infectado com a bactéria alvo ou a microflora saprofítica em quantidade relativamente baixa, condições estas que são observadas na minoria dos casos (OLIVEIRA, 1995).

Os meios de cultura seletivos são valiosas ferramentas em fitobacteriologia, para o diagnóstico de doenças, estudos epidemiológicos e de patologia de sementes (KRUPPA, 1993). No entanto, o termo “semi-seletivo” é mais adequado, pois dificilmente um meio é inteiramente seletivo. Os meios semi-seletivos são definidos como um meio de cultura empregado para suprimir ou prevenir o crescimento de um grupo de organismos, enquanto permite o crescimento de outro grupo, quando presentes na mesma microflora (KLEMENT et al., 1990).

Os dois principais critérios para avaliação de um meio semi-seletivo são a sua eficiência na detecção e sua seletividade (KLEMENT et al., 1990). A seletividade dos meios de cultura semi-seletivos pode ser obtida utilizando-se fontes específicas de carbono e nitrogênio, as quais podem estimular o crescimento de uma determinada espécie e inibir outra; ou quando as enzimas bacterianas reagem com os constituintes do meio de cultura e propiciam uma distinção cultural entre duas espécies que antes pareciam similares. A adição de substâncias tóxicas ao meio de cultura visa reduzir o número de contaminantes e favorecer o desenvolvimento da espécie desejada (McGUIRE et al., 1986).

Considerando-se a grande quantidade de microrganismos, outros que não o patógeno, constituindo a flora microbiana associada às sementes, o uso de meios semi-seletivos só funciona bem se o meio for bastante efetivo em termos de seletividade, com alta supressividade para microrganismos saprófitas e baixa repressividade para a bactéria fitopatogênica que se deseja detectar e/ou quantificar (ROMEIRO, 2001).

Geralmente, a maioria dos meios de cultura empregados rotineiramente em laboratórios de Fitopatologia presta-se ao isolamento, ao cultivo e à manutenção de bactérias fitopatogênicas não fastidiosas (SCHAAD, 1988).

Em compensação, sendo o meio semi-seletivo empregado muito eficiente, este pode ser usado não só para isolamento como até mesmo para uma estimativa da porcentagem de sementes no lote que possui a fitobactéria a elas associadas (SAETTLER et al., 1989).

Schaad et al. (2000) desenvolveram alguns meios para a detecção e identificação do gênero *Acidovorax*. Entre esses meios pode-se citar: *Beef-yeast extract* (isola o gênero *Acidovorax* de lesões de plantas); WFB 08, WFB 44 e mEBB (isola *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* de sementes); YDC (fácil diferenciação de colônias de *Acidovorax avenae*); YP Agar (isola *Acidovorax konjaci* de lesões de plantas); SNR (isola *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* do solo e restos de plantas).

De acordo com Romeiro (2001), o procedimento básico é simples, pois sementes presumidamente contendo fitobactéria a elas associadas são depositadas na superfície do meio semi-seletivo sólido, em placas de Petri, incubando-se as placas a 28°C até o surgimento de colônias ao redor das sementes. Colônias de aspecto semelhante ao do patógeno alvo são repicadas, estabelecendo-se subculturas que, por sua vez, são inoculadas, individualmente, no hospedeiro original, para confirmação da fitopatogenicidade.

A metodologia de extração de uma amostra representativa varia para cada caso de associação semente-fitobactéria. De maneira geral, a extração da bactéria de uma amostra consiste em imergir um grande número de sementes (2.000 a 10.000, por exemplo) em uma solução extratora estéril apropriada (água, salina, tampão fosfato, PBS) por um determinado tempo, sob agitação, preferencialmente a baixa temperatura (4-5°C). O extrato resultante é concentrado por centrifugação (ROMEIRO, 2001), ressuspendido em solução salina estéril e plaqueado sobre o meio semi-seletivo (OLIVEIRA, 1995).

## **2.5 Material e métodos**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia de Sementes e na casa de vegetação do Setor de Fitopatologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP.

### **2.5.1 Origem e cultivo dos isolados**

Cinco isolados de Aac foram obtidos junto a fitobacteriologistas (EMBRAPA-CNPH, EMBRAPA-CENARGEN, UFRPE e Instituto Biológico de Campinas) que dispunham de coleção de culturas da referida bactéria. Os isolados são provenientes de:

- Aac1- Presidente Prudente - SP;
- Aac2- Baraúnas - RN;
- Aac3- Jequié - BA;
- Aac4- Mossoró - RN;
- Aac5- Quixeré - CE.

O inóculo foi recuperado em meio Nutriente-Ágar (extrato de carne (3,0 g/L), peptona (5,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), NaCl (5,0 g/L), dextrose (5,0 g/L) e agar (15,0 g/L)) e incubado a 28°C.

### **2.5.2 Teste de patogenicidade dos isolados de Aac**

Primeiramente todos os isolados foram submetidos ao teste de hipersensibilidade (RH) em folhas de fumo. Os isolados que apresentaram reação de hipersensibilidade em folhas de fumo foram submetidos ao teste de patogenicidade em plântulas de melão.

### **2.5.2.1 Reação de hipersensibilidade (RH) em folhas de fumo**

As bactérias, na forma de suspensão (concentração aproximada de  $10^6$  UFC/mL), foram inoculadas em folhas de fumo, por pressão, com ajuda de uma seringa hipodérmica. Folhas inoculadas somente com água destilada estéril foram utilizadas como testemunha. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e a avaliação foi feita após 24 e 48 horas da inoculação.

### **2.5.2.2 Teste de patogenicidade dos isolados em plântulas de melão**

Em casa de vegetação, sementes de melão de diferentes cultivares foram distribuídas em vasos (3 sementes/vaso) contendo solo estéril. Após o desenvolvimento das plântulas (primeira folha verdadeira), estas foram inoculadas com as seguintes técnicas:

-Aspersão: a bactéria, na forma de suspensão (concentração aproximada de  $10^6$  UFC/mL), foi inoculada em plantas de melão com a ajuda de um pulverizador manual. As plântulas inoculadas foram mantidas em câmara úmida 48 horas antes e após a inoculação.

-Raspagem: um palito de dente estéril foi colocado em contato com a superfície da colônia bacteriana e em seguida, com a ponta do palito, as folhas e os cotilédones foram riscados. As plântulas inoculadas foram mantidas em câmara úmida 48h horas antes e após a inoculação.

### **2.5.3 Confirmação da identidade dos isolados de Aac**

Todos os isolados foram submetidos ao teste de DAS ELISA para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, conforme protocolo estabelecido pelo fabricante (Agdia - catálogos nºs CAB 14800, ECA 14800, PSA 14800 e SRA 14800) para a confirmação de sua identidade.

## **2.5.4 Preservação dos isolados**

Os isolados utilizados foram preservados sob tampão fosfato, por meio de dessecação em papel de filtro e sob óleo mineral.

### **2.5.4.1 Preservação sob tampão fosfato**

A solução tampão foi preparada através da adição de 0,3g de  $K_2HPO_4$  e 0,2g de  $KH_2PO_4$  em 200 mL de água destilada. Após autoclavagem pipetou-se aproximadamente 1 mL da solução tampão para frascos plásticos com capacidade para 1,5 mL (tipo Eppendorf) esterilizados em autoclave, a 120°C e 1 atm por 20 minutos e secos em estufa a 32°C.

Em seguida, os isolados cultivados em placas de Petri contendo meio NA foram transferidos para a solução tampão (já contida nos frascos plásticos (tipo Eppendorf) estéreis, com capacidade para 1,5 mL). Os frascos foram então tampados, vedados com filme de PVC e armazenados a temperatura ambiente.

### **2.5.4.2 Dessecação em papel de filtro**

Este método foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por Takatsu (1980, *apud* MARIANO et al., 2005).

- a) Os isolados de Aac foram cultivados em meio YDC durante 4 dias;
- b) Soluções autoclavadas de peptona-gelatina (peptona 5% + gelatina 3%) e de dextrose (8%), 0,5 mL de cada, foram transferidas para tubos de ensaio, previamente esterilizados;
- c) A massa bacteriana cultivada em meio YDC (item (a)) foi raspada com alça de níquel-cromo estéril e transferida para o tubo de ensaio contendo o meio de peptona-gelatina-dextrose. Esta massa foi desfeita neste meio através de movimentos rápidos da alça. Esta operação foi repetida até a obtenção de uma suspensão bastante densa e viscosa;

- d) Tirinhas de papel de filtro Whatman nº1 (30x5mm), colocadas em placas de Petri (15 a 20 por placa), foram previamente autoclavadas e secas em estufa. Em seguida a suspensão bacteriana foi transferida, com pipeta estéril, para as tirinhas de papel de filtro;
- e) Em placa previamente esterilizada foram colocados 12g de sílica gel e, sobre a sílica gel, uma folha de papel circular de 9 cm de diâmetro, também esterilizada previamente. Sobre a folha, foi colocado um suporte de vidro (lâmina) previamente flambado;
- f) As tirinhas embebidas foram transferidas para o suporte de vidro, uma a uma, com pinça de ponta fina. A pinça foi flambada periodicamente para evitar contaminação;
- g) A placa foi então tampada e vedada com filme de PVC, permanecendo em condições ambiente por 4 dias;
- h) Papel alumínio foi cortado em retângulos de aproximadamente 6 x 4 cm, dobrados em forma de envelope e esterilizados rapidamente na chama;
- i) As tirinhas secas foram transferidas para o envelope de alumínio que, em seguida, foi fechado e etiquetado;
- j) O envelope de alumínio foi colocado em um vidro de boca larga com tampa de pressão, contendo sílica gel, e foi guardado na geladeira;
- k) Uma tirinha foi transferida para placa de Petri contendo meio NA e mantida por 3 dias a 28°C, para recuperação da bactéria, para confirmação de que o material se encontrava bem preservado.

