

ADRIANO MÁRCIO FREIRE SILVA

Limpesa clonal de videira com  
2009 TS-2009;00002



40785-1

LIMPEZA CLONAL DE VIDEIRA COM CANCRO-BACTERIANO  
E SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* EM  
TECIDOS INFECTADOS

009

009;00002

RECIFE  
2009

**ADRIANO MÁRCIO FREIRE SILVA**

**LIMPEZA CLONAL DE VIDEIRA COM CANCRO-BACTERIANO  
E SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* EM  
TECIDOS INFECTADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia.

**RECIFE-PE**

**FEVEREIRO, 2009**



**LIMPEZA CLONAL DE VIDEIRA COM CANCRO-BACTERIANO  
E SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* EM  
TECIDOS INFECTADOS**

**ADRIANO MÁRCIO FREIRE SILVA**

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano – Orientadora**

**Dr. Nataniel Franklin de melo – Co-orientador**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Elineide Barbosa da Silveira – Co-orientadora**

**RECIFE-PE**

**FEVEREIRO, 2009**

**LIMPEZA CLONAL DE VIDEIRA COM CANCRO-  
BACTERIANO E SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas campestris*  
pv. *viticola* EM TECIDO INFECTADO**

**ADRIANO MÁRCIO FREIRE SILVA**

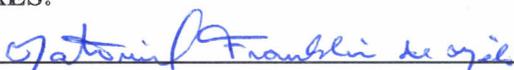
Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 26 de fevereiro de 2009.

**ORIENTADORA:**

  
\_\_\_\_\_

Profª. Ph.D. Rosa de Lima Ramos Mariano

**EXAMINADORES:**

  
\_\_\_\_\_

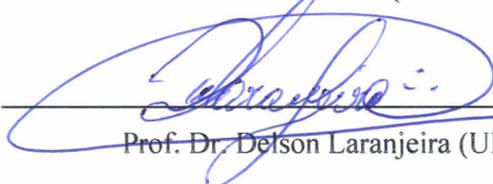
Dr. Nataniel Franklin de Melo (Embrapa Semi-árido)

  
\_\_\_\_\_

Profª. Drª. Ana Rosa Peixoto (UNEB)

  
\_\_\_\_\_

Profª. Drª. Andréa Maria André Gomes (Faculdade Maurício de Nassau)

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

**RECIFE-PE  
FEVEREIRO, 2009**

## **AGRADEÇO**

*A todos aqueles que me ajudaram*

## **OFEREÇO**

*A minha esposa Marcicleide, aos meus pais Domingos e Maria Célia,  
irmãs Ana, Alide e Aline,  
cunhados Valter, Gil e Tuta, minhas tias Francisca e Maria e  
minha querida orientadora Rosa Mariano*

*A Deus pela saúde, força, coragem e inspiração que me concede  
em todos os momentos*

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela formação oferecida através do curso de Doutorado em Fitopatologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e Apoio financeiro.

Ao chefe da Embrapa Semi-Árido Nataniel Franklin de Melo pela orientação, amizade e constante apoio.

Ao pesquisador da Embrapa Semi-Árido Carlos Gava pela grande colaboração.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, pelos conhecimentos partilhados.

À Coordenação e funcionários do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.

Aos amigos Flávio, Anselmo, Sayonara, Ana Rosa, Angélica e Ivanise Viana, Eireanne, Ângela, Seu Arlindo, Thiago, João, Eliene, Ivanice e Kyria pela confiança depositada em mim durante o curso.

Aos demais colegas do curso de Doutorado em Fitopatologia.

Ao pessoal do laboratório de Fitobacteriologia

Aos funcionários da Embrapa Semi-Árido, Maria Tereza, Hélio, Genival, Carlos e Seu Arlindo pelo constante apoio nos experimentos.

À Embrapa Semi-Árido por me acolher e ceder seus equipamentos e dependências.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	vi
<b>SUMÁRIO</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>Capítulo I– Introdução Geral</b> .....	14
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	27
<b>Capítulo II– Limpeza clonal de videira com cancro-bacteriano</b> .....	35
<b>Resumo</b> .....	36
<b>Abstract</b> .....	37
<b>Introdução</b> .....	37
<b>Material e Métodos</b> .....	38
<b>Resultados e Discussão</b> .....	42
<b>Conclusões</b> .....	47
<b>Agradecimentos</b> .....	48
<b>Referências</b> .....	52
<b>Capítulo III–Sobrevivência de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>viticola</i> em tecido infectado de videira na superfície do solo e em compostagem</b> .....	56
<b>Resumo</b> .....	57
<b>Abstract</b> .....	58
<b>Introdução</b> .....	58
<b>Material e Métodos</b> .....	60

<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>68</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>75</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>75</b>
<b>Referências.....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>88</b>

## RESUMO

O cancro-bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) é responsável por grandes prejuízos ao cultivo de videira no Vale do Submédio São Francisco. No primeiro trabalho, técnicas de cultura de tecidos em meio de Galzy modificado (MGM) foram estudadas visando eliminar Xcv de mudas de videira 'Red Globe'. O primeiro experimento visou selecionar o tamanho ideal de ápices e gemas axilares para o cultivo em MGM; o segundo, verificar o efeito da termoterapia de mudas (38°C/quatro semanas) associada ao cultivo em MGM; e o terceiro, testar antibióticos para eliminação de Xcv em explantes oriundos de videiras infectadas. Todas as plantas obtidas sem contaminação *in vitro* e meios de cultivo contaminados foram indexados utilizando o meio ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura-ampicilina (NYDAM) seguindo-se teste de patogenicidade. O cultivo de explantes com 3 mm possibilitou a obtenção de plantas livres da bactéria, com regeneração 14,3 vezes maior que explantes de 1 mm de comprimento. A termoterapia de mudas infectadas associada ao cultivo *in vitro* não eliminou o patógeno. O cultivo de explantes com 10 mm durante 40 dias em MGM+cefotaxima (300 mg L<sup>-1</sup>) proporcionou limpeza clonal das mudas. A indexação em NYDAM permitiu a visualização do crescimento de Xcv. A indexação de plantas de videira regeneradas *in vitro* quanto à infecção por Xcv utilizando NYDAM é uma alternativa econômica e eficiente para produção de plantas selecionadas. Sabe-se que restos de poda de plantas infectadas deixados no parreiral são importante fonte de inóculo primário da doença, recomendando-se a queima como medida de controle. No segundo trabalho, investigou-se a sobrevivência de Xcv em tecidos de videira infectados e o uso da compostagem para erradicação de Xcv em associação com restos culturais. Mudas de videira 'Festival' foram inoculadas com o

mutante resistente a rifampicina  $Xcv2^{Rif}$  e quando apresentavam alta severidade da doença, ramos fragmentados e folhas inteiras foram acondicionados em bolsas de malha plástica. Estas foram alocadas na superfície de microparcelsas em área experimental (experimento 1) e no interior de pilhas de compostagem de restos de poda de videira (experimento 2). A sobrevivência de  $Xcv2^{Rif}$  em tecidos infectados de videira foi monitorada em meio NYDAM + rifampicina ( $0,1g L^{-1}$ ) + azoxystrobim ( $0,16 g L^{-1}$ ), a intervalos de 8 e 10 dias a partir do início do experimento, respectivamente nos experimentos 1 e 2. No experimento 1, foi também avaliada a decomposição de tecidos e no experimento 2, as curvas de temperatura das pilhas, conteúdo de fenóis, e presença de microbiota fúngica e bacteriana antagonista a  $Xcv2^{Rif}$ . O patógeno sobreviveu em altas densidades ( $10^4$  a  $10^6$  UFC  $g^{-1}$ ) por pelo menos 80 dias em tecidos infectados de videira na superfície do solo. Portanto, restos de poda de videira constituem importante fonte de inóculo primário para infecção de outras plantas no parreiral. O processo de compostagem eliminou  $Xcv2^{Rif}$  de restos culturais em 10 dias, devido às altas temperaturas alcançadas pelas pilhas, liberação de compostos fenólicos durante o processo e antagonismo microbiano. Desta forma, a compostagem constitui uma maneira viável e segura de manejar os restos de poda em parreirais, sem perigo de sobrevivência de  $Xcv$  e sem que haja a perda de uma importante fonte de matéria orgânica para a cultura.

## ABSTRACT

Bacterial canker (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) (Xcv) caused great damage to the grapevine cultivation in the Vale do Submédio São Francisco. In the first paper techniques of *in vitro* tissue culture in modified Galzy medium (MGM) were studied in order to eliminate Xcv from 'Red Globe' grapevine plants. The first experiment aimed to select the ideal length of apex and axillary's buds for cultivation in MGM; the second to verify the effect of the thermotherapy (38°C/four weeks) associated to the MGM cultivation; and the third intended to test antibiotics to eliminate Xcv from explants taken from infected grapevines. All plants obtained without contamination *in vitro* and culture media contaminated were indexed by using the semi-selective culture media nutrient agar-dextrose-yeast extract-ampicilin (NYDAM) followed by a pathogenicity test. The cultivation of 3 mm explants permitted to obtain plants free of bacteria with regeneration 14.3 times higher than 1 mm explants. The thermotherapy of infected plants associated to the *in vitro* culture did not eliminate the pathogen. The cultivation of 10 mm explants for 40 days in MGM+cefotaxime (300 mg L<sup>-1</sup>) eliminated Xcv from grapevine plants. The indexation in NYDAM permitted the visualization of specific Xcv growing. The indexation of *in vitro* regenerated grapevine plants for Xcv infection by using NYDAM medium is an economic and efficient alternative for production of selected plants. It is known that pruning residues of infected plants abandoned in the grapevine plantations are important source of disease primary inoculum and that burning is recommended as control measure. Thus the second paper investigated the survival of Xcv in infected tissues and the use of composting to eradicate Xcv associated with crop residues. Plants of grapevine "Festival" were inoculated with a mutant resistant to rifampicin Xcv2<sup>Rif</sup> and at the time they presented high disease severity, fragmented shoots and entire leaves were placed in mesh bags. These bags

were placed on the surface of microplots in experimental area (experiment 1) and inside compost piles of grapevine pruning residues (experiment 2). The survival of *Xcv2<sup>Rif</sup>* in grapevine infected tissue was monitored in the culture medium NYDAM + rifampicin ( $0,1\text{g L}^{-1}$ ) + azoxystrobim ( $0,16\text{ g L}^{-1}$ ), at 8 and 10 days intervals from 1 and 2 experiment setting, respectively. In the experiment 1 tissue decomposition was also evaluated and in the experiment 2, pile temperature curves, phenolyc content, and fungi and bacteria antagonistic to *Xcv2<sup>Rif</sup>* were analyzed. The pathogen survived in high densities ( $10^4$  a  $10^6$  CFU  $\text{g}^{-1}$ ) for at least 80 days in grapevine-infected tissues on soil surface. Then grapevine-pruning residues are important inoculum source for other plants in the vineyard. The composting process eliminated *Xcv2<sup>Rif</sup>* from crop residues in 10 days due to high temperatures in piles, liberation of phenolyc compounds during the process and microbial antagonism. Therefore the composting is a viable and safe method to manage pruning residues in grapevine plantations without problems of *Xcv* survival and without losing of an important source of organic matter for the culture.

## Capítulo I

---

### INTRODUÇÃO GERAL

## Introdução

### 1. Importância da cultura

O cultivo da videira (*Vitis vinifera* L.) é muito antigo. Registros fósseis encontrados em Kannish, uma antiga cidade comercial da Turquia, mostraram que a viticultura era praticada há cerca de 3.500 anos a.C. (LEÃO; POSSÍDIO, 2000).

A videira pertence a ordem *Rhamnales*, família *Vitaceae* e gênero *Vitis*, o qual é composto pelas secções *Muscadinia* e *Euvitis*. O gênero *Vitis* é o único com importância econômica e alimentar (CAMARGO, 2000). No final da década de setenta, o cultivo de uvas para consumo *in natura* adquiriu relevância econômica no plano internacional em consequência do avanço das tecnologias de produção, melhorando a qualidade do produto que atingiu diferentes mercados consumidores, com incremento constante (LLORENTE, 1992).

No ano de 2007, a produção mundial de uva atingiu 66.271.676 toneladas, sendo a Itália o maior produtor mundial (8.519.418 t), seguida pela França (6.500.000 t), China (6.250.000 t), Estados Unidos (6.105.080 t) e Espanha (6.013.000 t). O Brasil ocupa a 11ª posição no ranking mundial, cuja produção alcançou no mesmo ano 1.341.806 t em uma área plantada de 76.426 ha com produtividade de 17.556 Kg ha<sup>-1</sup> (FAO, 2007).

A videira pode ser cultivada em todo território nacional, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Pernambuco (KUHN et al., 1986).

Na região semi-árida do Brasil, a viticultura vem se destacando no cenário nacional, pela expansão da área cultivada e do volume de produção, mas principalmente, pelos altos rendimentos alcançados e pela qualidade do produto. A evolução da área cultivada reflete-se diretamente sobre o volume da produção. A taxa

média de crescimento da produção nacional de uva, no período de 1991 a 1998 foi da ordem de 3,37% ao ano, enquanto para o Nordeste do Brasil o crescimento foi da ordem de 72,27% ao ano (PROGNÓSTICO AGRÍCOLA, 1998). De acordo com Silva e Correia (2000), no ano de 1996, considerando-se o valor médio por tonelada, estimou-se em 150 milhões de reais o volume de negócios movimentado pela viticultura na região Nordeste.

Em 2006, o Vale do submédio São Francisco, região Semi-Árida do Nordeste, possuía uma área estimada de 10.000 ha cultivados com videira e participação equivalente a 95% das exportações brasileiras da fruta (IBRAF, 2007). Nesta região, a cultura da videira possui uma grande importância sócio-econômica pelo grande número de empregos gerados (SILVA; CORREIA, 2000).

## **2. O cancro-bacteriano da videira**

A intensificação do cultivo da videira, o plantio de cultivares suscetíveis, além das condições climáticas prevalentes no Vale do Submédio São Francisco têm propiciado o surgimento de problemas fitossanitários, afetando diretamente a produção e a produtividade (TAVARES, 1995). Além disso, o intercâmbio de germoplasma com a aquisição de mudas sem certificação também tem contribuído para a introdução de doenças nesse pólo agrícola (TAVARES; MENEZES, 1991).

No início de 1998, foi detectado pela primeira vez no Brasil o cancro-bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye (Xcv) em parreirais do Vale do Submédio São Francisco, ocasionando grandes prejuízos em cultivares suscetíveis (MALAVOLTA JR. et al., 1999). Além do Brasil, a doença foi relatada apenas na Índia, onde não causa severas perdas. No Brasil é considerada Praga Quarentenária A2 de acordo com a Instrução Normativa DAS nº 38 de 14 de outubro de

1999, ocorrendo nos Estados de Pernambuco, Bahia, Piauí, Ceará e Roraima (MALAVOLTA JR. et al., 2008).

Em levantamento realizado em propriedades do pólo de irrigação Petrolina-PE/Juazeiro-BA, entre outubro de 2003 e abril de 2004, período que foi bastante favorável à ocorrência e disseminação do cancro-bacteriano, devido a ocorrência de chuvas fortes acompanhadas de vento, plantas com sintomas da doença foram verificadas em 17 das 18 propriedades visitadas, com incidência variando de 10 a 100% em parcelas da cv. Festival e de 92 a 100% nas parcelas da cv. Red Globe. A doença também foi observada na cv. Itália, mas causando poucos danos e não se detectou o cancro-bacteriano na cv. Benitaka (LOPES; NASCIMENTO, 2004). No mesmo trabalho, a doença foi observada em áreas implantadas a menos de seis meses, indicando que, provavelmente, a bactéria já estava presente nas mudas (LOPES, 2006).

