

ananas), que reproduziu sintomas da doença em casa de vegetação quando inoculada em plantas de milho. Posteriormente plantas com 15, 30 e 45 dias de idade foram inoculadas com a bactéria e com o fungo descrito como o agente causal da doença, sob condições controladas. Após 5 a 7 dias sintomas típicos da doença apareceram apenas nos tratamentos com a bactéria. A partir de então vários experimentos foram realizados comprovando ser a bactéria o agente etiológico da doença. É sabido que alguns fungicidas, principalmente o Mancozeb, controlam a doença a campo, fato que colaborou em parte com a hipótese de que a doença seria causada por um agente fúngico. No entanto, avaliando a ação de diversos fungicidas sobre o crescimento da bactéria foi observada inibição total de seu crescimento em presença do Mancozeb e a aplicação deste agente a campo resultou em controle eficiente da doença. Os demais produtos não inibiram a bactéria em laboratório e não foram efetivos no controle a campo. O teste de ELISA indireto utilizando antissoro policlonal, produzido em coelho contra células de *P. ananas* isoladas de lesões anasarcas, confirmou a presença da bactéria nestas lesões. Análises em Microscopia de Luz e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) permitiram evidenciar a presença de um grande número de bactérias em forma de bastonetes no espaço intercelular dos tecidos de lesões anasarcas tanto naquelas coletadas a campo como naquelas obtidas por inoculação artificial. Uma desorganização do tecido foliar na área das lesões também pode ser observada. Estruturas fúngicas não foram visualizadas em lesões jovens, apenas em lesões em estágio avançado de necrose. A extração do DNA diretamente das lesões jovens obtidas a campo, seguida da técnica de PCR com seqüências de oligonucleotídeos universais para fungos (ITS4) e seqüências específicas para bactérias (DNAr 16S e rpoB), permitiu a amplificação do DNA somente com estas últimas seqüências. Lesões necrosadas não apresentaram amplificação em nenhuma das seqüências avaliadas, sugerindo uma diminuição da população bacteriana neste estágio. Estudos referentes à disseminação da bactéria no ambiente e sua forma de infecção encontram-se em andamento. Os resultados obtidos até o momento têm demonstrado que as mesmas não são encontradas nos feixes vasculares, não sendo, portanto, endofíticas. Os resultados também tem indicado que a transmissão não está ocorrendo via semente. Em trabalhos recentes foi observada atividade de nucleação de gelo (INA) em vários isolados de *P. ananas* obtidos de lesões anasarcas. Plantas inoculadas com a bactéria e mantidas por algumas horas a baixas temperaturas desenvolveram sintomas característicos da doença. Esta propriedade de nucleação de gelo, aliada aos fatores ambientais que favorecem o aparecimento da doença, levou-nos a formular a seguinte hipótese: "A bactéria sobrevive epifiticamente sobre as folhas do milho. O aumento da população bacteriana (desencadeado por fatores ainda desconhecidos), seguido de um aumento da umidade atmosférica e queda de temperatura (principalmente no período noturno), permitiria a formação de pequenos núcleos de gelo pelas bactérias INA+ provocando os sintomas iniciais da doença, ou seja, as lesões encharcadas ou anasarcas. Uma vez lesionado o tecido, fungos oportunistas colonizariam as lesões pré-estabelecidas pela bactéria". Vários experimentos vem sendo conduzidos pela equipe com o objetivo de confirmar esta hipótese.

014

Etiologia da mancha foliar bacteriana do eucalipto no Brasil. Gonçalves, R. C. Embrapa Acre, Caixa Postal 321, 69908-970, Rio Branco, AC; riva@cnpafac.embrapa.br. Etiology of bacterial leaf blight of eucalyptus in Brazil.

A área plantada com eucalipto no mundo é cerca de 17.861.000 ha (FAO, 2000). No Brasil, plantações de eucalipto (*Eucalyptus* spp. L'Her. e *Corymbia* spp. Hill & Johnson) ocupam, aproximadamente, 3 milhões de ha, sendo que o setor de base florestal brasileiro representou 4% do PIB nacional, faturou US\$ 21 bilhões e pagou US\$ 2 bilhões em impostos, em 2001 (Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2002). Dentre os fatores que concorrem para a redução do potencial de produção da cultura em plantios comerciais, estão importantes doenças de origem fúngica além da murcha bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al 1996 (Ferreira e Milani, 2002; Alfenas et al., 2004). A ocorrência de manchas foliares causadas por bactérias em mudas na fase de viveiro foi relatada em Mogí Guaçú (Pomella et al., 1995) e Itapetininga (Reis et al., 1996) em SP, ficando o problema restrito a poucos materiais genéticos nestes dois viveiros naquela época. Desde o final da década de 80, uma doença denominada ziguzira incide fortemente em plantios por sementes de *E. grandis* Hill ex Maiden, *E. urophylla* Blake e *E. saligna* Smith na região montanhosa de Itapetininga-SP. Em outubro de 1998, numa excursão àquela região pela disciplina Patologia Florestal/DFP/UFV amostras de folhas de *E. grandis* de 6 meses de idade no campo contendo lesões foliares de etiologia desconhecida foram coletadas para análise em laboratório. Exames microscópicos revelaram a exsudação de bactérias a partir de segmentos foliares lesionados e formulou-se a hipótese de causa bacteriana para a doença. A

partir de então, manchas foliares sem a presença de fungos e com exsudação de bactérias foram constatadas, em viveiro e campo, na maioria das regiões eucaliptocultoras brasileiras, o que motivou o estudo da etiologia desta doença no Brasil com ampla abrangência geográfica.