#### **2.5.4.3 Preservação sob óleo mineral**

Frascos de penicilina contendo aproximadamente 5 mL de meio NA foram autoclavados. Após a solidificação do meio, os isolados cultivados em placas de Petri contendo meio NA foram transferidos para os frascos, que então permaneceram a 28°C por 48 horas. Em seguida foi adicionado, em cada frasco, óleo mineral (Nujol) estéril até a cobertura completa da superfície do meio de cultura. Os frascos foram então tampados, vedados com filme de PVC e armazenados a temperatura ambiente.

### **2.5.5 Origem das amostras de sementes de melão**

Devido às dificuldades para obtenção de sementes diretamente de empresas produtoras e comercializadoras de sementes de melão, optou-se pela retirada de sementes de frutos adquiridos em supermercado.

Frutos de melão de diversas cultivares e origens - amarelo (das marcas Soagri - RN e Oriente – Baraúna - RN), Gália (da marca Nolem - CE), Verde (da marca Fantástico – Baraúna - RN) e Orange - foram adquiridos em supermercado. Estes frutos foram lavados com sabão e água corrente e depois desinfestados superficialmente através da imersão em hipoclorito de sódio a 3% por 3 minutos. Os frutos foram secos com papel toalha e em seguida, com uma faca flambada, cortados no sentido longitudinal.

As sementes foram retiradas com ajuda de uma colher previamente flambada e lavadas com água destilada estéril para a retirada do excesso de mucilagem. Em seguida foram colocadas para secar sobre papel tipo germibox, dentro de placas gerbox, e mantidas em condições ambientes.

### **2.5.6 Isolamento de fungos associados a sementes de melão**

Para a detecção e identificação dos fungos associados a sementes de melão foram utilizadas 100 sementes de cada fruto. Estas foram dispostas em placas de Petri (plástico), sobre 3 folhas de papel de filtro umedecidas em água destilada, totalizando 10 sementes por placa, e 10 placas por fruto.

As placas foram mantidas em câmara de incubação ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente / 12 horas de escuro) por 7 dias; após esse período procedeu-se à avaliação com a ajuda de microscópio estereoscópico e microscópio óptico.

Os fungos identificados foram isolados em meio de batata-dextrose-agar (BDA) e preservados sob óleo mineral, para posterior utilização no teste de fungitoxicidade.

### **2.5.7 Preservação de fungos associados a sementes de melão**

Frascos de penicilina contendo aproximadamente 5 mL de meio BDA foram autoclavados. Após a solidificação do meio, os fungos (isolados no item 2.5.6) cultivados em placas de Petri contendo meio BDA foram repicados para os frascos, que então permaneceram em câmara de incubação ( $20\pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente / 12 horas de escuro) até a colônia atingir toda a superfície do meio. Em seguida foi adicionado, em cada frasco, óleo mineral (Nujol) estéril até a cobertura completa da superfície do meio de cultura. Os frascos foram então tampados, vedados com filme de PVC e armazenados a temperatura ambiente.

### **2.5.8 Avaliação do efeito dos fungicidas selecionados sobre os isolados de Aac**

Para o controle do crescimento fúngico em meio de cultura, 7 fungicidas foram selecionados, com base na literatura disponível. Os fungicidas utilizados foram: benomil (Benlate 500), iprodione (Rovral SC), triadimenol (Baytan SC), clorotalonil (Daconil PM), tiram (Rodhiauram SC), e carboxim+tiram (Vitavax+Thiram 200 SC), na concentração de 100 ppm e nistatina, na concentração de 100 e 200 ppm.

Para cada fungicida (com exceção da nistatina), foi preparada uma solução estoque de concentração de 10000 ppm. Foi pipetado 1 mL da solução estoque em 99 mL de meio NA autoclavado, quando este atingiu uma temperatura média de  $50^\circ\text{C}$ , obtendo-se um meio com 100 ppm de fungicida. Este meio foi agitado manualmente para que o fungicida se misturasse por igual e em seguida vertido em 5 placas de Petri esterilizadas (para a obtenção de 5 repetições). As placas foram identificadas e mantidas em temperatura ambiente até a instalação do teste.

A nistatina foi dissolvida em água, de modo que após ser incorporada ao meio NA autoclavado (quando este se encontrava a aproximadamente  $50^\circ\text{C}$ ), foram obtidas concentrações de 100 e 200 ppm. O meio foi agitado manualmente para que a nistatina se misturasse por igual e em seguida vertido em 5 placas de Petri esterilizadas (para



cada concentração). As placas foram identificadas e mantidas em temperatura ambiente até a instalação do teste.

Como testemunha foram vertidos 100 mL de meio NA sem fungicida, em 5 placas de Petri. De maneira geral, foram obtidas 5 placas para cada concentração de fungicida / isolado.

Para cada isolado foi preparada uma suspensão com  $10^3$  UFC/mL. De cada suspensão foram transferidas alíquotas de 100 $\mu$ L para placas de Petri (5 repetições) contendo o meio com fungicida nas concentrações determinadas acima, sendo em seguida espalhada com ajuda de uma alça de Drigalsky e incubadas a 28°C por 48 horas. A avaliação foi realizada através da contagem do número de colônias presentes em cada placa.

### **2.5.9 Teste de fungitoxicidade *in vitro***

Os fungos, preservados sob óleo mineral, foram recuperados em meio BDA e submetidos ao teste de fungitoxicidade, para diferenciar os fungicidas mais eficientes para inibir o desenvolvimento destes fungos em meio de cultura. Para este teste foram utilizados os fungicidas que não apresentaram inibição no crescimento dos isolados de Aac (item 2.5.8).

Os fungicidas utilizados foram: benomil (Benlate 500), iprodione (Rovral SC), triadimenol (Baytan SC) e clorotalonil (Daconil PM), nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm, e nistatina, nas concentrações de 50, 100 e 200 ppm.

Para cada fungicida (com exceção da nistatina), foram preparadas soluções estoques de concentrações 100 (III), 1000 (II) e 10000 (I) ppm.

Foi pipetado 1 mL da solução estoque III em 99 mL de meio NA autoclavado, quando este atingiu uma temperatura média de 50°C, obtendo-se um meio com 1 ppm de fungicida. Este meio foi agitado manualmente para que o fungicida se misturasse por igual e em seguida vertido em 5 placas de vidro esterilizadas (para a obtenção de 5 repetições). As placas foram identificadas e mantidas em temperatura ambiente até a instalação do teste.

Em seguida, foi pipetado 1 mL da solução estoque II em 99 mL de meio NA autoclavado, e seguiu-se da mesma forma descrita anteriormente. Neste caso foi obtido um meio com 10 ppm de fungicida.

Por último foi pipetado 1 mL da solução estoque I em 99 mL de meio NA autoclavado e, novamente, seguiu-se os mesmos passos realizados para a solução estoque III, obtendo-se, neste caso, um meio com 100 ppm de fungicida.

A nistatina foi dissolvida em água, de modo que, após ser incorporada ao meio NA autoclavado (quando este se encontrava a aproximadamente 50°C,) foram obtidas concentrações de 50, 100 e 200 ppm. O meio foi agitado manualmente para que a nistatina se misturasse por igual e em seguida vertido em 5 placas de Petri esterilizadas. As placas foram identificadas e mantidas em temperatura ambiente até a instalação do teste.

Como testemunha foi vertido 100 mL de meio NA sem fungicida, em 5 placas de vidro. Este procedimento foi repetido para todos os isolados.

No dia seguinte foi repicado, para cada placa, um disco de 0,6 cm de diâmetro

e, em seguida, realizou-se uma filtração em gaze de algodão estéril para retenção de sementes e impurezas maiores. Os extratos obtidos foram centrifugados a 10000xG (8000 rpm obtido com rotor GSA Sorvall) por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante, para cada amostra, foi suspenso em 3,0 mL de solução salina a 0,85% estéril (OLIVEIRA, 1995, modificado).