Desde o aparecimento do cancro-bacteriano da videira no Vale do Submédio São Francisco, a área plantada com 'Red Globe' diminuiu sensivelmente, pois devido a alta susceptibilidade dessa cultivar muitos produtores da região optaram por erradicá-la. Nas áreas remanescentes a produção é concentrada em apenas um ciclo, no segundo semestre, quando a ausência ou ocorrência esparsa de chuvas desfavorece a doença.

Em plantas infectadas, os sintomas nas folhas surgem como pontos necróticos medindo de 1-2 mm de diâmetro, com ou sem halos amarelados, algumas vezes coalescendo e causando a morte de extensas áreas do limbo foliar. Nas nervuras e pecíolos das folhas, nos ramos e ráquis dos frutos formam-se manchas escuras alongadas, que evoluem para fissuras longitudinais de coloração negra conhecidas como cancos. Estes sintomas são os mais facilmente identificáveis, facilitando o diagnóstico da doença quando os sintomas no limbo foliar se confundem com aqueles de doenças

fúngicas comuns. As bagas são desuniformes em tamanho e cor (NAYUDU, 1972), podendo apresentar lesões necróticas arredondadas.

Com relação à gama de hospedeiros, a doença foi também detectada em porta-enxertos de videira assintomáticos de IAC 572 e sintomáticos de IAC 766, ambas enxertadas com a cultivar Red Globe (NASCIMENTO; MASHIMA; LIMA, 2000). O patógeno também sobrevive naturalmente em *Phyllanthus maderaspatensis* (L.) Heyne ex Roth (CHAND; KISHUN, 1990), *Alternanthera tenella* Colla, *Amaranthus* sp., *Glycine* sp. e *Sena obtusifolia* (L.) H.S Irwin e Barneby (PEIXOTO et al., 2007). Em inoculações artificiais observou-se infecção em plantas de mangueira (*Mangifera indica* L.) (CHAND; KISHUM, 1990; ARAÚJO et al., 1999), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), cajá-manga (*Spondias dulcis* Sol. ex Parkinson), aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi) (ARAÚJO et al., 1999) e nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) (MALAVOLTA JR.; ALMEIDA, 2000).

A disseminação do patógeno ocorre por meio de material propagativo infectado, material de colheita (contentores, tesouras de poda e raleio, luvas), tratos culturais (desbrota, poda, raleio de bagas, colheita), ventos, chuvas e irrigação. Apesar do curto período chuvoso na região, que vai de dezembro a abril, é durante essa estação que a bactéria se dissemina mais eficientemente (NASCIMENTO; MASHIMA; LIMA, 2000).

Existem poucas informações disponíveis na literatura sobre a epidemiologia e controle da doença, demandando pesquisas que subsidiem o estabelecimento de estratégias para o manejo da doença em campo (NASCIMENTO; MASHIMA; LIMA, 2000). Para o controle da doença recomenda-se: uso de material propagativo sadio; inspeção no campo; poda drástica de órgãos infectados; evitar podas, desbrota ou qualquer operação que ocasione ferimentos, durante o período chuvoso do ano;

eliminação de plantas doentes, inclusive as raízes, com incineração imediata no local; manejo da época de poda de produção; desinfestação de veículos, equipamentos e materiais de poda; utilização de fungicidas protetores cúpricos e tiocarbamatos; aplicação de pasta cúprica nos cortes resultantes da poda ou quaisquer ferimentos na planta; eliminação de plantas daninhas, no parreiral, visando eliminar possíveis hospedeiros alternativos do patógeno e utilização de quebra-ventos para reduzir a disseminação do patógeno. Nas áreas de erradicação, é aconselhável não plantar videira por um período de até seis meses (CHAND et al., 1991; LIMA et al., 1999; ROMEIRO, 2005).

### **3. *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***

O gênero *Xanthomonas* pertence ao Domínio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, Classe *Gamaproteobacteria*, Ordem *Xanthomonadales* e Família *Xanthomonadaceae* (HOLT et al., 1994).

Vauterin, Kersters e Swings (1995), baseado em um estudo de hibridação DNA-DNA fizeram diversas mudanças taxonômicas dentro do gênero *Xanthomonas*, ficando estabelecido que apenas os isolados de crucíferas deveriam ser classificados dentro da espécie *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, por apresentarem maior homologia entre si. Esses autores recomendaram que todas as espécies pertencentes ao gênero e não inclusas no trabalho deveriam ser nomeadas temporariamente como *Xanthomonas* spp. Na ausência de estudos taxonômicos com o patógeno da videira, permanece em uso o nome *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

Inicialmente denominada *Pseudomonas viticola* Desai, *X. campestris* pv. *viticola* é uma bactéria Gram-negativa, com dimensões de 0,6 x 1,2 - 2,5 µm, possui um flagelo polar e metabolismo aeróbico. As colônias são arredondadas, brilhantes, com bordos

lisos e coloração esbranquiçada em meio ágar nutritivo, pois não produzem xantomonadina, pigmento característico do gênero *Xanthomonas*. Não utiliza nitrato como fonte de nitrogênio, nem asparagina como fonte de carbono e nitrogênio; cresce bem em sais de amônio e ácido glutâmico, embora apresente melhor crescimento, em caseína hidrolisada (NAYUDU, 1972). Produz ácido a partir de glicose, manose, galactose, trealose e frutose, mas não de celobiose, dulcitol, glicerol, m-inositol, lactose, rafinose e sorbitol. Nascimento, Mariano e Gama (2005) verificaram que Xcv é capaz de crescer em meio de cultura líquido em temperaturas variando de 5 a 35°C, sendo que o crescimento ótimo foi entre 27 a 29°C. Os mesmos autores também observaram que o pH ótimo para esta bactéria foi de 7,5 e que o seu crescimento decresceu a partir de 3% de NaCl, chegando a zero na concentração de 6%. Os testes de hipersensibilidade foram negativos em folhas de fumo (LIMA et al., 1999), mas positivos em folhas de tomate cv. Santa Clara (MALAVOLTA JR. et al., 1999). Alguns isolados caracterizados até o momento, quanto a tolerância ao cobre, toleraram até 350  $\mu\text{g mg}^{-1}$  com a presença do gene *copA* (MARQUES, 2007). É melhor preservada por dessecação em papel de filtro e em água destilada esterilizada, métodos que propiciaram viabilidade constante de 100% até 11 meses (NASCIMENTO; MARIANO; GAMA, 2005).

Vários métodos têm sido pesquisados para detecção de Xcv, incluindo meios seletivos, sorologia e técnicas moleculares. Peixoto, Mariano e Viana (2006) formularam o meio semi-seletivo NYDAM (dextrose 10, extrato de carne 3, extrato de levedura 5, ágar 18 e ampicilina 0,1 g L<sup>-1</sup>) para isolamento do patógeno a partir de órgãos vegetais infectados, o qual apresentou eficácia de 10,8 a 29,4% após 48 h de incubação. Já Araújo et al. (2003) desenvolveram anticorpos policlonais, e observaram que os mesmos foram altamente reativos e específicos para essa bactéria, apresentando potencial para serem empregados como método de diagnóstico para certificação de

mudas de videira. Em estudos moleculares, Trindade, Lima e Ferreira (2005) caracterizaram 41 isolados de Xcv e demonstraram, através da análise conjunta dos resultados REP, ERIC e BOX-PCR, a formação de cinco subgrupos com 56% similaridade. O marcador REP-PCR mostrou reprodutibilidade e eficiência em caracterizar a variabilidade de Xcv podendo também ser útil como uma técnica adicional para identificação da bactéria. Mais recentemente, Trindade et al. (2007) verificaram que a presença dessa bactéria no tecido da planta só foi verificada, após enriquecimento em meio de cultivo antes da PCR (BIO-PCR). Contudo, é importante dizer, que esta técnica foi capaz de detectar o patógeno, a partir de uma suspensão obtida de uma única colônia bacteriana.

#### **4. Limpeza clonal**

Uma vez identificada a importância de uma planta, seja pela produtividade ou pelo vigor, é interessante que essa característica possa ser reproduzida por cruzamentos ou mantida por técnicas de propagação vegetativa ou por micropropagação. Segundo Torres, Teixeira e Pozzer (1998), a contaminação dos propágulos por patógenos pode se apresentar na forma latente e representa um grande problema para a propagação vegetativa. Provavelmente todas as espécies assim propagadas estão infectadas com um ou mais patógenos, os quais são transmitidos e acumulados com propagações sucessivas e podem manifestar-se pela redução do vigor e da produtividade das culturas.

Na ausência de um produto químico capaz de erradicar eficientemente vírus e bactérias de plantas infectadas, técnicas de cultura de ápices caulinares vêm sendo utilizadas desde 1952 para eliminação desses patógenos, visando à obtenção de material de multiplicação com alta qualidade fitossanitária (TORRES; TEIXEIRA; POZZER, 1998). Esta técnica foi utilizada pela primeira vez por Ball (1946), para regenerar

plantas de *Tropaelum majus* L. e *Lupinus albus* L. Além dos vírus e bactérias, os viróides e fitoplasmas também podem ser eliminados com o cultivo *in vitro* de ápices e meristemas, que permitem o estabelecimento de culturas com baixíssimo índice de perdas por contaminação (BARLASS, 1987).

A micropropagação da videira é utilizada com diversos objetivos, entre eles a multiplicação rápida de plantas, a propagação de novos híbridos, a obtenção de matrizes livres de patógenos e a preservação de germoplasmas (KRUL; MOWBRAY, 1984). As técnicas de micropropagação podem ter maior eficiência se associadas a outras práticas, a exemplo da termoterapia. Panattoni et al. (2007) observaram 60% de erradicação do *Grapevine virus A* em plântulas de videira cultivadas *in vitro*, após a termoterapia do material vegetal a 36°C por 57 dias. A cultura *in vitro* de gemas axilares de plantas de videira ‘Barbera’ e ‘Chardonnay’ infectadas com os fitoplasmas “flavescence dorée” e “bois noir” permitiu a obtenção de plantas livres do patógeno, após 6 a 8 meses de cultivo (GRIBAUDO et al., 2007). Em diferentes culturas, a micropropagação associada ou não a outras práticas tem oferecido bons resultados. Grum et al. (1998) observaram que o tratamento a calor seco (47-48°C) de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), associado à termoterapia de plântulas (37°C) e combinado com cultura de ápices e meristemas foi capaz de erradicar *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin et al. e *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Gardan et al. e desta forma produzir plantas livres desses patógenos. Albuquerque et al. (2000) visando obter a limpeza clonal de mudas de abacaxizeiro infectadas por *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* Ventura, Zambolim e Gilb. pelo cultivo de ápices caulinares com 1 mm de comprimento, verificaram que 100% das plantas regeneradas estavam livres do patógeno. O cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos e cana-de-açúcar com dois

primórdios foliares possibilitou a obtenção de 100% de plantas regeneradas, livres de vírus (FITCH et al., 2001).

## **5. Sobrevivência de fitopatógenos**

O entendimento das formas de sobrevivência de bactérias fitopatogênicas em condições de campo é importante para o estabelecimento de medidas eficientes de controle. Bactérias que incitam enfermidades em plantas de interesse econômico sobrevivem, dependendo da espécie considerada, associadas às sementes ou partes propagativas, em órgãos vegetais infectados, em restos de cultura, no solo e como populações residentes na superfície ou no interior de plantas cultivadas e de ervas daninhas (VALARINI; SPADOTTO, 1995; ROMEIRO, 2005).

Segundo Leben (1981) uma das principais formas de sobrevivência de bactérias fitopatogênicas é a fase hipobiótica dentro de tecidos infectados difíceis de serem decompostos, como por exemplo: células do patógeno dentro de ramos calosos de tomate. Desta forma, práticas que encorajem a decomposição de restos culturais podem ajudar no controle da doença.

Dentre os fatores que afetam a sobrevivência de bactérias fitopatogênicas estão temperatura, umidade, pH, aeração, características químicas, físicas e biológicas do solo (DE BOER, 1982). Em geral, essas bactérias sobrevivem no solo em uma faixa de temperatura que varia de 20 a 37°C. Em restos culturais, vários fatores podem influenciar a sobrevivência desses patógenos, dentre os quais: área geográfica, clima, práticas culturais (que definem a localização do resto cultural), genótipo do hospedeiro e possivelmente o isolado bacteriano (GILBERTSON; RAND; HAGEDORN, 1990). Em geral, o período de sobrevivência de bactérias fitopatogênicas em restos de cultura na superfície do solo é maior do que quando estes resíduos são incorporados a

diferentes profundidades (ZHAO; DAMICOMI; BENDER, 2002). Tal fato pode ser explicado pela ação da microbiota na decomposição dos tecidos e na ação direta sobre os patógenos, usualmente pelos mecanismos de competição e antibiose (GILBERTSON; RAND; HAGEDORN, 1990; ROMEIRO, 2005).

*Xanthomonas campestris* pv. *armoraceae* (Mcculloch) Dye e *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Mcculloch) Young et al. sobreviveram em restos de cultura de nabo (*Brassica rapa* L.) e couve (*B. oleraceae* L. var. *acephala* DC) enterrados no solo por 2 meses enquanto na superfície do solo a sobrevivência foi de até 5 meses (ZHAO; DAMICOMI; BENDER, 2002). Já Marcano e Trujillo (1984) observaram que o isolado Xcpvm 23 de *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Arthaud-berthet e Bondar) Vauterin et al., resistente ao antibiótico rifampicina, sobreviveu até 60 dias em amostras enterradas no campo e até 240 dias em restos de cultura mantidos no laboratório. Não foi possível recuperar o isolado selvagem devido a grande contaminação das amostras, comprovando a importância do uso dos mutantes em estudos de sobrevivência.

No Estado da Geórgia (EUA) McCarter et al. (1983) detectaram baixas populações de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al. em tecidos de tomate infectados colocados na superfície do solo por até 60 dias, enquanto que na Flórida, Jones, Pohronezny e Stall (1986) observaram que *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye foi capaz de sobreviver em restos culturais de tomate na superfície do solo, durante seis meses. Da mesma forma, Schaad e White (1974), verificaram que *X. campestris* pv. *campestris* sobreviveu em restos de cultura de repolho (*B. oleraceae* var. *capitata* L.) na superfície do solo por cerca de oito meses. Já em Arkansas, *X. translucens* pv. *translucens* (Jones et al.) Vauterin et al. apresentou baixa capacidade de sobrevivência em restos culturais de trigo (*Triticum aestivum* L.), onde só foi detectada até 3 meses (MILUS; MIRLOHI, 1995).

Em Winsconsin, Gilbertson, Rand e Hagedorn (1990) observaram que *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, agente causal do crestamento comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), sobreviveu durante sete meses em restos culturais colocados na superfície do solo e concluiu que este tempo de sobrevivência foi suficiente para a bactéria atravessar o inverno e servir como fonte de inóculo na estação seguinte.

Em áreas de produção de uva no Vale do Submédio São Francisco, Xcv sobrevive de um ciclo para o outro em videiras, bacelos e mudas infectados; epifiticamente em folhas e ramos de videiras assintomáticos (ARAÚJO, 2001); em restos culturais (NASCIMENTO et al., 2000) e em hospedeiros alternativos (PEIXOTO et al., 2007). Pesquisa relacionada à preservação de Xcv relatou que este patógeno, sob condições de laboratório, sobreviveu por até 5 meses em folhas infectadas herborizadas (NASCIMENTO; MARIANO; GAMA, 2005). Os autores sugerem que este resultado é um indicativo da sobrevivência do patógeno em restos culturais, servindo como fonte de inóculo primário para novos ciclos da cultura, dentro do parreiral.