MATERIAL E MÉTODOS: amostras de folhas e ramos de eucalipto com sintomas de bacteriose, foram colhidas nos estados RS, SP, MG, BA, MS, AP e PA. Destas, foram obtidos um total de 90 isolados de bactérias, sendo cinco isolados bacterianos de cada população clonal ou por sementes. Todos os isolados foram inoculados por injeção de inóculo a 10⁸ ufc/ml em plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill., *Nicotiana tabacum* L., *Capsicum annum* L., *Coffea arabica* L. e em *Eucalyptus* spp). Isolados HR positivos ao maior número de plantas não-hospedeiras, patogênicos ao eucalipto e morfologicamente distintos foram selecionados para identificação. Os isolados selecionados foram identificados inicialmente ao nível de gênero utilizando-se os testes de Gram e KOH, produção de pigmentos em meio King B, crescimento a 33°C em meio YDC, utilização de asparagina, produção de xantomonadina e teste de Hugh e Leifson (Schaad, 2001). Para a identificação dos isolados ao nível de espécie, foram somados aos resultados obtidos, testes de utilização de 95 fontes de carbono em microplacas BIOLOG (GN Microplate, Biolog Inc., CA) (Jones et al., 1993), análise filogenética de seqüências parciais ou totais do gene rrs, correspondente ao RNA ribossomal 16S (Hauben et al., 1997) e análise do perfil de ácidos graxos (FAME) no sistema MIS (Sherlock® Microbial Identification System v. 4.0, MIDI Inc. 2001) (Stead et al., 1992) para três isolados. Isolados da coleção do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Viçosa, foram utilizados como controle nos testes bioquímicos e moleculares.

RESULTADOS: Vinte e cinco isolados foram escolhidos para identificação, sendo 15 isolados originados de plantas no campo e cinco destes identificados em *Xanthomonas axonopodis* Starr & Garces 1950 emend. Vauterin et al 1995, espécie de ocorrência nos estados de SP, BA, MS e PA. Todos os isolados de *X. axonopodis* induziram HR em *Lycopersicon esculentum*, três em *N. tabacum*, dois em *C. arabica* e um em *C. annum*. A patogenicidade em *E. grandis* x *E. urophylla* foi confirmada pela expressão de sintomas típicos da doença e a presença do patógeno vivo nas lesões foliares após inoculação por injeção ou atomização de inóculo. A combinação das análises de perfil de utilização de fontes de carbono e análise filogenética de seqüências de rDNA 16S foram apropriadas para a identificação de 22 isolados ao nível de espécie. Dos três isolados analisados pelo perfil de ácidos graxos (FAME), um confirmou em *X. axonopodis*, um em *Erwinia* spp. e o terceiro não foi identificado por este sistema. Quatro isolados foram identificados em *X. campestris*, quatro em *Pseudomonas syringae*, dois em *P. cichorii*, dois em *P. putida*, um em *Erwinia* spp. e dois isolados foram identificados provisoriamente em *Rhizobium* spp. Conclui-se que manchas foliares de eucalipto com exsudação de bactérias sem a presença de fungos são causadas por mais de uma espécie de bactéria.

015

Etiologia e Controle do Greening Lopes, S. A. Fundo de Defesa da Citricultura, Av. Dr. Adhemar Pereira de Barros, 201, 14801-970, Araraquara, SP; slopes@fundecitrus.com.br. Etiology and control of citrus greening

A doença é causada por bactérias gram negativo, restritas aos vasos liberianos (floema), pertencentes ao grupo das proteobactérias. Nunca foi possível cultivar estas bactérias em meios de cultura. Anteriormente à ocorrência de greening no Brasil eram conhecidas duas espécies: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causadora da forma asiática da doença e tolerante a altas temperaturas (mais de 30⁰ C) e *Candidatus Liberibacter africanus*, causadora da forma africana e sensível a altas temperaturas (mais de 25-30⁰ C). Testes moleculares em plantas com sintomas de greening coletadas na região de Araraquara revelaram a presença de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, e de uma nova bactéria, diferente das duas espécies de *Liberibacter* causadoras de greening anteriormente conhecidas. A homologia entre as seqüências do 16S rDNA das duas espécies anteriormente conhecidas é de 97,5% enquanto que a homologia do 16S rDNA da nova bactéria com o de *Candidatus Liberibacter asiaticus* é de 93,7% e com o de *Candidatus Liberibacter africanus* é de 93,9%. Em função dessas diferenças propôs-se o enquadramento dessa nova bactéria numa nova espécie denominada *Candidatus Liberibacter americanus*. Resultados dos primeiros levantamentos tem demonstrado ser esta a espécie predominante nos pomares paulistas. As bactérias causadoras do greening são transmitidas por duas espécies de psíldeos, pequenos insetos, de dois a três milímetros de comprimento, que têm como hospedeiros preferenciais as plantas cítricas, a planta ornamental *Murraya paniculata* conhecida como murta, falsa murta ou murta de cheiro, e pelo menos três outros gêneros, todos da família *Rutaceae*. *Diaphorina citri*