Em seguida foi realizada uma diluição em série até  $10^{-8}$  (em PBS) e pipetou-se 100 $\mu$ L das diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  para placas de Petri contendo meio NA (3 repetições), onde, com a ajuda da alça de Drigalsky, as suspensões foram homogeneamente distribuídas.

As placas foram incubadas em estufa, a 28°C, por 48 horas. Colônias com características distintas, que se formaram no meio, foram repicadas, individualmente, para placas de Petri contendo meio NA e incubadas em estufa a 28°C por 48 horas. Estas bactérias foram descritas e preservadas em tampão fosfato. Para todas as colônias foi realizado teste de Gram.

### **2.5.11 Antibiograma qualitativo para os isolados de Aac**

Todos os isolados de Aac foram submetidos ao teste de antibiograma qualitativo, que tem a finalidade de selecionar previamente qual ou quais antibióticos são incapazes de afetar o crescimento da bactéria em estudo em meio de cultura e ajam sobre outros microrganismos, possíveis contaminantes (SOARES, 1993).

Primeiramente, isolados de Aac preservados foram recuperados em meio NA. Após 24 horas, estes isolados foram repicados para frascos de vidro Erlenmeyer com capacidade para 250 mL estéreis, contendo 50 mL de nutriente líquido autoclavado, de modo a se obter uma concentração aproximada de  $10^6$  UFC/mL. Estes frascos foram incubados a 28°C por 24 horas e então se pipetou 100 $\mu$ L do conteúdo de cada frasco para placas de Petri contendo meio NA, homogeneizando-se o pipetado com a ajuda de alça de Drigalsky. Em seguida foram colocados sobre o meio 4 discos de antibióticos distintos (com 6mm de diâmetro cada), da marca Oxoid (Figura 1) e um disco de papel

de filtro Whatman nº1 (também com 6mm de diâmetro) estéril, como testemunha. Foram realizadas 5 repetições para cada antibiótico.



Figura 1 - Cartela contendo discos para antibiograma (Oxoid)

As placas foram incubadas a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48h, quando se observou a formação ou não de halos de inibição.

Os antibióticos avaliados foram: amikacina (AK), amoxicilina (AMO), ampicilina (AMP), aztreonam (ATM), bacitracina (BC), carbenicilina (CAR), cefaclor (CEC), cefalexina (CL), cefalotina (KF), cefixime (CFM), ceftazidime (CAZ), cefuroxima (CXM), ciprofloxacina (CIP), claritromicina (CLR), clindamicina (DA), gentamicina (CN), kanamicina (K), lincomicina (MY), mupirocina (MUP), netilmicina (NET), nitrofurantoina (F), norfloxacina (NOR), ofloxacina (OFX), oxacilina (OX), penicilina (P), rifampicina (RD), streptomomicina (S), sulfamethoxazole (RL), ticarcilina (TIC) e vancomicina (VA).

### **2.5.12 Antibiograma qualitativo para bactérias associadas a sementes de melão (Basm)**

Todos os isolados obtidos no item 2.5.10 foram submetidos ao teste de antibiograma qualitativo, através de procedimento idêntico ao realizado para os isolados de Aac. Neste caso só foram avaliados os antibióticos previamente selecionados no item 2.5.11.

### **2.5.13 Antibiograma quantitativo para os isolados de Aac**

Para a realização do antibiograma quantitativo, os isolados de Aac cultivados em meio NA sólido foram ressuspensos em solução salina (NaCl 0,85%) de modo a se obter uma concentração de  $3 \times 10^3$  UFC/mL. Uma alíquota de 100 $\mu$ L da suspensão foi semeada, por espalhamento em superfície, em placas de Petri contendo o meio NA com os antibióticos selecionados no item 2.5.12, nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 30 e 50  $\mu$ g/mL e em placas de Petri contendo apenas o meio NA (testemunha).

As placas foram incubadas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48h e avaliadas quanto ao número de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes no meio.

### **2.5.14 Antibiograma quantitativo para bactérias associadas a sementes de melão (Basm)**

Os isolados de Basm cultivados em meio NA foram ressuspensos em solução salina (NaCl 0,85%) de modo a se obter uma concentração de  $3 \times 10^3$  UFC/mL. Uma alíquota de 100 $\mu$ L da suspensão foi semeada por espalhamento em superfície em placas de Petri contendo o meio NA com os antibióticos e doses selecionados no item 2.5.13 e em placas de Petri contendo apenas o meio NA (testemunha).

As placas foram incubadas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48h e avaliadas quanto ao número de UFC presentes no meio.

### **2.5.15 Teste de urease**

É sabido que a bactéria Aac é capaz de produzir urease, uma enzima que decompõe a uréia com liberação de amônia. A constatação de atividade de urease é feita com indicadores para detectar o aumento do pH.

Todos os isolados de Aac e Basm foram submetidos ao teste de urease. Os isolados, cultivados em meio NA, foram repicados, com a ajuda de uma alça de níquel-

cromo esterilizada, para placas de Petri contendo o meio com indicador de pH (0,1% peptona, 0,5% cloreto de sódio, 0,2% fosfato de potássio monobásico, 2% ágar, 0,1% dextrose, 0,0012% vermelho fenol. Após autoclavado, foi adicionado 2% uréia filtrada). As placas foram incubadas a  $28\pm 1^\circ\text{C}$  durante 96h e avaliadas quanto à alteração de cor do meio.

#### **2.5.16 Teste da hidrólise de amido**

O amido é um carboidrato complexo, composto de dois polissacarídeos - amilose e amilopectina - geralmente nas proporções 1:4 ou 1:5. Ao reagir com iodo forma um complexo de cor azul. Se não houver produção de amilase, toda a placa fica azul, mas se houver, a amilase difunde-se no ágar e hidrolisa o amido ao redor da

### **2.5.18 Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua supressividade e repressividade**

Entende-se por supressividade a capacidade que um meio possui de inibir o crescimento da flora microbiota, que não o organismo que se deseja isolar, e por repressividade a capacidade que um meio possui de inibir o crescimento do organismo que se quer isolar.

#### **2.5.18.1 Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua supressividade (de acordo com OLIVEIRA, 1995)**

Para a determinação do índice de supressão (IS) realizou-se a extração de microrganismos associados a sementes de melão de 6 amostras diferentes (conforme descrito no item 2.5.10)

Após a centrifugação e ressuspensão do sedimento em PBS, uma diluição em série de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ , também em PBS, foi realizada. Foram plaqueadas por espalhamento com espátula de Drigalsky, à base de 100 $\mu$ L/placa, no meio semi-seletivo desenvolvido, bem como no meio básico (NA) as diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ . Foram realizadas três repetições para cada amostra. As placas foram incubadas a 28°C e, após 24-48 horas, a avaliação do crescimento da flora microbiana associada às sementes de melão foi realizada.

A avaliação consistiu em determinar o crescimento de Aac e de outros microrganismos no meio idealizado e no meio básico (NA), de modo a se caracterizar a seletividade do meio desenvolvido.

#### **2.5.18.2 Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua repressividade (de acordo com OLIVEIRA, 1995)**

Células de Aac com 36 h de cultivo foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) estéril. A suspensão foi diluída em série, também em solução salina estéril. Realizou-se o plaqueamento de 100 $\mu$ L de cada diluição no meio semi-seletivo

desenvolvido e no meio básico (NA). As placas foram incubadas a 28°C e, após 48-96 horas, a contagem do número de colônias de Aac em cada meio foi realizada. A repressividade (R) foi determinada pela fórmula:

$R = (\text{média do número de colônias no meio semi-seletivo desenvolvido} / \text{média do número de colônias no meio básico}) \times 100$

#### **2.5.19 Detecção de Aac pela deposição das sementes em meio semi-seletivo**

Foram utilizadas 400 sementes de cada amostra. As sementes foram depositadas em placas de Petri contendo o meio semi-seletivo desenvolvido. Em cada placa foram depositadas 4 sementes supostamente sadias uniformemente espaçadas e 1 semente inoculada artificialmente, pelo método a vácuo, para controle positivo. As sementes artificialmente inoculadas com Aac utilizadas neste trabalho foram cedidas pela Dra. Rosa L. R. Mariano, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Após o semeio as placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de crescimento bacteriano ao redor das sementes. Todas as colônias típicas de Aac foram repicadas para placas de Petri contendo meio NA e as culturas submetidas aos testes de Gram e patogenicidade para confirmação da identidade da bactéria.

#### **2.5.20 Detecção de Aac pelo método de extração e semeio em meio semi-seletivo**

Para cada isolado foi adicionada uma semente inoculada artificialmente em 499 sementes supostamente sadias, uma semente inoculada artificialmente em 999 sementes supostamente sadias e uma semente inoculada artificialmente em 1999 sementes supostamente sadias. Realizou-se a extração de Aac de sementes de melão artificialmente inoculadas e não inoculadas, conforme método já descrito anteriormente (item 2.5.10). Após a centrifugação e ressuspensão do sedimento, foi realizada uma diluição em série de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . As diluições obtidas foram semeadas por espalhamento com espátula de Drigalsky, à base de 100µL/placa, no meio semi-seletivo desenvolvido.