A compostagem oferece soluções viáveis para a reciclagem de resíduos de plantas. Contudo, o uso do material compostado requer uma adequada qualidade microbiológica e físico-química (ELLORRIETA et al., 2003). A sobrevivência de microrganismos fitopatogênicos em restos de cultura é bem conhecida (CONWAY, 1996). Portanto, a compostagem de qualquer resíduo cultural requer a confirmação de que o processo possui a capacidade de eliminar fitopatógenos que podem estar presente no material a ser compostado (HOITINK; HERR; SCHMITTHENNER, 1976; BOLLEN, 1985).

A erradicação de patógenos de plantas que infestam restos culturais durante o processo de compostagem se deve basicamente a três fatores: (1) altas temperaturas às quais estes patógenos são expostos, (2) liberação de compostos tóxicos durante e após a

fase termofílica e (3) antagonismo microbiano em zonas de temperatura sub-letal das pilhas ou durante o processo de cura (HOITINK; FAHY, 1986). Na província de Almeria (Espanha), Elorrieta et al. (2003) investigaram a sobrevivência das bactérias fitopatogênicas *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al., *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *P. syringae* pv. *syringae* van Hall durante o processo de compostagem de restos culturais de hortaliças. Todas as bactérias fitopatogênicas foram erradicadas em menos de 60 h de compostagem. Segundo Noble e Roberts (2004) durante a compostagem o efeito da temperatura em combinação com outros fatores de sanitização foram capazes de erradicar aproximadamente 64 fitopatógenos. Hoitink, Herr e Schmitthenner (1976) observaram a eliminação de *Phytophthora cinnamomi* Rands e *Pythium irregulare* Buisman infectando coroa e raízes de rododendro (*Rhododendron chysanthum* Pall), *Rhizoctonia solani* Kühn causando infecção em beterraba açucareira (*Beta vulgaris* L.) e *Dickeya chrysantemi* (Burkholder et al.) Samson et al. infectando fragmentos de crisântemo (*Chrysanthemum* sp.), quando estes materiais vegetais foram compostados com tecido corticoso de árvores lenhosas. A compostagem aeróbica de resíduos de plantas condimentares por 21 dias foi capaz de eliminar *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., *R. solani*, *Verticillium dahliae* Kleb. e inviabilizar esclerócios de *Sclerotium rolfsii* Sacc. em restos culturais colonizados por estes patógenos (YUEN; RAABE, 1984). Raízes de couve de Bruxelas (*Brassica oleraceae* L. var. *gemmifera* Zenk.) e couve comum (*B. oleraceae* L.) infectadas por *Plasmodiophora brassicae* Woronin compostados em larga escala com galhos lenhosos e restos de vegetais e frutos, eliminou o patógeno após 6 a 7 dias de compostagem (FAYOLLE et al., 2006). Além dos exemplos acima citados, o processo de compostagem eliminou de restos culturais os fungos *Phytophthora cryptogea* Pethybr. e Laff., *P. irregulare*, *Botrytis alli* Munn, *Sclerotium cepivorum* Berk. e *Didymella*

*lycopersici* Kleb. entre outros fitopatógenos (NOBLE; ROBERTS, 2004). É importante salientar que além de eliminar fitopatógenos de restos culturais, existem vários relatos do sucesso da utilização de compostos orgânicos na supressão de doenças radiculares causadas por fungos, bactérias e nematóides (HOITINK; FAHY, 1986).

Tendo em vista a importância da videira e do cancro-bacteriano, e ainda devido à ausência de trabalhos sobre limpeza clonal de mudas de videira e sobrevivência de *X. campestris* pv. *viticola*, este trabalho teve como objetivos: (1) Desenvolver metodologia de limpeza clonal de videiras cv. Red Globe e (2) analisar a sobrevivência do patógeno em tecidos infectados de videira no solo e durante o processo de compostagem. A consecução destes objetivos permitirá a obtenção de mudas da cv. Red Globe livres do patógeno e subsidiará o manejo correto de restos de poda nos parreirais.

## Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MENEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ULISSES, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 363-366, 2000.

ARAÚJO, J. S. P. **Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) no Brasil**. 2001. 121 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ARAÚJO, J. S. P.; OLIVEIRA, B. C.; REIS JR., F. B.; ROBBS, C. F.; RIBEIRO, R. L. D. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, Suplemento, p. 236, 2003.

ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. F.; MACIEL, G. F. Novos hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.23. 1999.

BALL, E. Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and *Lupinus albus* L. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 33, p. 301-318, 1946.

BARLASS, M. Elimination of stem pitting and corky bark diseases from grapevine by fragmented shoot apex culture. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 110, n. 3, p. 653-656, 1987.

BOLLEN, G. J. The fate of plant pathogens during composting of crop residues. In: GRASSER, J. K. R. (Ed). **Composting of Agricultural and Other Wastes**. London: Elsevier, 1985, p. 282-290.

CAMARGO, U. A. Melhoramento genético da videira. In: SOUZA LEÃO, P. C.; SOARES, J. M. (Eds.). **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina:EMBRAPA-CPATSA, 2000. p. 65-91.

CHAND, R.; KISHUN, R. Outbreak of grapevine bacterial canker disease in India. *Vitis*, Siebeldingen, v. 29, n. 3, p. 183-188, 1990.

CHAND, R.; PATIL, P. B.; KISHUM, R. Management of bacterial canker disease (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) of grape vine (*Vitis vinifera*) by pruning. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 61, n. 3, p. 220-222, 1991.

CONWAY, K. E. An overview of the influence of sustainable agricultural systems on plant disease. *Crop Protection*, Great Britain, v. 15, n. 3, p. 223-228, 1996.

DE BOER, S. H. Survival of phytopathogenic bacteria. In: MOUNT, M. S.; LACY, G. H. (Eds.). **Phytopathogenic Prokaryotes**. New York: Academic Press, 1982. p. 285-306.

ELORRIETA, M. A.; SUÁREZ-ESTRELLA, M. J.; LÓPEZ, M. C.; VARGAS-GARCÍA, J.; MORENO, J. Survival of phytopathogenic bacteria during waste composting. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 96 n. 1, p. 141-146, 2003.

FAO. FAOSTAT – **Agricultural statistics database**. Rome: World Agricultural Information Centre, 2007. Disponível em: <<http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.pl>>. Acesso em: 20 jan. 2008.

FAYOLLE, L.; NOBLE, R.; COVENTRY, E.; AIME, S.; ALABOUVETTE, C. Eradication of *Plasmodiophora brassicae* during composting of waste. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 553-558, 2006.

FITCH, M. M. M.; LEHRER, A. T.; KOMOR, E.; MOORE, P. H. Elimination of *Sugarcane yellow leaf virus* from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay. **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 676-680, 2001.

GILBERTSON, R. L.; RAND, R. E.; HAGEDORN, D. J. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic strains of *X. campestris* in bean debris. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 4, p. 322-327, 1990.

GRIBAUDO, I.; RUFFA, P.; CUOZZO, D.; GAMBINO, G.; MARZACHI, C. Attempts to eliminate phytoplasmas from grapevine clones by tissue culture techniques. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 315-316, 2007.

GRUM, M.; CAMLOH, M.; RUDOLPH, K.; RAVNIKAR, M. Elimination of bean-borne bacteria by thermotherapy and meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**, Dordrecht, v. 53, n. 1, p. 79-82, 1998.

HOITINK, H. A. J.; FAHY, P. C. Basis for the control of soil-borne plant pathogens with composts. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, n. 1, p. 93-114, 1986

HOITINK, H. A. J.; HERR, L. J.; SCHMITTHENNER, A. F. Survival of some plant pathogens during composting of hardwood tree bark. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, n. 12, p. 1369-1372, 1976.

HOLT, G. J.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

IBRAF. 2007. **Instituto Brasileiro de Frutas** – Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/x-no/iol/a7n42mail.htm>>. Acesso em: 20 out. 2008.

INSTRUÇÃO NORMATIVA DAS Nº 38, de 14 de outubro de 1999. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, 26 de outubro de 1999, seção 1, p. 23.

JONES, J. B.; POHRONEZNY, K. L.; STALL, R. E. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 4, p. 430-434, 1986.

GILBERTSON, R. L.; RAND, R. E.; HAGEDORN, D. J. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic strains of *X. campestris* in bean debris. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 4, p. 322-327, 1990.

GRIBAUDO, I.; RUFFA, P.; CUOZZO, D.; GAMBINO, G.; MARZACHI, C. Attempts to eliminate phytoplasmas from grapevine clones by tissue culture techniques. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 2, p. 315-316, 2007.

GRUM, M.; CAMLOH, M.; RUDOLPH, K.; RAVNIKAR, M. Elimination of bean-borne bacteria by thermotherapy and meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**, Dordrecht, v. 53, n. 1, p. 79-82, 1998.

HOITINK, H. A. J.; FAHY, P. C. Basis for the control of soil-borne plant pathogens with composts. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, n. 1, p. 93-114, 1986

HOITINK, H. A. J.; HERR, L. J.; SCHMITTHENNER, A. F. Survival of some plant pathogens during composting of hardwood tree bark. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, n. 12, p. 1369-1372, 1976.

HOLT, G. J.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

IBRAF. 2007. **Instituto Brasileiro de Frutas** – Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/x-no/iol/a7n42mail.htm>>. Acesso em: 20 out. 2008.

INSTRUÇÃO NORMATIVA DAS Nº 38, de 14 de outubro de 1999. **DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, Brasília, 26 de outubro de 1999, seção 1, p. 23.

JONES, J. B.; POHRONEZNY, K. L.; STALL, R. E. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 76, n. 4, p. 430-434, 1986.

KRUL, W. R.; MOWBRAY, G. H. Grapes. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds). **Handbook of Plant Cell Culture**. New York: Macmillan, 1984, p. 396-434.

KUHN, G. B.; LOVATEL, J. L.; PREZOTTO, O. P.; RIVALDO, O. F.; MANDELLI, F.; SÔNEGO, O. R. **O cultivo da videira: Informações Básicas**. 2. ed. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPV, 1986. 60p (EMBRAPA-CNPV. Circular Técnica, 10).

LEÃO, P. C. S.; POSSÍDIO, E. L. Histórico da videira. In: SOUZA LEÃO, P. C.; SOARES, J. M. (Eds.). **A viticultura no Semi-Árido brasileiro** Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 2000, p. 13-17.

LEBEN, C. How plant-pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 65, n. 8, p. 633-637, 1981.

LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V.; MOREIRA, W. A.; DIANESE, J. C. Bacterial canker of grapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 3, p. 440-443, 1999.

LLORENTE, A. Nuevas variedades de uva de mesa: su comportamiento y manejo cultural. In: JORNADAS LATINO AMERICANAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA "UVAS Y VINOS DEL V CENTENARIO", 5., 1992, Montevideo, Uruguay. **Anales...** Montevideo: Asociación de Enólogos del Uruguay, 1992. p. 1-9.

LOPES, D. B. Cancro-bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, suplemento, p. S83-S85, 2006.

LOPES, D. B. L.; NASCIMENTO, A. R. P. Situação atual do cancro bacteriano da videira no semi-árido nordestino. In: Seminário novas perspectivas para o cultivo de uvas sem sementes no Vale do São Francisco. Junho, 2004. Petrolina: Embrapa Semi-Árido. (documento 185).

MALAVOLTA JR., V. A.; BERIAM L. O. S.; ALMEIDA I. M. G, RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 34, Suplemento, p. 9-88, 2008.

MALAVOLTA JR., V. A.; ALMEIDA, I. M. G.; SUGIMORI, M. H.; RIBEIRO, I. J. A; RODRIGUES NETO, J.; PIRES, E. J. P.; NOGUEIRA, E. M. C. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 25, n 3, p. 262-264, 1999.

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

MARCANO, M.; TRUJILLO, G. Perpetuación de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Berthet y Bonder) Dye. en el suelo através de restos de cosecha. **Agronomia Tropical**, Maracay, v. 34, n. 1, p. 7-19, 1984.

MARQUES, E. **Variabilidade e tolerância ao cobre em *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, agente causal do cancro-bacteriano da videira (*Vitis* spp.)**. 2007. 129 f. Tese (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília.

MILLUS, E. A.; MIRLOHI, A. F. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *Translucens* between successive wheat crops in Arkansas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, n, 3, p.263-265, 1995.

McCARTER, S. M.; JONES, J. B.; GITAITIS R. D.; SMITLEY D. R. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue, and epiphytic weed hosts in Georgia. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 10, p. 1393-1398, 1983.

NASCIMENTO, A. R. P.; MASHIMA, C. H.; LIMA, M. F. **Cancro bacteriano: nova doença da videira no submédio São Francisco**. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido, 2000. 22 p. (Embrapa Semi-Árido. Circular Técnica; 58).

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; GAMA, M. A. S. Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p.650-654, 2005.

NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grape. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 73, p. 183-186, 1972.

NOBLE, R.; ROBERTS, S. J. Eradication of plant pathogens and nematodes during composting: a review, **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 548-568, 2004.

PANATTONI, A.; D'ANNA, F.; CRISTANE, C.; TRIOLO, E. *Grapevine vitivirus A* eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 146, n. 1, p. 129-135, 2007.

PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36 n. 4, p.1317-1320, 2006.

PEIXOTO, A. R.; MARIANO, R. L. R.; MOREIRA, J. O. T.; VIANA, I. O. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 161-164, 2007.

**PROGNÓSTICO AGRÍCOLA**. São Paulo, SP; IEA, v. 2, p.2 10, 1998.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2ª. Ed. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária 2005. 417p.

SCHAAD, N. W.; WHITE, W. C. Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, n. 5, p. 1518-1520, 1974.

SILVA, P. C. G; CORREIA, R. C. Caracterização social e econômica da videira. In: SOUZA LEÃO, P. C.; SOARES, J. M. (Eds.). **A viticultura no semi-árido brasileiro** Petrolina: EMBRAPA. 2000. p.19-44.

TAVARES, S. C. C. de H. **Principais Doenças das culturas de: manga, uva, acerola e banana**. Petrolina, PE: EMBRAPA. CPATSA, 1995. 1 v. Apostila do Curso de Atualização Técnica para Engenheiros Agrônomos do Banco do Brasil, Petrolina, PE, 1995.

TAVARES, S. C. C. de H; MENEZES, M. Processo de infecção de *Botryodiplodia theobromae* em plantas de mangueira e videira no Trópico Semi-Árido brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, n 2, p. 55, 1991.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA. 1998. p. 133-145.

TRINDADE, L. C.; LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fringerprinting. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 46-54, 2005.

TRINDADE, L. C.; MARQUES, E.; LOPES, D. B.; FERREIRA, M. A. S. V. Development of a molecular method for detection and identification *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* . **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 16-23, 2007.

VALARINI, P. J.; SPADOTTO, C. A. Identificação de nichos de sobrevivência de fitopatógenos em áreas irrigadas de Guairá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 10, p. 1239-1243, 1995.

VAUTERIN, L.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

YUEN, G. Y.; RAABE, R. D. Effects of small-scale aerobic composting on survival of some fungal plant pathogens. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 68, n, 2, p.134-136, 1984.

ZHAO, Y.; DAMICOMI, J. P.; BENDER, C. L. Detection, survival, and sources of inoculum for bacterial diseases of leafy crucifers in Oklahoma. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 8 p. 883-888, 2002.