Foram realizadas 5 repetições para cada amostra. As placas foram incubadas a 28°C e, após 24-48 horas, a avaliação foi realizada através da presença de Aac no meio semi-seletivo.

## 2.6 Resultados e discussão

### 2.6.1 Teste de patogenicidade dos isolados

Todos os isolados foram submetidos ao teste de hipersensibilidade (RH) em plantas (folhas) de fumo. Os isolados que apresentaram reação de hipersensibilidade em folhas de fumo foram também submetidos ao teste de patogenicidade em plântulas de melão. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Teste de patogenicidade dos isolados de Aac

Isolados	Reação de hipersensibilidade em folhas de fumo	Sintomas característicos de mancha-aquosa em plântulas de melão
Aac1	+	+
Aac2	+	+
Aac3	+	+
Aac4	+	+
Aac5	+	+

(+) = resultado positivo

Todos os isolados de Aac apresentaram reação de hipersensibilidade em folhas de fumo (Figura 2) e sintomas característicos de mancha-aquosa-do-melão em folhas e cotilédones de plântulas de melão.

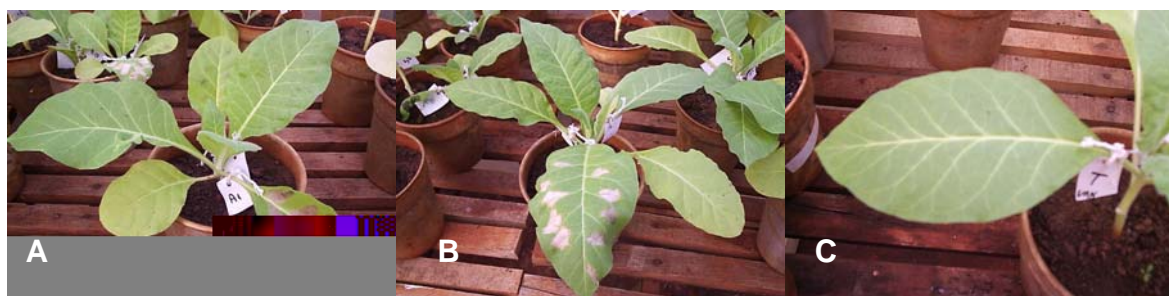


Figura 2 - Folhas de fumo com reação de hipersensibilidade causada pela bactéria Aac (A) e (B); testemunha (C)

### 2.6.2 Confirmação da identidade dos isolados de Aac

Os resultados do teste de DAS ELISA encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Teste de ELISA para confirmação da identidade dos isolados de Aac

Isolados	Reação
Aac1	+
Aac2	+
Aac3	+
Aac4	+
Aac5	+

(+) = resultado positivo

Todos os isolados submetidos ao teste de DAS ELISA para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, conforme protocolo estabelecido pelo fabricante, apresentaram resultado positivo, confirmando serem pertencentes à espécie *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.

### 2.6.3 Isolamento de fungos associados a sementes de melão

Os fungos detectados nas sementes foram: *Cladosporium cucumerinum* (Clad.), *Fusarium semitectum* (Fus.), *Epicocum* sp. (Epic.), *Penicillium* sp. (Pen), *Drechslera* sp. (Drech.), *Curvularia* sp. (Curv.), *Rhizopus* sp. (Rhiz.), *Macrophomina* sp. e um fungo ainda não identificado (NI).

### 2.6.4 Avaliação do efeito dos fungicidas selecionados sobre os isolados de Aac

Os fungicidas selecionados para o teste de fungitoxicidade *in vitro* foram avaliados quanto à inibição do crescimento de Aac no meio de cultura. Foram avaliados os seguintes fungicidas: benomil (Benlate 500), iprodione (Rovral SC), triadimenol (Baytan SC), clorotalonil (Daconil PM), tiram (Rodhiauram SC) e carboxim+tiram (Vitavax+Thiram 200 SC) na concentração de 100 ppm e nistatina nas concentrações de 100 e 200 ppm. Os resultados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeito\* dos fungicidas selecionados sobre os isolados de Aac

	Aac1	Aac2	Aac3	Aac4	Aac5
Testemunha	-	-	-	-	-
Benomil	-	-	-	-	-
Iprodione	-	-	-	-	-
Triadimenol	-	-	-	-	-
Clorotalonil	-	-	-	-	-
Tiram	+	+	+	+	+
Carboxim+tiram	+	+	+	+	+
Nistatina 200ppm	-	-	-	-	-
Nistatina 100ppm	-	-	-	-	-

\* (-) crescimento normal de Aac; (+) inibição do crescimento de Aac

Embora o intuito deste estudo fosse quantitativo, em todos os tratamentos, com exceção dos correspondentes aos fungicidas tiram e carboxim+tiram na concentração de 100ppm, houve crescimento superior a 300 UFC/placa, o que impossibilitou a contagem das mesmas. No entanto, como não houve diferença visual entre estes tratamentos e a testemunha, com exceção dos fungicidas tiram e carboxim+tiram na concentração de 100ppm, concluiu-se que estes fungicidas poderiam ser utilizados como componentes do meio de cultura semi-seletivo sem prejuízo para o microrganismo alvo.

Os fungicidas tiram (Rodhiauram SC) e carboxim+tiram (Vitavax+Thiram 200 SC), na concentração de 100 ppm, inibiram o crescimento de Aac, sendo então descartados.

### 2.6.5 Teste de fungitoxicidade *in vitro*

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Percentagem de inibição de crescimento (PIC%) das colônias fúngicas por fungicidas – em três doses

	<i>Rhiz.</i>	<i>Drech.</i>	<i>Epic.</i>	<i>Clad.</i>	<i>Macr.</i>	<i>Curv.</i>	<i>NI</i>	<i>Pen.</i>	<i>Fus.</i>
N 200 ppm	77,4	95,4	92,1	100,0	*	94,7	94,5	64,5	0,0
N 100 ppm	37,2	90,5	90,5	100,0	*	86,4	94,9	33,3	0,0
N 50 ppm	6,3	33,2	86,3	80,4	*	18,0	59,2	14,0	0,0
Td 100 ppm	0,0	100,0	32,4	100,0	100,0	98,6	100,0	58,0	100,0
Td 10 ppm	0,0	100,0	0,0	54,3	87,9	60,8	100,0	11,1	94,5
Td 1 ppm	0,0	79,8	0,0	31,4	43,0	46,1	27,4	7,6	81,0
Be 100 ppm	0,0	77,4	100,0	22,9	97,6	89,5	100,0	98,2	100,0
Be 10 ppm	0,0	2,4	100,0	60,0	97,4	61,8	100,0	92,4	100,0
Be 1 ppm	0,0	0,0	2,8	22,9	95,5	24,7	96,4	98,2	95,2
Cl 100 ppm	0,0	60,7	0,0	42,9	10,1	48,8	27,4	47,3	32,9
Cl 10 ppm	0,0	35,7	0,0	37,1	5,4	59,4	20,4	35,7	19,0
Cl 1 ppm	0,0	1,2	0,0	54,3	2,7	44,1	17,5	8,6	9,1
Ip 100 ppm	0,0	98,8	62,0	74,3	19,4	81,2	34,7	58,5	43,9
Ip 10 ppm	0,0	98,8	67,6	77,1	1,0	95,1	23,0	48,1	15,4
Ip 1 ppm	0,0	64,3	9,9	34,3	7,7	75,6	0,0	12,4	9,2

(N) = nistatina; (Td) = triadimenol; (Be) = benomil; (Cl) = clorotalonil; (Ip) = iprodione

(\*) = dados não obtidos

De acordo com a Tabela 4 pode-se observar que os fungicidas nistatina (200ppm), triadimenol (100ppm) e benomil (100ppm) apresentaram controle satisfatório da maioria dos fungos avaliados.

O fungicida nistatina a 200 ppm apresentou controle satisfatório da maioria dos fungos avaliados, com exceção de *Penicillium* sp. e *Fusarium semitectum*, porém foi o único fungicida que apresentou controle satisfatório do fungo *Rhizopus* sp.

O fungicida benomil, nas três concentrações avaliadas, controlou satisfatoriamente o crescimento dos fungos *Macrophomina* sp., NI, *Penicillium* sp. e *Fusarium semitectum* e nas concentrações de 10 e 100 ppm, controlou satisfatoriamente também o crescimento de *Epicocum* sp..

Os fungicidas clorotalonil e iprodione apresentaram baixa inibição no crescimento dos fungos avaliados.

Deste modo, os fungicidas nistatina, na dose de 200 ppm e benomil, na dose de 100 ppm, foram selecionados.