## Capítulo II

---

### LIMPEZA CLONAL DE VIDEIRA COM CANCRO-BACTERIANO

## Limpeza clonal de videira com cancro-bacteriano

Adriano Márcio Freire Silva<sup>(1)</sup>, Natoniel Franklin de Melo<sup>(2)</sup>, Elineide Barbosa da Silveira<sup>(3)</sup>, Rosa de Lima Ramos Mariano<sup>(1)</sup>, Erienne Fonseca de Menezes<sup>(2)</sup> e Ângela Katiusia Coelho<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Fitossanidade, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900. E-mails: adrianomfsilva@yahoo.com.br, rmariano@truenet.com.br.

<sup>(2)</sup>Embrapa Semi-Árido, Caixa Postal 23, Petrolina, PE. CEP 56302-970. E-mail: natoniel@embrapa.cpatsa.br.

<sup>(3)</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Microbiologia. E-mail: elineidebs@yahoo.com.br

### Resumo

Técnicas de cultura de tecidos em meio de Galzy modificado (MGM) foram estudadas visando eliminar *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) de mudas de videira 'Red Globe'. O primeiro experimento visou selecionar o tamanho ideal de ápices e gemas axilares para o cultivo em MGM; o segundo, verificar o efeito da termoterapia (38°C/quatro semanas) associada ao cultivo em MGM; e o terceiro, testar antibióticos para eliminação de Xcv em explantes oriundos de videiras infectadas. Todas as plantas obtidas sem contaminação *in vitro* e meios de cultivo contaminados foram indexados utilizando o meio ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura-ampicilina (NYDAM) seguindo-se teste de patogenicidade. O cultivo de explantes com 3 mm possibilitou a obtenção de plantas livres da bactéria, com regeneração 14,3 vezes maior que explantes de 1 mm de comprimento. A termoterapia de mudas infectadas associada ao cultivo *in vitro* não eliminou o patógeno. O cultivo de explantes com 10 mm durante 40 dias em MGM+cefotaxima (300 mg L<sup>-1</sup>) proporcionou limpeza clonal das mudas. A indexação em NYDAM permitiu a visualização do crescimento característico de Xcv. A indexação de plantas de videira regeneradas *in vitro* quanto à infecção por Xcv utilizando NYDAM é uma alternativa econômica e eficiente para produção de plantas selecionadas.

Termos para indexação: *Vitis vinifera*, cultivo *in vitro*, fitopatologia

### Abstract

Techniques of tissue culture in modified Galzy medium (MGM) were studied in order to eliminate *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) from 'Red Globe' grapevine plants. The first experiment aimed to select the ideal length of meristem tips and axillary buds for cultivation in MGM; the second to verify the effect of the thermotherapy (38°C/four weeks) associated to the MGM cultivation; and the third intended to test antibiotics to eliminate Xcv from explants taken from infected grapevines. All plants obtained without contamination *in vitro* and culture media contaminated were indexed by using the semi-selective culture media nutrient agar-dextrose-yeast extract-ampicilin (NYDAM) followed by a pathogenicity test. The cultivation of 3 mm explants permitted to obtain plants free of bacteria with regeneration 14.3 times higher than 1 mm explants. The thermotherapy of infected plants associated to the *in vitro* culture did not eliminate the pathogen. The cultivation of 10 mm explants for 40 days in MGM+cefotaxime (300 mg L<sup>-1</sup>) eliminated Xcv from grapevine plants. The indexation in NYDAM permitted the visualization of specific Xcv growing. The indexation of *in vitro* regenerated grapevine plants for Xcv infection by using NYDAM medium is an economic and efficient alternative for production of selected plants.

Index terms: *Vitis vinifera*, *in vitro* culture, phytopathology

### Introdução

A intensificação do cultivo da videira e o plantio de cultivares suscetíveis, além das condições climáticas prevalentes no Vale do Submédio São Francisco têm propiciado o surgimento de problemas fitossanitários, afetando diretamente a produção (Tavares, 1995).

No início de 1998, o cancro-bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye (Xcv) foi detectado pela primeira vez em parreirais dessa região, onde a doença vem causando prejuízos em cultivares suscetíveis. Em plantios de 'Red Globe' foi

52 detectada incidência de até 100% (Lima et al., 1999), o que demonstra a alta susceptibilidade  
53 desta cultivar. Em decorrência disto, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
54 (MAPA) publicou a Instrução Normativa N° 09 de 20 de Abril de 2006, proibindo a produção e  
55 comercialização de mudas de 'Red Globe', além da erradicação e substituição por outras  
56 cultivares. Este fato foi limitante para a viticultura do Vale do Submédio São Francisco, pois a  
57 'Red Globe' apresenta boa produtividade, cachos médios a grandes, bagas muito grades e com  
58 boa aderência ao pedicelo (Albuquerque, 1996).

59 A contaminação de material propagativo por patógenos pode se apresentar na forma  
60 latente e representa um grande problema para a propagação vegetativa. Provavelmente todas as  
61 espécies assim propagadas estão infectadas com um ou mais patógenos, os quais são transmitidos  
62 e acumulados com propagações sucessivas e podem manifestar-se pela redução do vigor e da  
63 produtividade das culturas (Torres et al., 1998).

64 Uma das principais medidas utilizadas no manejo do cancro-bacteriano da videira é a  
65 utilização de material propagativo livre do patógeno (Nascimento & Mariano). Na ausência de  
66 um produto químico capaz de erradicar eficientemente vírus e bactérias de plantas infectadas,  
67 técnicas de cultura de ápices caulinares vêm sendo utilizadas desde 1952 para eliminação desses  
68 patógenos, visando à obtenção de material de multiplicação com alta qualidade fitossanitária  
69 (Torres et al., 1998). Além dos vírus e bactérias, os viróides e fitoplasmas também podem ser  
70 eliminados com o cultivo *in vitro* de ápices e meristemas, que permitem o estabelecimento de  
71 culturas com baixíssimo índice de perdas por contaminação (Barlass, 1987).

72 Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi aplicar técnicas de cultura de tecidos para  
73 promover a limpeza clonal de mudas de videira da cultivar 'Red Globe', visando eliminar Xcv.

## 74 **Material e Métodos**

### 75 **Determinação do tamanho mínimo do explante**

Plantas da cultivar 'Red Globe', produzidas na Estação Experimental de Bebedouro da Embrapa Semi-Árido, foram mantidas durante 20 dias em casa de vegetação e submetidas a duas pulverizações semanais com o fungicida Iprodione ( $1\text{mL L}^{-1}$ ), com o objetivo de diminuir o índice de contaminação por fungos, durante o processo de introdução dos explantes *in vitro*. Três dias após o final do tratamento químico, as plantas foram inoculadas com o isolado Xcv3, pertencente à coleção de culturas do laboratório de fitopatologia da Embrapa Semi-Árido, pela deposição de crescimento bacteriano com 24 a 48 h de cultivo a  $28^{\circ}\text{C}$  em meio NYDA (dextrose 10, extrato de carne 3, extrato de levedura 5, ágar  $18\text{ g L}^{-1}$ ) em ferimentos feitos com uma agulha nos internódios do ramo principal das plantas. Após a inoculação, os ferimentos foram cobertos com algodão umedecido e envolvidos por papel alumínio, formando-se uma câmara úmida que permaneceu por 72 horas. Após o surgimento dos sintomas da doença, ápices caulinares e as três primeiras gemas axilares foram retirados das plantas e desinfestados em solução de álcool a 70% durante 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% durante 20 minutos, seguindo-se três lavagens em água destilada e esterilizada. Após a assepsia, os explantes foram cortados e reduzidos para 10, 3 e 1 mm de comprimento e introduzidos em tubos de ensaio ( $17 \times 2\text{ cm}$ ) contendo meio de Galzy (1964) modificado (MGM) pela adição de AIA (ácido indolacético)  $0,1\text{ mg L}^{-1}$ ; mio inositol  $100\text{ mg L}^{-1}$ ; glicina  $2\text{ mg L}^{-1}$ ; e ágar  $10\text{ g L}^{-1}$ , sendo o pH ajustado para 5,9 antes da autoclavagem. O preparo dos explantes com 3 mm e 1 mm foi realizado com ajuda de microscópio estereoscópico. Os tubos de ensaio foram incubados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz, temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  e intensidade luminosa de  $40\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}$ . Após três semanas, o experimento foi avaliado quanto ao percentual de contaminação pela presença de crescimento bacteriano sobre ou dentro do meio de cultura. Passados quatro meses foi avaliado o percentual de regenerantes e todas as plantas obtidas foram indexadas.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições, sendo cada repetição constituída por cinco tubos de ensaio contendo os explantes.

#### **Utilização da termoterapia para eliminação de Xcv em mudas de videira infectadas**

Todo o processo preliminar de tratamento químico das plantas, inoculação de Xcv3, coleta de explantes, assepsia, inoculação dos explantes em tubos de ensaio com MGM e condições de incubação dos tubos na sala de crescimento foi realizado de acordo com o item anterior.

Após a inoculação com Xcv3, quatro plantas foram mantidas em casa de vegetação a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e quatro foram levadas para uma câmara de termoterapia, onde permaneceram durante quatro semanas a temperatura de  $38^\circ\text{C}$ . Após três semanas, o experimento foi avaliado quanto ao percentual de contaminação como já descrito. Em função do tamanho de explante utilizado, 3 mm, o qual foi escolhido baseado nos resultados do experimento anterior, a indexação e o percentual de regeneração somente puderam ser avaliados após 70 dias de cultivo.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos (com termoterapia e sem termoterapia) e quatro repetições, sendo cada repetição constituída por quatro tubos de ensaio contendo os explantes.

#### **Utilização de diferentes antibióticos para eliminação de Xcv em explantes oriundos de mudas de videira infectadas**

Todo o processo preliminar de tratamento químico das plantas, inoculação de Xcv3, coleta de explantes, assepsia, inoculação dos explantes em tubos com MGM e condições de incubação dos tubos na sala de crescimento foi realizado de acordo com o item anterior.

Neste experimento, a escolha dos antibióticos foi realizada com base no trabalho de Peixoto et al. (2006). Ao MGM foram adicionados separadamente, os antibióticos tetraciclina ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ), cefotaxima ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ), cloranfenicol ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido nalidíxico ( $300 \text{ mg L}^{-1}$ ),

eritromicina ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ) e estreptomicina ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) sob condições assépticas, por meio de filtragem a frio com Millipore de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ . Após a adição dos antibióticos, explantes com  $10 \text{ mm}$  de comprimento foram introduzidos ao meio de cultivo. Passados 40 dias, o experimento foi avaliado quanto ao percentual de contaminação e regeneração. Após esta avaliação, todos os explantes que regeneraram ou não, mas que não apresentavam visualmente contaminação bacteriana, foram transferidos para um meio MGM sem antibiótico. Decorridos 45 dias de cultivo neste meio, todo material vegetal *in vitro* foi avaliado quanto à presença de crescimento bacteriano e os regenerantes foram indexados.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos (6 antibióticos e uma testemunha sem antibiótico) quatro repetições, sendo cada repetição constituída por 4 tubos de ensaio.

#### **Indexação do material *in vitro***

Com a finalidade de verificar se o meio semi-seletivo NYDAM (dextrose 10, extrato de carne 3, extrato de levedura 5, peptona 5, ágar 18, ampicilina  $0,1 \text{g L}^{-1}$ ) (Peixoto et al., 2006) servia como ferramenta de indexação do material *in vitro*, foi necessário conhecer sua sensibilidade e eficácia. Para tanto, suspensão bacteriana do isolado Xcv3 com  $10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$  foi submetida a diluição em série, e alíquotas de  $100 \text{ }\mu\text{L}$  de cada diluição foram plaqueadas em triplicata em meio de cultura NYDAM e NYDA concomitantemente. As placas foram incubadas em B.O.D (Biochemistry Oxygen Demand) por 48-72 h, a  $28^\circ\text{C}$ , quando foi feita a contagem de colônias. A eficácia foi determinada pela fórmula  $E (\%) = [(UFC \text{ em meio NYDAM}/(UFC \text{ em NYDA})) \times 100$  (Wydra et al., 2004).

Todo material apresentando contaminação bacteriana foi submetido à indexação que consistiu da repicagem do crescimento bacteriano sobre ou sob o MGM ou ainda sobre o explante, para o meio semi-seletivo NYDAM. Colônias com coloração branca e aspecto viscoso foram repicadas para tubos de ensaios contendo meio NYDA e após 48 h, foram inoculadas em

mudas da cultivar Red Globe, observando-se o aparecimento dos sintomas da doença. Por outro lado, os explantes que se desenvolveram e não apresentaram contaminação *in vitro*, foram multiplicados por segmentos nodais, sendo no ato da repicagem retiradas amostras (fragmento de 1 cm de comprimento da região mediana do caule principal) de todos os clones obtidos, as quais foram colocadas em eppendorfs contendo 100  $\mu$ L de água destilada e esterilizada e, em seguida, maceradas. Após a maceração, todo material contido nos eppendorfs foi coletado com micropipetador, dispensado e espalhado com a ajuda de uma alça de Drigalsky em placas de Petri contendo NYDAM, as quais foram incubadas em B.O.D. a uma temperatura de 28°C durante 48 a 72 h, quando foram avaliadas quanto à presença e ausência de colônias bacterianas.

### **Análises Estatísticas**

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SAEG (Sistema de análises estatísticas e genéticas, Viçosa, UFV, 1997).

### **Resultados e Discussão**

No experimento de tamanho de explantes, verificou-se pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, que aqueles com 1 mm de comprimento apresentaram percentual de contaminação significativamente menor que os demais (Tabela 1). Explantes com 10 e 3 mm de comprimento diferiram entre si, e mostraram percentuais de contaminação de 100 e 50%, respectivamente. Com relação ao percentual de regeneração observou-se pelo teste de  $\chi^2$  que explantes com 1 mm apresentaram regeneração significativamente menor que aqueles com 3 mm de comprimento (Tabela 1). Explantes com 10 mm de comprimento não apresentaram regeneração, pois todos os explantes deste tratamento apresentaram contaminação. O teste de razão de chance mostrou que a chance dos explantes com 3 mm regenerarem é 14,3 vezes maior que as dos explantes com 1 mm de comprimento. Segundo Pierik (1987), a percentagem de plantas obtidas mediante a cultura de ápices caulinares é geralmente baixa devido a fatores como

infecção, ressecamento, oxidação, meio de cultivo inadequado, além do fenômeno de dormência. Grattapaglia & Machado (1998) afirmaram que quanto menor o tamanho do explante, maiores são as chances de obter material propagativo livre de patógenos e menor é a capacidade organogênica. Karta & Gamborg (1975) verificaram que ápices caulinares de mandioca com menos de 0,2 mm, embora estivessem livres de vírus, somente formavam calo ou raízes. Entre 0,2 e 0,8 mm, 90 a 95% desses ápices caulinares regeneravam plantas livres do patógeno, enquanto que plantas regeneradas de explantes com 0,9 e 1 mm apresentavam sintomas de virose. O cultivo *in vitro* de gemas axilares de videiras cvs. Barbera e Chardonnay infectadas com os fitoplasmas “flavescence dorée” e “bois noir” permitiu a obtenção de grande quantidade de plântulas livres do patógeno, após 6 a 8 meses de cultivo (Gribaudo et al., 2007). Baptista et al. (1993) verificaram que o cultivo *in vitro* de ápices caulinares com 3 primórdios foliares de sete variedades de videira, possibilitou a obtenção de mudas livre de vírus a partir de mudas infectadas com os vírus do enrolamento das folhas, fendilhamento cortical e mosaico das nervuras, isoladamente ou em mistura. Albuquerque et al. (2000) visando obter a limpeza clonal de mudas de abacaxizeiro infectadas por *Fusarium subglutinans* através do cultivo de ápices caulinares com 1 mm de comprimento, verificaram que 100% das plantas regeneradas estavam livres do patógeno. O cultivo *in vitro* de segmentos nodais de amora com 2 cm de comprimento foi suficiente para promover a limpeza clonal de 70 a 90% de mudas infectadas por fitoplasma. Tal resultado foi confirmado pela detecção por fluorescência com 4,6 diamidino-2-fenilindol (DAPI), reação em cadeia da polimerase (PCR) e observação de sintomas durante e após o período de aclimação (Dai et al., 1997).