#### **2.6.6 Isolamento de bactérias associadas a sementes de melão**

Oito isolados distintos de bactérias foram obtidos de sementes de melão. Estas bactérias associadas às sementes de melão (Basm) podem dificultar a identificação de Aac em meio de cultura.

As características destes isolados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Características dos isolados bacterianos associados a sementes de melão

Isolado	Características
Basm1	colônia amarela escura, de aspecto aquoso, Gram negativa
Basm2	colônia creme, achatada, uniforme, Gram positiva
Basm3	colônia amarela, de aspecto aquoso, Gram negativa
Basm4	colônia branca, de aspecto enrugado, Gram negativa
Basm5	colônia branca, achatada, Gram negativa
Basm6	colônia amarela, convexa, Gram negativa
Basm7	colônia branca, achatada, Gram positiva
Basm8	colônia branca, convexa, Gram negativa

### 2.6.7 Antibiograma qualitativo para os isolados de Aac

Os resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Efeito dos antibióticos no crescimento de Aac

Antibióticos	Aac1	Aac2	Aac3	Aac4	Aac5
Amikacina	+	+	+	+	+
Amoxicilina	-	-	-	-	-
Ampicilina	-	-	-	-	-
Aztreonam	+	+	+	+	+
Bacitracina	+	+	+	+	+
Carbenicilina	-	-	-	-	-
Cefaclor	-	-	-	-	-
Cefalexina	-	-	-	-	-
Cefalotina	-	-	-	-	-
Cefixime	-	-	-	-	-
Cefoxitina	+	+	+	+	+
Ceftazidime	+	+	+	+	+
Cefuroxima	+	+	+	+	+
Ciprofloxacina	+	+	+	+	+
Clarithromicina	+	+	+	+	+
Clindamicina	-	-	-	-	-
Gentamicina	+	+	+	+	+

(conclusão)

Antibióticos	Aac1	Aac2	Aac3	Aac4	Aac5
Kanamicina	+	+	+	+	+
Lincomicina	-	-	-	-	-
Mupirocina	+	+	+	+	+
Netilmicina	+	+	+	+	+
Nitrofurantoina	+	+	+	+	+
Norfloxacina	+	+	+	+	+
Ofloxacina	+	+	+	+	+
Oxacilina	-	-	-	-	-
Penicilina	+	+	+	+	+
Rifampicina	+	+	+	+	+
Streptomicina	+	+	+	+	+
Sulfamethoxazole	+	+	+	+	+
Ticarcilina	-	-	-	-	-
Vancomicina	+	+	+	+	+

(-) = ausência de halo de inibição; (+) = presença de halo de inibição

Não houve variação entre isolados de Aac quanto à sensibilidade a antibióticos.

Dos antibióticos avaliados, ampicilina (AMP), amoxicilina (AMO), carbenicilina (CAR), cefaclor (CEC), cefalexina (CL), cefixime (CFM), clindamicina (DA), cefalotina (KF), lincomicina (MY), oxacilina (OX) e ticarcilina (TIC) não inibiram o crescimento de Aac, não apresentando halo de inibição. Estes antibióticos foram selecionados para teste de antibiograma qualitativo para os isolados de bactérias associadas às sementes de melão (Basm). Os demais antibióticos inibiram o crescimento dos isolados de Aac (Figura 3), sendo então descartados.

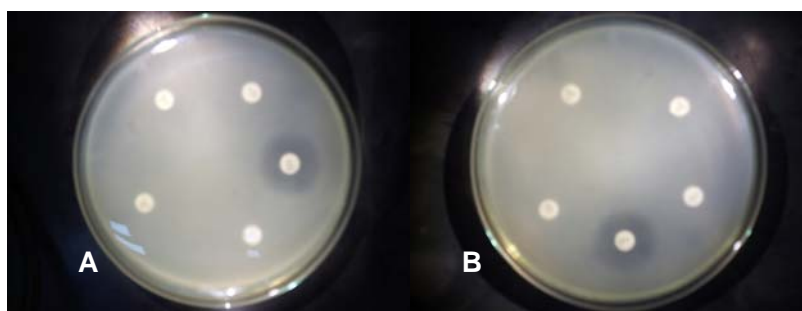


Figura 3 - Halo de inibição de crescimento causado pelos antibióticos amikacina (A) e bacitracina (B)

### 2.6.8 Antibiograma qualitativo para as bactérias associadas às sementes de melão (Basm)

Os oito isolados (Basm) obtidos no item 2.5.10 foram submetidos ao teste de antibiograma qualitativo, idêntico ao realizado para os isolados de Aac. Neste caso só foram avaliados os antibióticos: ampicilina (AMP), amoxicilina (AMO), carbenicilina (CAR), cefaclor (CEC), cefalexina (CL), cefixime (CFM), clindamicina (DA), cefalotina (KF), lincomicina (MY), oxacilina (OX) e ticarcilina (TIC), pois estes não inibiram o crescimento dos isolados de Aac.

Os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Efeito de antibióticos no crescimento das bactérias associadas a sementes de melão (Basm)

Antibiótico	Isolados							
	Basm1	Basm2	Basm3	Basm4	Basm5	Basm6	Basm7	Basm8
Amoxicilina	+	+	+	-	+	+	+	-
Ampicilina	+	+	+	-	+	-	-	-
Carbenicilina	+	-	+	-	+	-	-	+
Cefaclor	+	+	+	-	-	-	-	-
Cefalexina	+	+	+	-	+	+	+	-
Cefalotina	+	+	+	-	+	+	+	-
Cefuroxima	+	-	+	-	+	-	-	+
Clindamicina	+	+	-	-	-	+	+	-
Lincomicina	+	+	-	-	+	-	+	-
Ticarcilina	+	+	-	-	+	+	-	-
Oxacilina	+	-	-	-	-	-	-	-

(-) = ausência de halo de inibição; (+) = presença de halo de inibição

O isolado Basm1 teve seu crescimento inibido por todos os antibióticos testados, enquanto que o isolado Basm4 não teve seu crescimento inibido por nenhum.

Os antibióticos amoxicilina, cefalexina e cefalotina controlaram o crescimento bacteriano da maioria dos isolados de Basm, seguidos por ampicilina, carbenicilina



(Figura 4), cefuroxima, clindamicina, lincomicina e ticarcilina. O antibiótico oxacilina inibiu apenas o crescimento do isolado Basm1.



Figura 4 - Halo de inibição de crescimento do isolado Basm8 causado pelos antibióticos carbenicilina (A) e cefuroxima (B)

### 2.6.9 Antibiograma quantitativo para os isolados de Aac

Devido à impossibilidade de obtenção dos antibióticos cefalotina, carbenicilina, cefuroxima, clindamicina, lincomicina e ticarcilina para a realização do antibiograma quantitativo, apenas os antibióticos amoxicilina, ampicilina, cefalexina e clindamicina foram avaliados. Os resultados encontram-se nas Tabelas 8 a 11.

Tabela 8 - Efeito do antibiótico amoxicilina no crescimento dos isolados de Aac (UFC)

Dose $\mu\text{g/mL}$	UFC/placa*				
	Aac1	Aac2	Aac3	Aac4	Aac5
0	133a**	140a	137a	132a	135a
1	133a	139a	137a	132a	135a
5	132a	139a	136a	131a	134a
10	130a	138ab	136a	131a	134a
15	129a	138ab	135ab	130a	134a
20	128a	134b	133b	127b	131ab
30	123b	126c	130c	121c	129b
50	109c	105d	112d	109d	103c

\* média de 3 repetições

\*\*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%

Tabela 9 - Efeito do antibiótico ampicilina no crescimento dos isolados de Aac (UFC)

Dose $\mu\text{g/mL}$	UFC/placa*				
	Aac1	Aac2	Aac3	Aac4	Aac5
0	134a**	145a	130a	134a	138a
1	134a	140ab	127a	129ab	138ab
5	123bc	137abc	130a	126b	132bc
10	126b	140ab	127a	125bc	133bc
15	135a	139abc	120b	122cd	129c
20	127b	137abc	97c	119de	128c
30	117c	134bc	85d	115e	119d
50	112d	129c	82d	103f	108e

\* média de 3 repetições

\*\*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%

Tabela 10 - Efeito do antibiótico cefalexina no crescimento dos isolados de Aac (UFC)

Dose $\mu\text{g/mL}$	UFC/placa*				
	Aac1	Aac2	Aac3	Aac4	Aac5
0	123a**	145a	139a	122a	136a
1	102b	116b	111b	105b	113b
5	0c	0c	0c	0c	0c
10	0c	0c	0c	0c	0c
15	0c	0c	0c	0c	0c
20	0c	0c	0c	0c	0c
30	0c	0c	0c	0c	0c
50	0c	0c	0c	0c	0c

\* média de 3 repetições

\*\*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%

Tabela 11 - Efeito do antibiótico clindamicina no crescimento dos isolados de Aac (UFC)

Dose $\mu\text{g/mL}$	UFC/placa*				
	Aac1	Aac2	Aac3	Aac4	Aac5
0	120a**	133a	124a	121a	127a
1	122a	131ab	126a	121a	125a
5	123a	127bc	126a	120a	125a
10	122a	127bc	124a	117ab	123ab
15	115b	122cd	124a	118ab	120ab
20	109c	125cd	125a	118ab	123ab
30	100d	121de	119a	112bc	117b
50	100d	117e	114a	109c	108c

\* média de 3 repetições

\*\*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%

O antibiótico cefalexina, a partir da dose de 5  $\mu\text{g/mL}$ , apresentou inibição do crescimento de Aac. Os demais antibióticos, nas doses de 1 a 20  $\mu\text{g/mL}$ , foram então utilizados no teste de antibiograma quantitativo para Basm.