No presente estudo, após três semanas de cultivo dos explantes submetidos à termoterapia, observou-se que, ao contrário do esperado, explantes provenientes de plantas da termoterapia apresentaram percentual de contaminação significativamente maior (93,0%) quando comparado às plantas não tratadas e mantidas em casa de vegetação (43,7%). Nesse caso, foi

observado que o percentual de regeneração de plantas não tratadas foi de 77,7% (Tabela 2). A total ineficiência do tratamento termoterápico pode estar associada à utilização de uma temperatura incapaz de erradicar o patógeno, 38°C. Sabe-se que Xcv em meio de cultura líquido cresce a 35°C, mas não cresce a 40°C (Nascimento et al., 2005), sendo desconhecido o que acontece neste intervalo de temperatura. Além disso, dentro da planta, a bactéria está protegida, podendo, possivelmente, suportar temperaturas mais altas. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade das condições de incubação terem favorecido o patógeno, visto que a câmara de termoterapia é um sistema fechado e que, para a manutenção das plantas vivas, é necessário irrigá-las, elevando a umidade relativa do ambiente. Tais condições são extremamente favoráveis para a proliferação de microrganismos em geral, especialmente bactérias, o que foi comprovado pela observação do aparecimento de novos cancos nas plantas durante o tratamento termoterápico. Segundo Torres et al. (1998) a termoterapia é um tratamento que se destaca na recuperação de plantas livres de patógenos, sendo mais eficiente contra vírus isodiamétricos e micoplasmas. Grum et al. (1998) observaram que o tratamento a calor seco (47-48°C) de sementes de feijão, associado à termoterapia de plântulas (37°C) e combinado com cultura de ápices e meristemas foi capaz de erradicar *X. campestris* pv. *phaseoli* e *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* e desta forma produzir plantas de feijoeiro livres desses patógenos.

No que concerne ao experimento com antibióticos, verificou-se que após 40 dias, os tratamentos com cefotaxima, tetraciclina e cloranfenicol aos quais foram submetidos explantes com 10 mm não apresentaram contaminação, diferindo dos demais antibióticos pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 3). É importante ressaltar que os antibióticos eritromicina, estreptomicina e ácido nalídixico não inibiram Xcv. Resultados diferentes foram observados por Peixoto et al. (2006) que realizaram antibiograma com discos contendo dosagens 100 vezes menores que as utilizadas no presente trabalho. Segundo Leifert et al. (1991) antibióticos adicionados ao meio de cultura podem ser uma alternativa para prevenir, eliminar ou

diminuir a incidência de bactérias. Barrett & Cassells (1994) observaram que a adição de cefotaxima ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) em meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), foi capaz de eliminar *X. campestris* pv. *pelargonii* e produzir plantas de gerânio livres do patógeno. Donato et al (2005) concluíram que o uso dos antibióticos cefotaxima e amoxicilina nas concentrações de 200 e  $300 \text{ mg L}^{-1}$  durante 30 dias foram capazes de eliminar a bactéria endofítica *Acetobacter diazotrophicus* em plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*. Lima & Moreira (2002) verificaram maior eficiência no controle de contaminação bacteriana de explantes de bananeira cv. Caipira, quando os mesmos foram desinfestados em hipoclorito de sódio a 5%, seguido da imersão em solução com  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de rifampicina por vinte minutos, e posterior cultivo em meio nutritivo contendo  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de rifampicina. Por outro lado, Wongkaew & Flecher (2004) observaram que o cultivo de gemas axilares de cana-de-açúcar infectadas por fitoplasma, em meio de cultura MS acrescido de  $200\text{-}500 \text{ mg L}^{-1}$  de oxitetraciclina, resultou apenas na remissão dos sintomas das plantas regeneradas por até oito subcultivos.

Apesar dos antibióticos cefotaxima, tetraciclina e cloranfenicol terem controlado totalmente o aparecimento de bactérias no meio de cultura, verificou-se fitotoxidez nos explantes e ausência de regeneração dos mesmos quando os dois últimos antibióticos foram utilizados (Tabela 3). No entanto, mesmo apresentando algumas folhas mal formadas, 68,75% dos explantes tratados com  $300 \text{ mg L}^{-1}$  de cefotaxima foram capazes de regenerar no meio com antibiótico e após serem cultivados por 45 dias em meio sem antibiótico, dar origem a plantas normais (Tabela 3), as quais foram consideradas negativas quando indexadas em meio NYDAM. Muitos antibióticos apresentam efeito fitotóxico, alterando o crescimento das plantas *in vitro* (Dodds & Roberts, 1985). Entretanto, essa influência sobre a regeneração vegetal depende da concentração à qual o tecido é exposto e da tolerância da espécie tratada (Okkels & Pedersen, 1988). Biasi (1995) verificou que plântulas de abacateiro cv. Ouro verde cultivadas na presença isolada de cloranfenicol ( $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido nalidíxico ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) e estreptomicina ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ )

apresentaram sintomas de fitotoxidez. Duhem et al. (1988) verificaram que cefotaxima adicionada no meio de cultivo de café e cacau controlavam a contaminação bacteriana e as plantas não apresentavam sintomas de toxidez. Este antibiótico pertence ao grupo das cefalosporinas, as quais, segundo Okkels & Pedersen (1988), apresentam menor capacidade de causar fitotoxidez a tecidos vegetais quando comparado, por exemplo, com os antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos. Oxitetraciclina, na concentração de  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , promoveu a necrose de 50% de plântulas de cana-de-açúcar cultivadas em meio nutritivo acrescido deste antibiótico. Entretanto quando as plantas sobreviventes foram retiradas do meio com o antibiótico e colocadas em meio sem antibiótico, observou-se uma rápida recuperação das plantas (Wongkaew & Fletcher, 2004).

A sensibilidade e a eficácia do meio NYDAM na detecção de Xcv foi de  $10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$  e 44%, respectivamente. Embora existam métodos de detecção molecular e sorológico para Xcv, estes ainda apresentam desvantagens para a utilização como ferramenta de indexação de material vegetal oriundo de cultivo *in vitro*. No método molecular, a presença do patógeno só pode ser verificada, após enriquecimento em meio de cultivo antes da PCR, ou seja, tal método é pouco eficiente para detectar a bactéria diretamente do tecido vegetal (Trindade et al, 2007). Já o método sorológico apresenta uma baixa sensibilidade, pois a detecção de Xcv, via ELISA indireto, só pôde ser observada em suspensões bacterianas com concentração de até  $10^4 \text{ UFC mL}^{-1}$  (Araújo et al., 2005). Meios semi-seletivos são valiosos para o isolamento de bactérias fitopatogênicas de tecidos de plantas e solo, e alguns podem ser tão sensíveis quanto a PCR ou mais sensíveis que técnicas imunológicas, sendo fáceis de usar e menos dispendiosos (Wang et al., 1999; Toussaint et al., 2001). Porém, os meios que restringem o surgimento de colônias de microrganismos saprofíticos geralmente apresentam baixa eficiência (Wydra et al., 2004). O NYDAM apresentou 44% de eficiência, o que não é baixo se comparado com o trabalho de Toussaint et al. (2001), que relataram eficiência de 5,7 a 30,6% para *X. campestris* pv. *vitiens* em

meio MMG. Em todos os experimentos foi verificado que, nos explantes contaminados, a bactéria contaminante era capaz de crescer no meio NYDAM, apresentar coloração branca, aspecto viscoso e capacidade de causar sintomas típicos do cancro-bacteriano. Por outro lado, todos os explantes que não apresentaram contaminação foram capazes de formar novas plantas, as quais foram negativas no teste de indexação utilizado. Portanto, nas atuais circunstâncias, a indexação de plantas regeneradas *in vitro* através da utilização do meio semi-seletivo NYDAM é uma alternativa econômica e eficiente para a seleção de plantas de videira, quanto à infecção por Xcv.

O tempo total de regeneração de novas plantas foi de 4 meses para explantes com 1 mm de comprimento e de 2 meses para explantes com 3 mm. A utilização de segmentos nodais para a multiplicação dos clones obtidos proporcionou a obtenção de quatro novas plantas a cada 2 meses. Após a fase de multiplicação, as plantas foram aclimatadas, sendo verificado um percentual de sobrevivência de 58%. As plantas aclimatadas foram avaliadas constantemente quanto ao aparecimento de sintomas de cancro-bacteriano. Passados oito meses em casa de vegetação nenhuma das plantas apresentou sintomas.

Neste trabalho, mediante o emprego de técnicas de cultura de tecidos, foi possível a obtenção de mudas de videira cv. Red Globe, livres de Xcv. Portanto, a implementação de um programa de multiplicação e distribuição de mudas micropropagadas sadias da referida cultivar poderá suprir as demandas de viveiristas para comercialização e de pesquisadores, para importantes estudos sobre este patossistema.

### Conclusões

1. O cultivo de explantes com 3 mm possibilitou a obtenção de plantas livres da bactéria, com regeneração 14,3 vezes maior que explantes de 1 mm de comprimento

2. A termoterapia de mudas infectadas associada ao cultivo *in vitro* não eliminou o patógeno
3. O cultivo de explantes com 10 mm durante 40 dias em MGM+cefotaxima (300 mg L<sup>-1</sup>) proporcionou limpeza clonal das mudas
4. A indexação de plantas de videira regeneradas *in vitro* quanto à infecção por Xcv utilizando NYDAM é uma alternativa econômica e eficiente para produção de plantas selecionadas

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Maria Tereza de Souza Ataíde pelo apoio técnico, a Embrapa e ao CNPq pelo apoio financeiro (Proc. 479.622/04-3), bolsas de Doutorado e Produtividade em Pesquisa.

**Tabela 1.** Percentual de contaminação e regeneração de explantes, com três diferentes comprimentos, oriundos de mudas de videira cv. Red Globe infectadas por *Xanthomonas campestris* pv *viticola*.

<b>Comprimento do explante (mm)</b>	<b>Contaminação (%)</b>	<b>Regeneração (%)</b>
<b>1</b>	<b>15 a<sup>1</sup></b>	<b>26<sup>**</sup></b>
<b>3</b>	<b>50 b</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>100 c</b>	<b>-<sup>2</sup></b>
<b>CV</b>	<b>15,3</b>	

<sup>1</sup>Dados seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. **\*\*p < 0,01.** Cálculo da significância estatística do percentual de regeneração entre com 1 e 3 mm baseado no teste de  $\chi^2$ . <sup>2</sup>Tratamento com 100% de contaminação, explantes não levados a meio sem antibiótico para regeneração.

**Tabela 2.** Percentual de contaminação bacteriana de explantes oriundos de mudas de videira cv. Red Globe infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* submetidas ou não a termoterapia, 38°C durante 4 semanas.

<b>Tratamento</b>	<b>Contaminação (%)</b>	<b>Regeneração (%)</b>
<b>Com termoterapia</b>	<b>93,0 a<sup>1</sup></b>	<b>-<sup>2</sup></b>
<b>Sem termoterapia</b>	<b>43,7 b</b>	<b>77,7</b>

<sup>1</sup>Dados seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. <sup>2</sup>Tratamento com elevada contaminação, explantes não levados a meio sem antibiótico para regeneração.

**Tabela 3.** Percentual de contaminação e regeneração de explantes com 10 mm de comprimento, oriundos de mudas de videira cv. Red Globe infectadas por *Xanthomonas campestris* pv *viticola*, submetidos ao tratamento com diferentes antibióticos.

<b>Tratamentos</b>	<b>Contaminação (%)</b>	<b>Regeneração (%)</b>
<b>Cefotaxima</b> (300 mg L <sup>-1</sup> )	<b>0 b<sup>1</sup></b>	<b>68,75 a<sup>1</sup></b>
<b>Tetraciclina</b> (300 mg L <sup>-1</sup> )	<b>0 b</b>	<b>0<sup>2</sup> b</b>
<b>Cloranfenicol</b> (300 mg L <sup>-1</sup> )	<b>0 b</b>	<b>0 b</b>
<b>Eritromicina</b> (150 mg L <sup>-1</sup> )	<b>100 a</b>	<b>-<sup>3</sup></b>
<b>Estreptomicina</b> (100 mg L <sup>-1</sup> )	<b>100 a</b>	<b>-</b>
<b>Ácido nalidíxico</b> (300 mg L <sup>-1</sup> )	<b>100 a</b>	<b>-</b>
<b>Testemunha</b> (S/antibiótico)	<b>100 a</b>	<b>-</b>
<b>CV</b>	<b>0,13</b>	<b>13,22</b>

<sup>1</sup>Dados seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. <sup>2</sup>Tratamento sem contaminação, explantes levados a meio sem antibiótico para regeneração, a qual não ocorreu. <sup>3</sup>Tratamento com 100% de contaminação, explantes não levados a meio sem antibiótico para regeneração.

## Referências

- ALBUQUERQUE, C.C.; CAMARA, T.R.; MENEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER I.; ULISSES, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, v.57, p.363-366, 2000.
- ALBUQUERQUE, T. C. **Uva para exportação: aspectos técnicos da produção**. EMBRAPA-SPI, 1996. 53 p. (Publicações Técnicas FRUPEX, n. 25).
- ARAÚJO, J.S.P.; BUENO JR., F.; CRUZ, G.B.; OLIVEIRA, B.C.; ROBBS, C.F.; RIBEIRO, R.L.D.; POLIDORO, J.C. Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p. 305-309, 2005.
- BAPTISTA, C.R.; KUNIYUKI, H.; MULLER, G.W.; BETTI, J.A. Obtenção de clones livres de vírus de sete variedades de videira através da cultura de meristema em São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.19, p.96-98, 1993.
- BARLASS, M. Elimination of stem pitting and corky bark diseases from grapevine by fragmented shoot apex culture. **Annals of Applied Biology**, v.110, p.653-656, 1987.
- BARRETT, C.; CASSELLS, A.C. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* (Brown) from *Pelargonium x domesticum* cv. 'Grand Slam' explants in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, p.169-175, 1994.
- BIASI, L.A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura *in vitro* de abacateiro. **Bragantia**, v.54, p.251-256, 1995.
- DAÍ, Q.; HE, F.T.; LIU, P.Y. Elimination of phytoplasma by stem culture from mulberry plants (*Morus alba*) with dwarf disease. **Plant Pathology**, v.46, p.56-61, 1997.
- DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. 2. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1985. 232p.

- 9 DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; TAKAKI, G.M.C.; MARIANO, R.L.R.; MACIEL,  
10 G.A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência Agrotécnica**, v.29,  
11 p.134-141, 2005.
- 12 DUHEM, F.; MERCIER, N.; BOXUS, P. Difficulties in the establishment of axenic *in vitro*  
13 cultures of field collected coffee and cacao germplasm. **Acta Horticulturae**, v.225, p.67-75,  
14 1988.
- 15 GALZY, R. Technique de thermothérapie des virus de las vigni. **Annales des Epiphyties**,  
16 v.15, p. 245-256, 1964.
- 17 GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS,  
18 L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília:  
19 EMBRAPA, 1998. 506p.
- 20 GRIBAUDO, I.; RUFFA, P.; CUOZZO, D.; GAMBINO, G.; MARZACHI, C. Attempts to  
21 eliminate phytoplasmas from grapevine clones by tissue culture techniques. **Bulletin of**  
22 **Insectology**, v.60, p.315-316, 2007.
- 23 GRUM. M.; CAMLOH. M.; RUDOLPH. K.; RAVNIKAR. M. Elimination of bean seed-borne  
24 bacteria by thermotherapy and meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.52, p.  
25 79-82, 1998.
- 26 KARTA, K.K.; GAMBORG, O.L. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture.  
27 **Phytopathology**, v.65, p.826-828, 1975.
- 28 LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S.M.; WAITES, B.; CHEYNE, V.A.; WAITES,  
29 W.M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus*  
30 *saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Chisya* and  
31 *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, v.71, p.307-330, 1991.
- 32 LIMA, M.F.; FERREIRA, M.A.S.V.; MOREIRA, W.A.; DIANESE, J.C. Bacterial canker in  
33 grapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.440-443, 1999.

- LIMA, M.F.; MOREIRA, W.A. Doenças causadas por bactérias. In: LIMA, M.F.; MOREIRA, W.A. (Ed.). **Uva de mesa: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p.27-34.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.
- NASCIMENTO, A.R.P.; MARIANO, R.L.R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, v.34, p.301-307, 2004.
- NASCIMENTO, A.R.P.; MARIANO, R.L.R.; GAMA, M.A.S. Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.650-654, 2005.
- OKKELS, F.T.; PEDERSEN, M.G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. **Acta Horticulturae**, v. 225, p.199-207, 1988.
- PEIXOTO, A.R.; MARIANO, R.L.R.; VIANA, I.O. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, v.36, p.1317-1320, 2006.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plant**. 1ª Ed. Boston. Martinus Nijhoff, 1987. 344p
- TAVARES, S.C.C. de H. **Principais doenças das culturas de: manga, uva, acerola e banana**. Petrolina: Embrapa. CPATSA, 1 v. (Apostila do curso de atualização técnica para engenheiros agrônomos do banco do Brasil, Petrolina, PE), 1995.
- TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. 506p.
- TOUSSAINT, V.; MORRIS, C.E.; CARISSE, O. A new semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. **Plant Disease**, v.85, p.131-136, 2001.

- TRINDADE, L.C.; MARQUES, E.; LOPES, D.B.; FERREIRA, M.A.S.V. Development of a molecular method for detection and identification *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.16-23, 2007.
- WANG, Z.K.; COMSTOCK, J.C.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W. Comparison of PCR, BIO-PCR, DIA, ELISA and isolation on semiselective medium for detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane. **Plant Pathology**, v.48, p.245-252, 1999.
- WYDRA, K.; KHATRI-CHHET, G.; MAVRIDIS, A.; SIKIROU, R.; RUDOLPH, K.A. diagnostic medium for the semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **European Journal of Plant Pathology**, v.10, p.991-1001, 2004.
- WONGKAEW, P.; FLETCHER, J. Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture: long-term maintenance, transmission, and oxytetracycline remission. **Plant Cell Reports**, v.23, p.426-434, 2004.

## Capítulo III

---

---

**SOBREVIVÊNCIA DE *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* EM  
TECIDO INFECTADO DE VIDEIRA NA SUPERFÍCIE DO SOLO  
E EM COMPOSTAGEM**

**Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira na superfície do solo e em compostagem**

Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in infected tissue of grapevine on soil surface and in composting

Adriano Márcio Freire Silva<sup>I</sup> Rosa de Lima Ramos Mariano<sup>I</sup> Elineide Barbosa da Silveira<sup>I</sup> Nataniel Franklin de Melo<sup>II</sup>

**RESUMO**

Este trabalho investigou a sobrevivência do agente causal do cancro-bacteriano da videira, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) em tecidos de videira infectados e o uso da compostagem para erradicação de Xcv em associação com restos culturais. Mudanças de videira 'Festival' foram inoculadas com mutante resistente a rifampicina Xcv2<sup>Rif</sup> e quando apresentavam alta severidade da doença, ramos fragmentados e folhas inteiras foram acondicionados em bolsas de malha plástica. Estas foram alocadas na superfície de microparcelas em área experimental (experimento 1) e no interior de pilhas de compostagem de restos de poda de videira (experimento 2). A sobrevivência de Xcv2<sup>Rif</sup> em tecidos infectados de videira foi monitorada em meio NYDAM + rifampicina (0,1g L<sup>-1</sup>) + azoxystrobim (0,16 g L<sup>-1</sup>), a intervalos de 8 e 10 dias a partir do início do experimento, respectivamente nos experimentos 1 e 2. No experimento 1, foi também avaliada a decomposição de tecidos e no experimento 2, as curvas de temperatura das pilhas, conteúdo de fenóis, e presença de microbiota fúngica e bacteriana antagonista a Xcv2<sup>Rif</sup>. O patógeno sobreviveu em altas densidades (10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> UFC g<sup>-1</sup>) por pelo menos 80 dias em tecidos infectados de videira na superfície do solo. O processo de compostagem eliminou Xcv2<sup>Rif</sup> de restos culturais em 10 dias, devido às

<sup>I</sup> Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. 52171-900. E-mail: rmariano@truenet.com.br.  
\*Autor para correspondência.

<sup>II</sup> Embrapa Semi-Árido, Petrolina, PE, Brasil.

altas temperaturas alcançadas pelas pilhas, liberação de compostos fenólicos durante o processo e antagonismo microbiano.

**Palavras-chave:** Cancro-bacteriano, restos de cultura, epidemiologia, erradicação.

## ABSTRACT

This work investigated the survival of the agent of bacterial canker of grapevine *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) in infected tissues and the use of composting to eradicate Xcv associated with crop residues. Plants of grapevine 'Festival' were inoculated with a mutant resistant to rifampicin Xcv2<sup>Rif</sup> and at the time they presented high disease severity, fragmented shoots and entire leaves were placed in mesh bags. These bags were placed on the surface of microplots in experimental area (experiment 1) and inside compost piles of grapevine pruning residues (experiment 2). The survival of Xcv2<sup>Rif</sup> in grapevine infected tissue was monitored by culturing in medium nutrient agar-dextrose-yeast extract-ampicilin (NYDAM) + rifampicin (0,1g L<sup>-1</sup>) + azoxystrobim (0,16 g L<sup>-1</sup>), at 8 and 10 days intervals from 1 and 2 experiment setting, respectively. In the experiment 1 tissue decomposition was also evaluated and in the experiment 2, pile temperature curves, phenolyc content, and fungi and bacteria antagonistic to Xcv2<sup>Rif</sup> were analyzed. The pathogen survived in high densities (10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> CFU g<sup>-1</sup>) for at least 80 days in grapevine-infected tissues on soil surface. The composting process eliminated Xcv2<sup>Rif</sup> from crop residues in 10 days due to high temperatures in piles, liberation of phenolyc compounds during the process and microbial antagonism.

**Key words:** Bacterial canker, crop residues, epidemiology, eradication.

## INTRODUÇÃO

No início de 1998, o cancro-bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye (Xcv) foi detectado pela primeira vez no Brasil, em parreirais do Vale do Submédio São Francisco, onde vem causando prejuízos em cultivares suscetíveis (MALAVOLTA Jr. et al., 1999; LOPES, 2006). Atualmente, além dos Estados de Pernambuco, Bahia e Piauí, a doença ocorre no Ceará e em Roraima (MALAVOLTA Jr. et al., 2008).

O entendimento das formas de sobrevivência da bactéria fitopatogênica em condições de campo é importante para o estabelecimento de medidas eficientes de controle. Em áreas de produção de uva do Vale do Submédio São Francisco, Xcv sobrevive de um ciclo para outro em videiras, bacelos e mudas infectados; epifiticamente em folhas e ramos de videiras assintomáticas (ARAÚJO, 2001); em restos culturais (NASCIMENTO et al., 2000) e em hospedeiros alternativos (PEIXOTO et al., 2007).

Segundo LEBEN (1981), uma das principais formas de sobrevivência de bactérias fitopatogênicas é a fase hipobiótica dentro de tecidos infectados, difíceis de serem decompostos. Desta forma, práticas que acelerem a decomposição de restos culturais podem ajudar no controle da doença. Dentre as medidas recomendadas para o controle do cancro-bacteriano da videira está a retirada e incineração de restos de podas das áreas de cultivo (LIMA & MOREIRA, 2002). Entretanto, tal medida representa a perda de uma importante fonte orgânica de nutrientes, já que uma das principais características dos solos da Região Semi-Árida do Brasil é o baixo conteúdo de matéria orgânica. A compostagem é um processo microbiano de biotransformação, em muitos casos capaz de eliminar microrganismos fitopatogênicos contidos em resíduos culturais. Isto se deve principalmente, às altas temperaturas alcançadas pelas pilhas, liberação de

compostos tóxicos durante e após a fase termofílica além de antagonismo microbiano em zonas de temperatura sub-letal (HOITINK & FAHY, 1986; ELORRIETA et al., 2003). Segundo SUÁREZ-ESTRELLA et al. (2007) o processo de compostagem pode ser uma alternativa viável para o manejo de restos culturais, principalmente quando garante a destruição de possíveis fitopatógenos contidos nestes resíduos.

Apesar da importância do cancro-bacteriano da videira em parreirais no Vale do Submédio São Francisco, poucas são as informações sobre as formas de sobrevivência de Xcv, principalmente no que diz respeito a associação com tecidos infectados de videira. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a sobrevivência de Xcv em tecidos infectados de videira, na superfície do solo e durante o processo de compostagem de restos de poda.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Obtenção do mutante de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* resistente ao antibiótico rifampicina**

Mutante espontâneo foi obtido a partir do isolado selvagem Xcv2, de *X. campestris* pv. *viticola*, pertencente a Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Semi-árido. A partir de cultura pura com 36-48 horas, preparou-se uma suspensão bacteriana em água destilada esterilizada (ADE) com concentração ajustada em fotolorímetro (Analyser) para  $A_{570}=0,4$ , que corresponde a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> de acordo com equação previamente estabelecida. Seguiu-se o plaqueamento de 0,1mL da suspensão em meio de cultura NYDA (dextrose 10, extrato de carne 3, extrato de levedura 5, peptona 5 e ágar 18 g L<sup>-1</sup>) acrescido de 50 ppm de rifampicina. As placas foram mantidas em incubadora tipo B.O.D. (Biochemistry

Oxygen Demand) a 28°C durante 48-72h e a partir de uma colônia resistente a 50ppm foi obtido, pelo mesmo método, um mutante resistente a 100ppm de rifampicina, denominado Xcv2<sup>Rif</sup>. Para testar a estabilidade do mutante foram feitas repicagens para meio NYDA com e sem o antibiótico, alternadamente por 10 vezes (ASSIS et al., 1996).

O isolado mutante Xcv2<sup>Rif</sup> foi comparado ao selvagem Xcv2 quanto ao crescimento em meio líquido e patogenicidade. A tubos de ensaio contendo 9mL de meio NYD (NYDA sem ágar) foi adicionado 1mL da suspensão bacteriana em ADE na concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Os tubos foram incubados em B.O.D a 28°C e o crescimento foi avaliado após 24, 72, 96 e 120 h pela variação na densidade ótica da cultura em meio líquido, com o auxílio de fotolorímetro ajustado para 570nm, com cinco repetições para cada intervalo (SILVA et al., 2006).

Para verificar a patogenicidade, os isolados de Xcv2 e do mutante Xcv2<sup>Rif</sup> foram inoculados em mudas de videira cv. Festival, depositando-se o crescimento bacteriano com 24-48 h em NYDA, diretamente sobre ferimento feito nos internódios do ramo principal. Após a inoculação, os ferimentos foram cobertos com algodão umedecido e envolvidos com papel alumínio. A avaliação foi realizada observando-se a incidência de cancos nos pontos de inoculação.

#### **Teste de eficácia de meios de cultura para estudos de sobrevivência do isolado Xcv2<sup>Rif</sup>**

Visando estabelecer qual a combinação de fungicidas e antibióticos a ser adicionada ao meio de cultura NYDA para melhorar a eficácia de detecção de Xcv2<sup>Rif</sup> foram testadas quatro diferentes combinações: (a) rifampicina 0,1g L<sup>-1</sup> + ampicilina 0,1g L<sup>-1</sup> + azoxystrobim 0,16 g L<sup>-1</sup>; (b) rifampicina 0,1g L<sup>-1</sup> + azoxystrobim 0,16g L<sup>-1</sup>;

(c) rifampicina  $0,1\text{g L}^{-1}$  + tiofanato metílico  $0,7\text{g L}^{-1}$ ; (d) rifampicina  $0,1\text{g L}^{-1}$  + ampicilina  $0,1\text{g L}^{-1}$  + tiofanato metílico  $0,7\text{g L}^{-1}$  e uma testemunha sem antibióticos. Os fungicidas azoxystrobim e tiofanato metílico foram selecionados para o teste com base no espectro de atividade anti-fúngica contra fungos habitantes de solo, contaminantes do meio NYDA utilizado para o isolamento de *Xcv2<sup>Rif</sup>* em ensaio preliminar (dados não apresentados). Aliquotas de  $100\mu\text{L}$  de uma suspensão bacteriana de *Xcv2<sup>Rif</sup>* em ADE com  $10^3\text{UFC mL}^{-1}$  foram plaqueadas em NYDA com as diferentes combinações de antibióticos e fungicidas. As placas foram incubadas a  $28^\circ\text{C}$  por 48-72h, quando foi feita a contagem de colônias. A eficácia do meio de cultura foi determinada pela fórmula  $E (\%) = (\text{UFC em meio NYDA com diferentes combinações de fungicidas e antibióticos} / \text{UFC em NYDA}) \times 100$  (WYDRA et al., 2004).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado constituído por cinco tratamentos, com cinco repetições compostas cada uma por uma placa de Petri.

### **Sobrevivência de *Xcv2<sup>Rif</sup>* em tecidos infectados de videira na superfície do solo em microparcels**

A temperatura, umidade relativa do ar e temperatura do solo foram monitoradas através de termohigrógrafo e termômetro de solo digital durante os 80 dias do período experimental.