#### 2.6.10 Antibiograma quantitativo para as bactérias associadas às sementes de melão (Basm)

O efeito de antibióticos sobre bactérias associadas a sementes de melão (Basm) está apresentado nas Tabelas 12, 13 e 14.

Tabela 12 - Efeito do antibiótico clindamicina no crescimento dos isolados de Basm (UFC/placa)

Dose $\mu\text{g/mL}$	Isolados (UFC/placa*)							
	Basm1	Basm2	Basm3	Basm4	Basm5	Basm6	Basm7	Basm8
0	>300a**	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a
1	90b	115b	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a
5	0c	0c	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a
10	0c	0c	278b	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a
15	0c	0c	267c	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a
20	0c	0c	267c	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a

\* média de 3 repetições

\*\*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%

Tabela 13 - Efeito do antibiótico ampicilina no crescimento dos isolados de Basm (UFC/placa)

Dose $\mu\text{g/mL}$	Isolados (UFC/placa*)							
	Basm1	Basm2	Basm3	Basm4	Basm5	Basm6	Basm7	Basm8
0	>300a**	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a
1	1b	2b	6b	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a
5	0b	0b	0d	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a
10	0b	0b	3bc	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a
15	0b	0b	2c	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a
20	0b	0b	0d	>300a	>300a	>300a	>300a	>300a

\* média de 3 repetições

\*\*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%

Tabela 14 - Efeito do antibiótico amoxicilina no crescimento dos isolados de Basm (UFC/placa)

Dose $\mu\text{g/mL}$	Isolados (UFC/placa*)							
	Basm1	Basm2	Basm3	Basm4	Basm5	Basm6	Basm7	Basm8
0	>300a**	>300a	>300a	>300a	>300 <sup>a</sup>	>300a	>300a	>300a
1	0b	0b	0b	>300a	>300 <sup>a</sup>	>300a	>300a	>300a
5	0b	0b	0b	>300a	>300 <sup>a</sup>	>300a	>300a	>300a
10	0b	0b	0b	>300a	>300 <sup>a</sup>	>300a	>300a	>300a
15	0b	0b	0b	>300a	>300 <sup>a</sup>	>300a	>300a	>300a
20	0b	0b	0b	>300a	>300 <sup>a</sup>	>300a	>300a	>300a

\* média de 3 repetições

\*\*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%

O antibiótico clindamicina, a partir de 5  $\mu\text{g/mL}$ , inibiu completamente o crescimento bacteriano dos isolados Basm1 e Basm2; o antibiótico ampicilina, a partir de 1  $\mu\text{g/mL}$ , inibiu satisfatoriamente o crescimento bacteriano dos isolados Basm1, Basm2 e Basm3 e o antibiótico amoxicilina, a partir de 1  $\mu\text{g/mL}$ , inibiu completamente o crescimento bacteriano dos isolados Basm1, Basm2 e Basm3. O crescimento bacteriano dos isolados Basm4, Basm5, Basm6, Basm7 e Basm8 não foi inibido por nenhum antibiótico, em nenhuma das doses avaliadas.

Como não se obteve, somente com os fungicidas e antibióticos avaliados, a seletividade esperada do meio semi-seletivo em desenvolvimento e sabendo-se que a bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* é urease positiva, a alteração de cor do meio em resposta a essa característica foi avaliada, buscando a diferenciação dos isolados de Aac.

### 2.6.11 Teste de urease

Os resultados do teste de urease para Aac e Basm são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Atividade de urease nos isolados de Aac e Basm

Isolados	Reação
Aac1	+
Aac2	+
Aac3	+
Aac4	+
Aac5	+
Basm1	+
Basm2	+
Basm3	-
Basm4	-
Basm5	-
Basm6	-
Basm7	-
Basm8	-

Todos os isolados de Aac e os isolado Basm1 e Basm2 apresentaram atividade de urease. É sabido que a bactéria Aac é capaz de produzir urease (SCHAAD et al., 2000), uma enzima que decompõe a uréia com liberação de amônia. A alcalinização do meio pela liberação de amônia converte a cor do meio semi-seletivo que passa de amarelo a rosa (Figura 5), por ação de um indicador de pH, o vermelho de fenol. Esta característica é importante, pois pode auxiliar na diferenciação dos isolados de Aac dos isolados Basm resistentes ao antibiótico selecionado para compor o meio semi-seletivo (Figura 6).

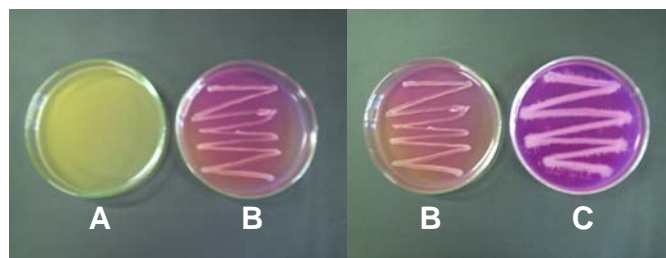


Figura 5 - Mudança de cor do meio devido à alcalinização decorrente da decomposição da uréia e liberação de amônia. (A) meio não cultivado, (B) meio cultivado com Aac, (C) meio cultivado com Basm2

Desta forma, o teste de urease permite distinguir Aac das Basm4 a Basm8, complementando a distinção de Aac das Basm1 a Basm3 proporcionado pela amoxicilina.

### 2.6.12 Teste da hidrólise de amido

Os resultados encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16 - Atividade de amilase nos isolados de Aac e Basm

<b>Isolados</b>	<b>Hidrólise do amido</b>
Aac1	–
Aac2	–
Aac3	–
Aac4	–
Aac5	–
Basm1	–
Basm2	–
Basm3	–
Basm4	–
Basm5	–
Basm6	–
Basm7	+
Basm8	–

De todos os isolados avaliados, apenas o isolado Basm7 apresentou a capacidade de produzir amilase.

A incorporação de amido ao meio semi-seletivo também é uma opção quando a seletividade esperada do antibiótico com relação às bactérias não-alvo não é obtida, uma vez que, pela adição de iodo, pode-se distinguir, em placa, os isolados bacterianos amilolíticos dos não-amilolíticos. Neste caso, tanto os isolados Aac quanto Basm (com

exceção de Basm7) não apresentaram atividade amilolítica, não justificando a incorporação deste componente no meio semi-seletivo.

### 2.6.13 Avaliação do meio semi-seletivo desenvolvido

Como se pode observar na Figura 6, as bactérias resistentes ao antibiótico selecionado (amoxicilina) cresceram no meio semi-seletivo desenvolvido, porém somente os isolados de Aac alteraram a cor do meio de cultura, que passou de amarelo para rosa, fato que auxiliou na diferenciação dos isolados de Aac dos isolados Basm.

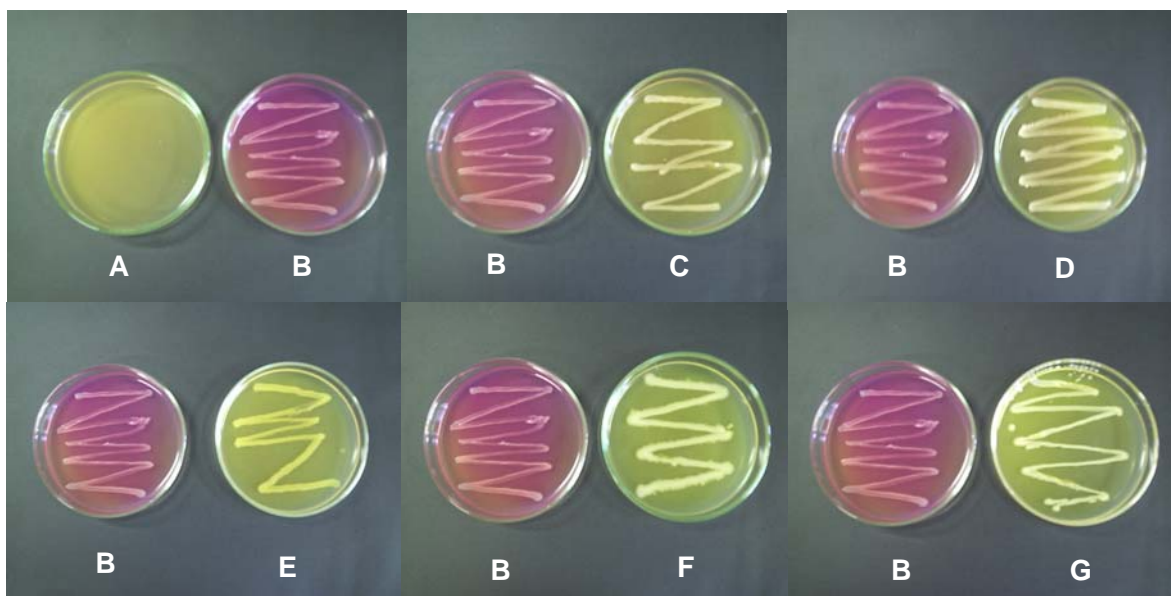


Figura 6 - Aspecto visual do meio semi-seletivo desenvolvido para detecção de Aac. Controle (A), meios cultivados com: Aac (B), Basm4 (C), Basm5 (D), Basm6 (E), Basm7 (F) e Basm8 (G)

### 2.6.14 Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua supressividade e repressividade

Entende-se por supressividade a capacidade que um meio possui de inibir o crescimento da flora microbiota, que não o organismo que se deseja isolar (SOARES, 1993), e por repressividade a capacidade que um meio possui de inibir o crescimento do organismo que se quer isolar (alvo).



### 2.6.14.1 Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua supressividade (de acordo com OLIVEIRA, 1995)

Os resultados encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17 - Número de colônias/placa\* (UFC) de bactérias extraídas de sementes de melão em meio sem restrição (NA) e no meio semi-seletivo desenvolvido

Amostra	Meio NA (testemunha)	Meio semi-seletivo*
1	>300	0
2	>300	209
3	>300	1
4	>300	228
5	>300	0
6	>300	0

\*Média de três repetições

Das amostras avaliadas as 2, 3 e 4 apresentaram crescimento bacteriano. O crescimento bacteriano das amostras 2 e 4 alteraram a coloração do meio semi-seletivo (Figura 7).

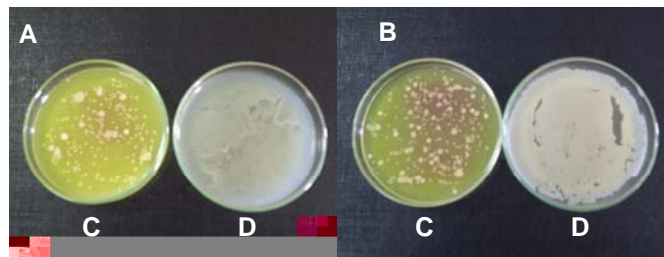


Figura 7 - Crescimento bacteriano das amostras 2 (A) e 4 (B) no meio semi-seletivo (C) e NA (D)

Duas espécies bacterianas Gram negativas foram distinguidas em ambas amostras, sendo que uma das colônias apresentava morfologia semelhante a *Aac*. Diante disto, colônias representativas das duas espécies foram isoladas em meio NA e no meio semi-seletivo. Apenas as colônias morfologicamente semelhantes a *Aac* induziram alteração de coloração do meio semi-seletivo e foram positivas ao teste de

patogenicidade em folhas de fumo (Figura 8), indicando que esta bactéria pode se tratar de um isolado de Aac.

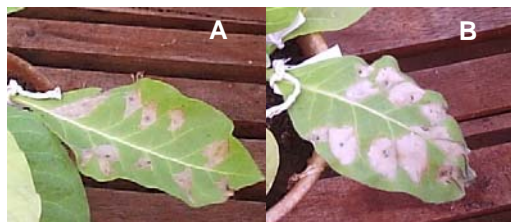


Figura 8 – Folhas de fumo com reação de hipersensibilidade causada pelas bactérias morfologicamente semelhantes à Aac. Amostra 2 (A) e 4 (B)

Os resultados obtidos neste teste indicam que o meio semi-seletivo foi supressivo para o crescimento de bactérias associadas à semente de melão.

#### 2.6.14.2 Avaliação do meio semi-seletivo quanto a sua repressividade (de acordo com OLIVEIRA, 1995)

A repressividade (R) foi determinada pela fórmula (1):

$$R = 100 - \left\{ \left[ \frac{\bar{X} \text{ n}^\circ \text{UFC mss}}{\bar{X} \text{ n}^\circ \text{UFC T}} \right] \times 100 \right\} \quad (1)$$

Onde:  $\bar{X}$  = média; mss = meio semi-seletivo; T = meio NA (testemunha)

Os resultados encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 - Número de colônias/placa\* (UFC) para cada isolado de Aac nos diferentes meios avaliados e valor de R

Isolados	Meio NA	Meio semi-seletivo	Repressividade
Aac1	125	123	2,1a**
Aac2	131	126	4,1a
Aac3	125	119	5,1a
Aac4	136	105	23,2b
Aac5	129	123	4,7a

\* média de 3 repetições

\*\*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%

De acordo com os resultados obtidos, o meio semi-seletivo desenvolvido não foi repressivo aos isolados de Aac (com exceção de Aac4).

#### 2.6.15 Detecção de Aac pela deposição das sementes em meio semi-seletivo

A Figura 9 ilustra o desempenho do meio semi-seletivo desenvolvido, no qual foram depositadas sementes supostamente sadias e inoculadas com Aac.



Figura 9 – Inibição do crescimento de bactérias associadas a sementes de melão (Basm) e alteração de cor do meio semi-seletivo devido ao crescimento de Aac ao redor das sementes (centrais)

Como pode se observar, o crescimento bacteriano ao redor das sementes inoculadas com Aac alteraram a coloração do meio semi-seletivo, indicando a presença da bactéria e confirmando sua sensibilidade. Não se observou o crescimento de outras bactérias, confirmando a supressividade do meio semi-seletivo.

#### **2.6.16 Detecção de Aac pelo método de extração e semeio em meio semi-seletivo**

A bactéria Aac foi detectada, através do método de extração e plaqueamento no meio semi-seletivo desenvolvido, nas amostras com uma semente portadora de Aac em 499 sementes, uma semente portadora de Aac em 999 sementes e uma semente portadora de Aac em 1999 sementes.

### 3 CONCLUSÕES

O meio de cultura semi-seletivo desenvolvido mostra alta supressividade (inibi o desenvolvimento de organismos não-alvos associados às sementes) e baixa repressividade a Aac, apresentando seletividade e sensibilidade satisfatória, além de baixo custo.

O meio semi-seletivo desenvolvido tem a seguinte composição: dextrose (5 g/L), NaCl (5 g/L), peptona (5 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/L), vermelho de fenol (0,012 g/L) e agar (17 g/L). Após autoclavagem adiciona-se uréia (25 g/L) (filtrada), benomyl (100 mg/L), nistatina (200 mg/L) e amoxicilina (15 mg/L).

## REFERÊNCIAS

ARAUJO, J.S.P.; ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R.L.D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil, Parte 1. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo – RS, v.11. p.107-131, 2003.

ARAUJO, J.S.P.; ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R.L.D. Manejo integrado de fitobacterioses de importância econômica no Brasil, Parte 2. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo – RS, v.12. p.145-200, 2004.

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**, Fortaleza – CE, v.24, n.2, p.191, jun. 1999.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RS. Disponível em <http://www.apassul.com.br/conteudo.asp?content=15&a=details&ID=42>. acesso em: 05 maio 2005.

BAKER, K.F. Seed pathology. In: KOZLOWSKI, T. (Ed.) **Seed biology**. New York: Academic Press, 1972. p.317-416.

CALIFORNIA CROP IMPROVEMENT ASSOCIATION. Disease inspection program procedures. Disponível em: <http://ccia.ucdavis.edu/CCIA/DiseaseinspectionProc.htm>. Acesso em 24 jan. 2005.

CASTRO, A.M.G.; LIMA, S.M.V.; GOEDERT, W.J.; FREITAS, A.; VASCONCELOS, J.R. **Cadeias produtivas e sistemas naturais: prospecção tecnológica**. Brasília: Embrapa, 1998. 564 p.

PINTO, C.A.B.P. **Melhoramento de hortaliças**. Piracicaba: ESALQ, 1977. 319 p.

DE MELO, A.M.T.; NAGAI, H.; TRANI, P.E. Melão: *Cucumis melo*. In: FAHL, J.I.; DE CAMARGO, M.B.P.; PIZZINATO, M.A.; BETTI, J.A.; MELO, A.M.T.; DeMARIA, I.C.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. 6.ed. Campinas: Instituto Agrônomico, 1998. p.219-221. (IAC. Boletim 200).

DEBOER, S.H. Use monoclonal antibodies to identify and detect plant pathogenic bacteria. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.9, p.182-187, 1987.

FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de olericultura: cultura e comercialização de hortaliças**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1981. p. 223-233.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Agrianual 2005: anuário da agricultura brasileira. 10 ed. São Paulo. p. 405-408.

HALFON-MEIRI, A.; VOLCANI, Z. A combined method for detecting *Colletotrichum gossypii* and *Xanthomonas malvacearum* in cotton seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.5, p.129-139, 1977.

HOPKINS, D.L.; THOMPSON, C.M. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Cucurbits. **HortScience**, Alexandria, v.37, n.6, p.924-926, 2002.

HOPKINS, D.L.; CUCUZZA, J.D.; WATERWON, J.C. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. **Plant Disease**, Saint Paul, v.80, p.529-532, 1996.

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

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. 2v.

KLEMENT, Z. Detection of seedborne bacteria by hypersensitive reaction. **Seed Science & Technology**, Zurich, v.11, p.589-593, 1983.

KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D.C. (Ed.). **Methods in phyto bacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. 568p.

KOMIYA, Y.; SHIRAKAWA, T.; ABIKO, K. Rapid diagnosis of watermelon bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* with immunological agglutination methods. **Japanese Journal of Phytopathology**, v.69, p.15-18, 2003.

KRUPPA, P.C. **Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes e no interior de frutos de tomateiro pelo uso de meios de cultura semi-seletivos.**

1993. 71p. Dissertação (M.S) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1993. – UNESP.

KRUPPA, P.C.; KUROZAWA, C.; MARINGONI, A.C. Avaliação de meios de cultura semi-seletivos para o isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de sementes de tomate. *Summa Phytopathologica*, Jaguariuna, v.20, n.1, p.55, 1994. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 17., 1994, Araras.

LAFLAMME, D.J.; MADDOX, D. Clinical application of the polymerase chain reaction for the detection of seedborne Aac. **The Grower**, Lenexa, p.6A-8A, Dec. 1998.

LATIN, R. Survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon transplant production facilities. **Citrus & Vegetable Magazine**, Lenexa, Feb. 1997.

LEITE JUNIOR, R.P.; JONES, J.B.; SOMODI, G.C.; MINSAVAGE, G.V.; STALL, R.E. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. **Plant Disease**, Saint Paul, v.79, n.9, p.917-922, 1995.

LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle.** Brasília: Embrapa SPI, 1997. 72p.

MACHADO, J.C. Introdução à patologia de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.V.S. (Ed.) **Patologia de sementes.** Campinas: Fundação Cargill, 1987. cap.1, p.3-17.

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações.** Brasília: Ministério da Educação; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 107p.

MALIN, E.; ROTH, D.; BELDEN, E.L. Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* in naturally infected bean seed. **Plant Disease**, Saint Paul, v.67, p.645-647, 1983.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia.** 2 ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 184p.



MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* agente causal da mancha-aquosa em melão. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8., 2004, João Pessoa-PB. João Pessoa: Tropical Hotel Tambaú, 2004. p.79-81.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; OLIVEIRA, I.S.; NASCIMENTO, R.P. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no Nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. (Ed.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, 2001. p.141-169.

MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROZAWA, C. Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Científica**, São Paulo, v.22, n.2, p.277-288, 1994.

McGUIRE, R.G.; JONES, J.B.; SASSER, M. Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* from soil and plant material. **Plant Disease**, Saint Paul, v.70, n.9, p.887-891, 1986.

MENTEN, J.O.M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: MENTEN, J.O.M. (Ed). Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. 1991, Piracicaba. **Anais da 2ª semana de atualização em patologia de sementes**. Piracicaba: ESALQ, FEALQ, 1991<sup>a</sup>. p.115-136.

MENTEN, J.O.M. Situação atual e perspectivas da patologia de sementes no Brasil. In: MENTEN, J.O.M. (Ed). Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. 1991, Piracicaba. **Anais da 2ª semana de atualização em patologia de sementes**. Piracicaba: ESALQ, FEALQ, 1991<sup>b</sup>. P.21-36.

MOHAN, S.K.; SCHAAD, N.W. An improved agar planting assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* and *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* in contaminated bean seed. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, p.1390-1395, 1987.

MORAES, M.H.D. Testes de sanidade de sementes em rotina no Brasil: situação atual, contribuições e perspectivas. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., 1991, Piracicaba. **Anais da 2ª semana de atualização em patologia de sementes**. Piracicaba: ESALQ, FEALQ, 1991. p.37-52.

NASCIMENTO, A.R.P.; SILVA, E.I.; ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R. Hospedeiros alternativos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza – CE, v.27, p.S66, ago. 2002. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2002, Recife.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. New York: MacMillian Press, 1977. 1187p.

OLIVEIRA, I.S.; MARIANO, R.L.R.; LEITÃO, A.F.L. Ocorrência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em melão-pepino no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza – CE, v.27, p.S67, ago. 2002. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2002, Recife.

OLIVEIRA, J.R. **Deteção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro**. 1995. 98p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

PARASHAR, R.D.; LEBEN, C. Detection of *Pseudomonas glycinea* in soybean seed lots. **Phytopathology**, Saint Paul, v.62, p.1075-1077, 1972.

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

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

SAETTLER, A.W. Seedling injection as an aid identifying bean blight bacteria. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v.55, p.703-706, 1971.

SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D. A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. Minneapolis: American Phytopathological Society, 1989. 122p.

SANTOS, A.A.; VIANA, F.M.P. **Mancha-aquosa do melão**. Fortaleza: Embrapa CNPAT, 2000.

SCHAAD, N.W. Serological identification of plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto – CA, v.17, p.123-147, 1979.

SCHAAD, N.W. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. **Plant Disease**, Saint Paul, v.66, p.885-890, 1982.

SCHAAD, N.W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 2.ed. St. Paul: APS Press, 1988. 158p.

SCHAAD, N.W.; DONALDSON, R.C. Comparison of two methods for detection of *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich ,v.8, p.383-391, 1980.

SCHAAD, N.W.; FORSTER, R. A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *Translucens* from wheat seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v.75, n.3, p.260-263, 1985.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3.ed. St. Paul: APS Press, 2000. 373p.

SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; OLIVEIRA, S.M.A. Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza – CE, v.27, p.S69, ago. 2002. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2002, Recife.

SOARES, F.M.P. **Métodos para detecção em sementes de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) e controle biológico de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato***. 1993. 51p. Dissertação (Mestrado em agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

SONG, W.Y.; SECHLER, A.; HATZILOUKAS, E.; KIM, H.M.; SCHAAD, N.W. Use of PCR for rapid identification of *Acidovorax avenae* and *A. avenae* subsp. *citrulli*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PATHOVARS AND RELATED PATHOGENS, 6., 2002, Acquafredda di Maratea, Maratea , 2002. 100 p.

STA LABORATORIES. Disponível em:  
[http://www.stalabs.com/presenter\\_ron\\_r\\_walcott.htm](http://www.stalabs.com/presenter_ron_r_walcott.htm). Acesso em 30 jun. 2005.

STALL, R.E. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, the causal agent of watermelon fruit blotch on seeds by polymerase chain reaction (PCR). **Citrus & Vegetable Magazine**, Lenexa, Feb. 1997.

TAVARES, S.H. Direto pro Lixo. **Cultivar: Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v.2, n.13, p.27-30, abr./maio 2002.

TAYLOR, H.D. The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolícola* (Burkh.) Dowson. **Annals of Applied Biology**, Wellesbourne, v.66, p.29-36, 1970.

VALARINI, P.J.; MENTEN, J.O.M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijão: detecção por inoculação em plantas indicadoras. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, p.171-180, 1992.

WALCOTT, R.R. Detection of seedborn pathogens. **HortTechnology**, Alexandria, v.13, n.1, p.40-47, jan./mar. 2003.

WALCOTT, R.R.; GITAITIS, R.D. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v.84, p. 470-474, 2000.

WALCOTT, R.R.; LANGSTON, D.; GITAITIS, R.; HOPKINS, D.; KUCHAREK, T.; EGEL, D. **Guidelines for managing bacterial fruit blotch disease. 2001 BFB Guidelines1**. Disponível em: <http://www.tifton.uga.edu/veg/Alerts/managing%20fruit%20blotch.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2005.

WALCOTT, R.R.; LANGSTON, D.; GITAITIS, R.; HOPKINS, D.; KUCHAREK, T.; EGEL, D.; MADDIX, D.; LOVIC, B. **Guidelines for managing bacterial fruit blotch disease, 2000**. Disponível em: <http://www.tifton.uga.edu/veg/Alerts/Bfb.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2005.

WEBSTER, D.M.; ATKIN, J.D.; CROSS, J.E. Bacterial blights of snap beans and their control. **Plant Disease**, Saint Paul, v.67, p.930-935, 1983.

**BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA**

KOROLKOVAS, A.K.; CARNEIRO DE FRANÇA, F.F.A. **Dicionário terapêutico guanabara**. Ed. 2004/2005. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2005.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)