Mudas de videira sadias da cv. Festival com cinco pares de folhas totalmente expandidas foram adquiridas em viveiro localizado em Petrolina – PE e mantidas em casa de vegetação, onde folhas e ramo principal foram inoculados. As folhas foram inoculadas por fricção do limbo foliar com gaze imersa previamente em suspensão bacteriana de *Xcv2<sup>Rif</sup>* em ADE contendo  $10^8\text{UFC mL}^{-1}$ . O ramo principal foi inoculado nos internódios com o crescimento bacteriano pelo método da picada (TAKATSU et al.,

1981). Estas plantas foram submetidas à câmara úmida por três dias e em seguida mantidas em casa de vegetação até que a doença atingisse alta severidade, em média 60 dias. Nesta época, as partes aéreas das mudas foram podadas e levadas para o laboratório onde o ramo principal foi fragmentado em pedaços de aproximadamente 2,5 a 3,5cm, enquanto as folhas foram destacadas e mantidas inteiras, com a finalidade de simular aproximadamente as condições encontradas após a poda e passagem de roçadeira em parreirais comerciais. Da mistura destes tecidos infectados (ramos e folhas) 5g foram pesados e acondicionados em bolsas de malha plástica (abertura de  $2 \times 2$ mm) medindo  $15 \times 10$ cm, as quais foram fechadas com grampeador. Em seguida cinco bolsas foram alocadas aleatoriamente na superfície de 10 microparcels totalizando 50 bolsas. Cada microparcela medindo 60cm de diâmetro por 50cm de altura era constituída por tonel de metal fncado ao solo e contendo solo natural, em área experimental na Embrapa Semi-Árido. As microparcels foram irrigadas por rega duas vezes por semana e após 30 dias foram sombreadas com tela tipo sombrite (50% de sombreamento), visando simular as condições microclimáticas encontradas nos parreirais da região. Para avaliar o percentual de decomposição e as densidades populacionais de *Xcv2<sup>Rif</sup>* nos tecidos infectados de videira, a cada oito dias, cinco bolsas plásticas foram retiradas aleatoriamente de cada uma de cinco microparcels, levadas ao laboratório, sendo seu conteúdo pesado e dele retirado 1g, que foi macerado com auxílio de almofariz e pistilo. Após a maceração, as amostras foram colocadas em tubos com tampa de rosca contendo 9mL de ADE, sendo agitadas manualmente. Em condições assépticas foram realizadas diluições até  $10^{-4}$ , plaqueando-se 100 $\mu$ l de cada suspensão em meio NYDA acrescido dos fungicidas e antibióticos selecionados. As placas foram incubadas a 28°C por 48-72 h, quando foi realizada a contagem do número de colônias por placa e calculado o número de UFC g<sup>-1</sup> de tecido infectado.

O percentual de decomposição dos tecidos infectados (DTI) foi determinado através da equação  $DTI = [(P_i - P_a) / (P_i)] \times 100$ , onde  $P_i$  e  $P_a$  são o peso inicial e o peso na avaliação, respectivamente.

### **Sobrevivência de *Xcv2*<sup>Rif</sup> em tecidos infectados de videira durante o processo de compostagem de restos de poda**

#### **Análise dos tecidos de videira a serem compostados e preparação das pilhas de compostagem**

Inicialmente, em área de 0,5ha, ramos de dez videiras cv. Festival, sem sintomas da doença, foram retirados aleatoriamente da região basal, mediana e apical, antes da poda de formação. Em seguida, os ramos foram triturados com o auxílio de uma forrageira e todo material foi misturado, visando formar uma amostra composta, para determinação da relação C/N pelo Laboratório de Plantas e Solo da Embrapa Semi-Árido.

Após obtenção da relação C/N, todos os restos de poda da cv. Festival em área de 0,5ha foram coletados e triturados com o auxílio de uma forrageira. Após a trituração, três pilhas de compostagem foram montadas, colocando-se de forma alternada uma camada de restos de poda e outra de esterco de caprino na proporção de 2,5:1 em uma armação removível de madeira e tela de arame com  $1 \times 2 \times 1$  m de dimensão. Entretanto as pilhas ficaram com dimensão de  $1 \times 2 \times 0,8$  m resultando em um volume total de  $1,6\text{m}^3$ . A quantidade de esterco adicionado às pilhas teve como base a relação C/N obtida na análise dos ramos de videira acima detalhada. Todas as pilhas eram molhadas constantemente por meio de microaspersão.

### **Sobrevivência de *Xcv2*<sup>Rif</sup> durante o processo de compostagem**

Mudas de videira cv. Festival com cinco pares de folhas totalmente expandidas, inoculadas e coletadas como já descrito, tiveram o ramo principal e folhas fragmentados. Da mistura destes tecidos infectados (ramos e folhas) 10g foram pesados, acondicionados em bolsas de malha plásticas (abertura de 1 × 1mm) medindo 20 × 30cm, as quais foram fechadas com máquina de costura especializada. Três bolsas foram depositadas em cada pilha no momento da montagem a uma distância de 50cm dos bordos e 0,40cm de profundidade, sendo uma localizada no centro e duas nas extremidades.

A temperatura nas pilhas de compostagem foi monitorada a cada dois dias durante todo processo, em cinco pontos aleatórios, utilizando-se um termômetro de mercúrio acoplado a uma haste de metal, a qual permitiu a introdução do aparelho no interior das pilhas. Os primeiros revolvimentos foram feitos aos 10 e 20 dias de compostagem, quando então foi realizada a avaliação da sobrevivência de *Xcv2*<sup>Rif</sup>. Para isto, uma bolsa plástica foi retirada aleatoriamente de cada pilha, levada ao laboratório e pesado 1g de tecido o qual foi macerado em almofariz com auxílio de pistilo e processado como já descrito no item sobrevivência na superfície do solo. Após a contagem de colônias foi calculado o número de UFC g<sup>-1</sup> de tecido infectado.

O processo de compostagem durou 80 dias até a estabilização, durante os quais foram realizados revolvimentos a cada 10 dias. Ao fim do processo, de diferentes pontos de cada pilha foram retiradas cinco sub-amostras de material compostado as quais misturadas em saco plástico formaram uma amostra com aproximadamente 500g. Esta amostra do composto foi utilizada para quantificação de compostos fenólicos totais, análise bacteriológica e de fungos.

### **Quantificação de compostos fenólicos totais**

Parte da amostra do composto foi utilizada para quantificação dos compostos fenólicos totais, realizada após fracionamento, conforme REICHER et al. (1981). Em cada fração, 4g do composto foram pesados e adicionados a aproximadamente 50mL de cada líquido extrator: metanol p.a., metanol:água (1:1, v/v) e água, respectivamente, para extração de fenóis dímeros, oligoméricos e poliméricos. Na extração dos fenóis poliméricos, as amostras foram colocadas em banho-maria a 60 °C, por 15 minutos. No caso dos dímeros e oligoméricos, o material foi submetido a refluxo em chapa elétrica por 15 minutos. Após a extração, as amostras foram agitadas em mesa agitadora (Nova técnica NT-145) e filtradas em papel de filtro. O filtrado foi evaporado também em chapa elétrica até o volume de aproximadamente 5mL e diluído em balão volumétrico de 50mL. Alíquotas de 15mL foram utilizadas para a quantificação dos compostos fenólicos totais. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 720nm. Os resultados foram expressos em  $\text{g } 100\text{g}^{-1}$  de matéria fresca, correspondendo à soma dos fenóis dímeros, oligoméricos e poliméricos.

### **Deteção, quantificação e identificação de isolados bacterianos antagonistas a *Xcv2*<sup>Rif</sup> presentes nas pilhas de compostagem**

Parte da amostra do composto foi utilizada para análise bacteriológica. Sendo 1g adicionado a 9mL de ADE em tubo de ensaio, submetido a agitação em vórtex (Phoenix AP 56) e filtrado em condições assépticas em papel de filtro esterilizado. Os filtrados foram submetidos a diluições em série até  $10^{-4}$  e 100 $\mu\text{L}$  de todas as diluições foram plaqueados em triplicata em meio NYDA contendo  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de *Xcv2*<sup>Rif</sup>. As placas de Petri foram incubadas a 28°C e após 48 horas foi realizada a avaliação das placas da diluição  $10^{-4}$  que possibilitou a observação de colônias isoladas, quantificação e

verificação de halos de inibição. As bactérias que inibiram o crescimento do patógeno foram isoladas, purificadas, preservadas e enviadas à Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP para identificação.

### **Deteccão de fungos antagonistas a *Xcv2*<sup>Rif</sup> presentes nas pilhas de compostagem**

Parte da amostra do composto foi levada ao laboratório para isolamento dos fungos pelo método de diluição em placas. Vinte e cinco gramas de composto seco foram adicionados a 250mL de ADE, agitados mecanicamente durante 30 minutos, transferindo-se 10mL desta suspensão para 90mL de água, seguindo-se diluição seriada até  $10^{-4}$ . De cada diluição, 500 $\mu$ L foram plaqueados em meio de Martin (TUIITE, 1969). As placas foram incubadas a 28°C durante 5 dias, quando as colônias fúngicas obtidas foram repicadas para meio BDA (batata 200, dextrose 20 e ágar 17 g L<sup>-1</sup>) obtendo-se as culturas puras dos fungos. Estes foram cultivadas em 100mL de meio líquido BD por 10 dias, quando o crescimento foi filtrado em gaze esterilizada, centrifugado duas vezes a 10.000rpm por 15 minutos, filtrado em filtro Millipore® de 0,22 $\mu$ m e secado em liofilizador. O crescimento liofilizado foi ressuscitado em 100 $\mu$ L de água e 40 $\mu$ L da suspensão foram impregnados em discos de papel de filtro para realização de antibiograma contra *Xcv2*<sup>Rif</sup> (KIRBY et al., 1966). Os fungos que produziram metabólitos contra *Xcv* foram preservados e enviados ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco para identificação.

### **Análises Estatísticas**

As análises de variância, o teste de Tukey para separação de médias, as análises de regressão e correlação foram realizados com o auxílio do programa SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Viçosa, UFV, 1997).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Obtenção do mutante de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* resistente ao antibiótico rifampicina

Obteve-se um mutante espontâneo Xcv2<sup>Rif</sup> de *X. campestris* pv. *viticola* resistente a 100ppm do antibiótico rifampicina, estável quanto a resistência, apresentando patogenicidade a plantas de videira cv. Festival e crescimento em meio NYD (Figura 1) semelhantes ao isolado selvagem Xcv2. MARCANO & TRUJILLO (1984) comprovaram a importância da utilização de isolados mutantes em estudos de sobrevivência, pois devido a problemas de contaminação não foi possível recuperar isolados selvagens de *X. campestris* pv. *manihotis*. Apesar de SCHROTH (1992) ter destacado que a marcação por resistência a antibióticos para o estudo da dinâmica das populações bacterianas pode afetar a biologia dos organismos, tal efeito não foi verificado no presente trabalho. Da mesma forma MARIANO & MCCARTER (1991 e 1993) não observaram efeito na biologia dos mutantes Rif-Nal (rifampicina-ácido nalidixico) de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *syringae* e *P. viridiflava*; como também SILVA et al. (2006) com o mutante *AacI*<sup>Rif</sup> de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.

### Teste de eficácia de meios de cultura para estudos de sobrevivência do isolado Xcv2<sup>Rif</sup>

Os tratamentos nos quais o meio NYDA foi acrescido de rifampicina (0,1g L<sup>-1</sup>) + azoxystrobin (0,16g L<sup>-1</sup>) e rifampicina (0,1g L<sup>-1</sup>) + ampicilina (0,1g L<sup>-1</sup>) + azoxystrobin (0,16g L<sup>-1</sup>) (Tabela 1), apresentaram maiores eficácias, respectivamente 68,75 e 53,15%, diferindo dos demais (P≤0,05). O meio NYDA acrescido de ampicilina

+ rifampicina + azoxystrobim foi escolhido para resgatar  $Xcv2^{Rif}$  de tecidos infectados de videira na superfície do solo e durante o processo de compostagem. Este meio, além de apresentar boa eficácia, tem composição igual ao meio NYDAM (NYDA + ampicilina), comprovadamente semi-seletivo para *X. campestris* pv. *viticola* (PEIXOTO et al., 2006); contém a rifampicina para resgate do isolado mutante  $Xcv2^{Rif}$  e o fungicida azoxystrobim, que não inibe o patógeno e evita contaminações fúngicas. O meio foi denominado NYDAM + rifampicina + azoxystrobim. Com relação à eficácia de meios de cultura, WYDRA et al. (2004) encontraram valores de 45,6 e 188,6% para *X. campestris* pv. *vignicola* em meio cefazolina-celobiose-metionina, enquanto TOUSSAINT et al. (2001) relataram índices de 5,7 a 30,7% para *X. campestris* pv. *vitians* em meio maltose-verde metil. Nos dois tratamentos em que o tiofanato metílico foi adicionado, a eficácia foi muito baixa demonstrando o efeito inibitório deste fungicida sobre  $Xcv2^{Rif}$  (Tabela 1). Tal fato indica a necessidade de avaliação do efeito de fungicidas em meio de cultura elaborados para a detecção de bactérias fitopatogênicas, pois a adição de um fungicida que tenha efeito inibitório sobre a bactéria a ser detectada pode levar a obtenção de dados incorretos.

### **Sobrevivência de $Xcv2^{Rif}$ em tecidos infectados de videira na superfície do solo em microparcels**

Nos primeiros 30 dias de experimentação, a temperatura média do ar e do solo e a umidade relativa do ar foram de, respectivamente,  $27,4 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $38,3 \pm 4,4^\circ\text{C}$  e  $49 \pm 3,4\%$ . Após o sombreamento da área experimental, foi verificada uma redução considerável na temperatura do ar ( $23,2 \pm 0,95^\circ\text{C}$ ) e do solo ( $28,4 \pm 1,27^\circ\text{C}$ ), como também um aumento na umidade relativa do ar ( $61 \pm 7,3\%$ ), condições microclimáticas mais amenas e semelhantes as que ocorrem em parreirais comerciais. Durante os 80 dias do

experimento, *Xcv2<sup>Rif</sup>* foi detectada em tecidos infectados de videira, com populações variando entre  $10^4$  a aproximadamente  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  de tecido infectado (Figura 2). Infere-se que o patógeno é capaz de sobreviver em altas populações em restos de poda de videira infectados durante pelo menos 80 dias do ciclo da cultura, constituindo fonte de inóculo primário para plantas saudáveis. Em condições de laboratório, NASCIMENTO et al. (2005), observaram que *X. campestris* pv. *viticola* sobreviveu até 150 dias em folhas de videira herborizadas mantidas a temperatura ambiente de laboratório ( $25 \pm 2^\circ C$ ). CHANG et al. (1992) verificaram que *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* sobreviveu por 210 dias com população de  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  de tecido infectado, em restos de cultura de tomate infectados na superfície do solo. Entretanto, FATMI & SCHAAD (2002) observaram que o mesmo patógeno sobreviveu em restos de caule na superfície do solo por 314 dias, em populações variando entre  $10^9$ - $10^6$  UFC  $g^{-1}$  de tecido infectado. Já BARAK et al. (2001) verificaram que *X. campestris* pv. *vitians* sobreviveu em restos culturais de alface colocados sobre o solo por até 120 dias com população de  $10^2$  UFC  $g^{-1}$  de tecido infectado.

Nos primeiros 32 dias foi observada redução mais acentuada na população de *Xcv2<sup>Rif</sup>* (Figura 2), que pode estar associada às condições ambientais, pois durante este período a temperatura máxima do ar e do solo foi em média  $34,2^\circ C \pm 1,5$  e  $46,5^\circ C \pm 6,5$ . MCCARTER et al. (1983) trabalhando com *P. syringae* pv. *tomato* e JONES et al. (1986) trabalhando com *X. campestris* pv. *vesicatoria*, concluíram que altas temperaturas do ar e do solo desfavorecem a sobrevivência bacteriana em restos de cultura. No presente estudo, dos 32 aos 64 dias observou-se uma quase estabilização dos níveis populacionais do patógeno, provável resultado do sombreamento da área experimental, pois ocorreu redução da temperatura do ar ( $23,2 \pm 0,95^\circ C$ ) e do solo ( $28,4 \pm 1,27^\circ C$ ) e aumento na umidade relativa ( $61 \pm 7,3\%$ ). O aumento da umidade

relativa não influenciou a decomposição dos tecidos, pois foi observado durante todo experimento que a superfície do solo secava rapidamente, mesmo após o sombreamento. Outro declínio na população do patógeno foi verificado entre 64 e 80 dias, coincidindo com o início da ocorrência de precipitação pluviométrica (48mm em 7 dias). ARNAUD-SANTANA et al. (1991) verificaram que o declínio da população de *X. campestris* pv. *phaseoli* em restos culturais de feijoeiro depositados na superfície do solo, coincidiu com o período de alta precipitação, embora este fato não tenha afetado a decomposição dos resíduos. Restos culturais depositados na superfície do solo estão menos expostos a microrganismos antagonistas do que os incorporados ao solo (GILBERTSON et al., 1990). Um dos efeitos da chuva é a deposição de solo sobre os restos culturais, o que pode aumentar a exposição dos resíduos a antagonistas e proporcionar um declínio na população do patógeno. GILBERTSON et al. (1990) atribuiu a eliminação de *X. campestris* pv. *phaseoli* de restos de feijoeiro no solo, à sensibilidade desta bactéria a microrganismos antagonistas presentes no solo. Segundo Zhao et al. (2002) *X. campestris* pv. *armoraceae* e *P. syringae* pv. *maculicola* resistentes a rifampicina sobreviveram em restos de cultura de nabo e couve na superfície do solo durante 4 meses, não sendo mais detectados após 5 meses, quando os restos culturais estavam totalmente decompostos. GRAHAM et al. (1987) verificaram que *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* sobreviveu até 120 dias em folhas lesionadas de laranjeira, acondicionadas na superfície do solo, em condições de campo. Após 85 dias as folhas estavam intactas e a população bacteriana foi de  $10^2$  UFC lesão foliar<sup>-1</sup>.

Uma rápida perda de peso dos tecidos infectados de videira em função da desidratação foi verificada nos primeiros oito dias (Figura 2), seguindo-se uma lenta decomposição até a última avaliação. Isto pode explicar a sobrevivência do patógeno durante os 80 dias de avaliação, o que foi comprovado pela correlação negativa (-0,85),

obtida no teste de Pearson ( $P \leq 0,05$ ), entre número de UFC  $g^{-1}$  de tecido infectado e percentual de decomposição.

As equações:  $UFC = 6,7 - 0,11\text{tempo} + 0,0024\text{tempo}^2 - 0,000018\text{tempo}^3$  ( $R^2=0,980$ ) e  $DTI = 0,75 + 36,9\text{tempo}^{1/2} - 6,31\text{tempo} + 0,34\text{tempo}^{11/2}$  ( $R^2=0,986$ ) foram as que melhor se ajustaram para descrever a variação na sobrevivência de  $Xcv2^{Rif}$  e decomposição em tecidos infectados de videira, respectivamente (Figura 2).

### **Sobrevivência de $Xcv2^{Rif}$ em tecidos infectados de videira durante o processo de compostagem**

As curvas de temperatura média das pilhas de compostagem mostraram que a fase termofílica teve duração de 23 dias, sendo que em 17 destes foram observadas temperaturas superiores a  $60^\circ\text{C}$  (Figura 3). As altas temperaturas e a longa fase termofílica encontradas podem ser fatores pelos quais  $Xcv2^{Rif}$  já aos 10 dias não foi detectada no material infectado. Segundo YUEN & RAABE (1984), a compostagem aeróbica em pequena escala de restos de jardim e plantas condimentares infectadas por *Armillaria mellea*, *Rhizoctonia solani* e *Verticilium dahliae* foi capaz de eliminar estes patógenos em 21 dias. No mesmo trabalho foi verificado que esclerócios de *Sclerotium rolfsii* quando compostados exclusivamente nas bordas das pilhas também perderam a viabilidade em 21 dias. As temperaturas no centro dessas pilhas de  $0,7\text{m}^3$  alcançaram  $70^\circ\text{C}$  e se mantiveram por 10-14 dias acima de  $45^\circ\text{C}$ . HOITINK et al. (1976) observaram a eliminação de *Phytophthora cinnamoni* e *Pythium irregulare* infectando coroa e raízes de rododendro, *R. solani* causando infecção em beterraba açucareira e *Dickeya chrysanthemi* infectando fragmentos de crisântemo, quando estes materiais vegetais foram compostados com tecido corticoso de árvores lenhosas. SUÁREZ-ESTRELLA et al. (2007) observaram que *Pectobacterium carotovorum* subsp.

*carotovorum*, *P. syringae* subsp. *syringae*, *R. solanni* e *P. ultimum* foram eliminados em 9 diferentes zonas de pilha de compostagem entre 48 e 120 h, independentemente da localização. Além disto, em duas zonas que não diferiram com relação às altas temperaturas (43,7 e 45,4°C) houve diferença nos valores de persistência dos patógenos. Tal fato confirma que a eliminação de fitopatógenos de resíduos culturais por meio da compostagem não está associada somente as altas temperaturas alcançadas durante o processo. ELORRIETA et al., (2003) observaram que as bactérias fitopatogênicas *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *P. syringae* pv. *syringae* foram eliminadas em menos de três dias de compostagem de uma mistura de restos de cultura de pimentão, feijão e melão, e que as mesmas apresentaram baixa resistência a altas temperaturas. No presente trabalho não se pode dizer por quanto tempo *Xcv2<sup>Rif</sup>* sobreviveu, pois a primeira amostragem foi somente aos 10 dias.

Compostos fenólicos totais foram encontrados nas pilhas de compostagem em uma concentração média de 0,013%. Estes compostos, mesmo em baixas concentrações são capazes de erradicar microrganismos. ELORRIETA et al. (2003) verificaram que 0,01% de vários compostos fenólicos purificados foram suficientes para inibir o crescimento de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. syringae* pv. *syringae*.

Cinco isolados bacterianos capazes de inibir *Xcv2<sup>Rif</sup>* foram detectados em altas populações, 1,0 a 10,0 x 10<sup>4</sup>UFC g<sup>-1</sup> de composto. Quatro destes foram identificados utilizando o método de ésteres metil dos ácidos graxos - FAME como: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Paenibacillus lentimorbus*, *P. macerans* e *Bacillus megaterium* (Tabela 2). Os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* são considerados bons agentes de controle biológico de fitopatógenos. Dentre as espécies destes gêneros, *B. megaterium*, *P. lentimorbus* e *P. macerans* se destacam por produzirem substâncias capazes de inibir

microrganismos causadores de doenças de plantas (LUZ, 1996; GARDENER, 2004), como verificado por Chen et al. (2002) para *P. lentimorbus* isolado CBCA-2 que produziu um potente fungicida microbiano contra *Botryosphaeria dothidea* em pistache, sendo capaz de inibir 100% da germinação de picnidiosporos após 24 horas. *Bacillus megaterium* isolado 1-13 produziu o antibiótico micrococinina, com atividade em membranas celulares de bactérias Gram positivas e negativas (KLEINKAUF & VAN DOHEREM, 1985). *Paenibacillus macerans* foi capaz de proteger sementes de trigo contra *Bipolaris sorokiniana* e *Drechslera tritici-repentis*, além de proteger plantas contra a podridão comum das raízes (LUZ, 1996).

De 13 isolados fúngicos obtidos do composto, três produziram metabólitos tóxicos a  $Xcv2^{Rif}$ , sendo as culturas identificadas pelo Departamento de Micologia da UFPE como: *Aspergillus fumigatus*, *Emericela nidulans* e *E. nidulans* var. *acristata*. Em trabalho recente, SIBOUNNAVONG et al. (2008) verificaram que o composto bioativo SKP02 de *Emericela nidulans* adicionado ao meio de cultura BDA nas concentrações de 100 a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  inibiu o crescimento micelial e a esporulação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, após cinco dias de incubação. O grupo *Aspergillus* compõe-se das principais espécies de microrganismos produtores de enzimas de interesse alimentício e produtoras de micotoxinas, entretanto existem poucas informações sobre o potencial deste gênero como agente de controle de doenças de plantas. SOUZA et al. (2004) verificaram que isolados de *A. niger*, endofíticos de plantas tóxicas da Amazônia, produziam metabólitos tóxicos capazes de inibir *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Os resultados obtidos permitem afirmar que restos de poda infectados de videira, são fonte primária de inóculo de *Xcv* em parreirais situados no Submédio São Francisco, devendo ser manejados de forma correta. O processo de compostagem foi

capaz de eliminar Xcv de tecidos de videira infectados, constituindo uma maneira viável e segura de manejar estes resíduos em parreirais, sem perigo de sobrevivência do patógeno e sem que haja a perda de uma importante fonte de matéria orgânica para a cultura.

## CONCLUSÕES

*Xanthomonas campestris* pv. *viticola* foi capaz de sobreviver em altas populações,  $10^4$  a  $10^6$  UFC  $g^{-1}$ , por pelo menos 80 dias em tecidos infectados de videira na superfície do solo. O processo de compostagem foi capaz de eliminar Xcv de tecidos infectados de videira em 10 dias.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Itamar S. de Melo, da Embrapa Meio Ambiente, pela identificação dos isolados bacterianos; a Dra. Cristina Motta, da Universidade Federal de Pernambuco, pela identificação dos isolados fúngicos; ao CNPq pela concessão das bolsas de Doutorado e Produtividade em Pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J.S.P. Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) no Brasil. 2001. 121p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

ARNAUD-SANTANA, E. et al. Longevity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infested dry bean (*Phaseolus vulgaris*) debris. **Plant Disease**, v.75, n.9, p.952-953, 1991.

ASSIS, S.M.P. et al. Survival and redistribution of *Bacillus* spp., potencial biocontrol agent of black rot, on kale phylloplane. In: WEHUA, T. et al. (Eds). **Advances in Biological control of Plant Disease**. Beijing: China Agricultural University Press. 1996. p.374-379.

BARAK, J.D. et al. The role of crop debris and weeds in the epidemiology of bacterial leaf spot of lettuce in California. **Plant Disease**, v.85, n.2, p.169-178 2001.

CHAND, R.; KISHUN, R. Inoculation techniques for *Xanthomonas campestris* pv *viticola* (NAYUDU) DYE. **International Journal Tropical Plant Diseases**, v.9, n.38, p.115-122, 1991

CHANG, R.J. et al. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. **Phytopathology**, v.82, n.5. p.553-560, 1992.

CHEN, W.Q. et al. Antagonism of *Paenibacillus lentimorbus* to *Botryosphaeria dothidea* and biological control of panicle and shool blight of pistachio. **Plant Disease**, v.87, n.4, p.359-365, 2003.

ELORRIETA, M.A. et al. Survival of phytopathogenic bacteria during waste composting. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.96, n.1, p.141-146, 2003.

FATMI, M.; SCHAAD, W.N. Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. **Plant Pathology**, v.51, n.2, p.149-154, 2002.

GARDENER, M.B.B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, v.94, n.11, p.1252-1258, 2004.

GILBERTSON, R.L. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic strains of *X. campestris* in bean debris. **Plant Disease**, v.74, n.4, p.322-327, 1990.

GRAHAM, J.H. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in citrus plant debris and soil in Florida and Argentina. **Plant Disease**, v.71, n.12, p.1094-1098, 1987.

HOITINK, H.A.J.; FAHY, P.C. Basis for the control of soil-borne plant pathogens with composts. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, n.1, p.93-114, 1986.

HOITINK, H.A.J. et al. Survival of some plant pathogens during composting of hardwood tree bark. **Phytopathology**, v.66, n.12 p.1369-1372, 1976.

JONES, J.B. et al. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. **Phytopathology**, v.76, n.4, p.430-434, 1986.

KIRBY, W.M.M. et al. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

KLEINKAUF, H; Van DOHEREM, H. Peptide antibiotics. In: MURRAY, M.Y. **Comprehensive biotechnology: principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 95-136.

LEBEN, C. How plant pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, v.65, n.8, p.633-637, 1981.

LIMA, M.F.; MOREIRA, W.A. Doenças causadas por bactérias. In: LIMA, M.F.; MOREIRA, W.A. (Ed.). **Uva de mesa: Fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p.27-34.

LOPES, D.B. Cancro-bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*). **Fitopatologia Brasileira**, v.31, suplemento, p.S83-S85, 2006.

LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, n.1, p.1-49, 1996.

MALAVOLTA Jr, V.A. et al. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. **Summa Phytopathologica**, v.34, suplemento, p.9-88, 2008.

MALAVOLTA Jr, V.A. et al. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.3, p.262-264, 1999.

MARCANO, M.; TRUJILLO, G. Perpetuación de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (Berthet y Bonder) Dye. en el suelo através de restos de cosecha. **Agronomia Tropical**, v.34, n.1, p.7-19, 1984.

MARIANO, R.L.R, McCARTER, S.M. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato and weeds. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, n.1, p.86-91, 1991.

MARIANO, R.L.R; McCARTER S.M. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weeds species. **Microbial Ecology**, v.26, n.1, p.47-58, 1993.

McCARTER, S.M. et al. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue, and epiphytic weed hosts in Georgia. **Phytopathology**, v.73, n.10, p.1393-1398, 1983.

NASCIMENTO, A.R.P. et al. **Cancro bacteriano: nova doença da videira no submédio São Francisco**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. 22 p. (Embrapa Semi-Árido. Circular Técnica, 58).

NASCIMENTO, A.R.P. et al. Métodos de preservação e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.6, p.650-654, 2005.

PEIXOTO, A.R. et al. Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.2, p.161-164, 2007.

PEIXOTO, A.R. et al. Meio semi-seletivo para isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Ciência Rural**, v.36 n. 4, p.1317-1320, 2006

REICHER, F. et al. Determinação espectrofotométrica de taninos pelo reativo, fosfotúngstico-fosfomolibdico. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.24, n.4, p.401-411, 1981.

SCHROTH, M.N. Risks of releasing wild-type and genetically engineered biocontrol organisms into the ecosystem. In: TJAMOS, E.S.; PAPAVIDAS, G.C.; COOK, R.J. (Eds.). **Biological control of plant diseases**. New York: Plenum Press, 1992. p. 371-379.

SIBOUNNAVONG, D.C. et al. The new antagonistic fungus, *Emericella nidulans* strain EN against Fusarium Wilt of Tomato. **Journal of Agricultural Technology**, v.4, n.1, p.89-99, 2008.

SILVA, V.A.V. et al. Sobrevivência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.4, p.381-386, 2006.

SOUZA, A.Q.L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazonica**, v.34, n.2, p.185-195, 2004.

SUÁREZ-ESTRELLA, F. et al. Effect of horticultural waste composting on infected plant residues with pathogenic bacteria and fungi: Integrated and localized sanitation. **Waste Management**, v.27, n.7, p.886-892, 2007.

TAKATSU, A. et al. Fruto de pimentão como meio parcialmente seletivo para isolamento de *Erwinia carotovora*. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, n.1, p.550-551, 1981.

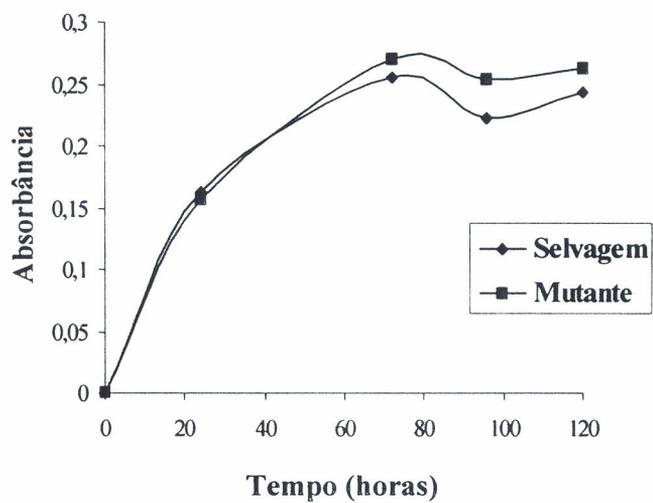
TOUSSAINT, V. et al. A new semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. **Plant Disease**, v.85, p.131-136, 2001.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969. 239p.

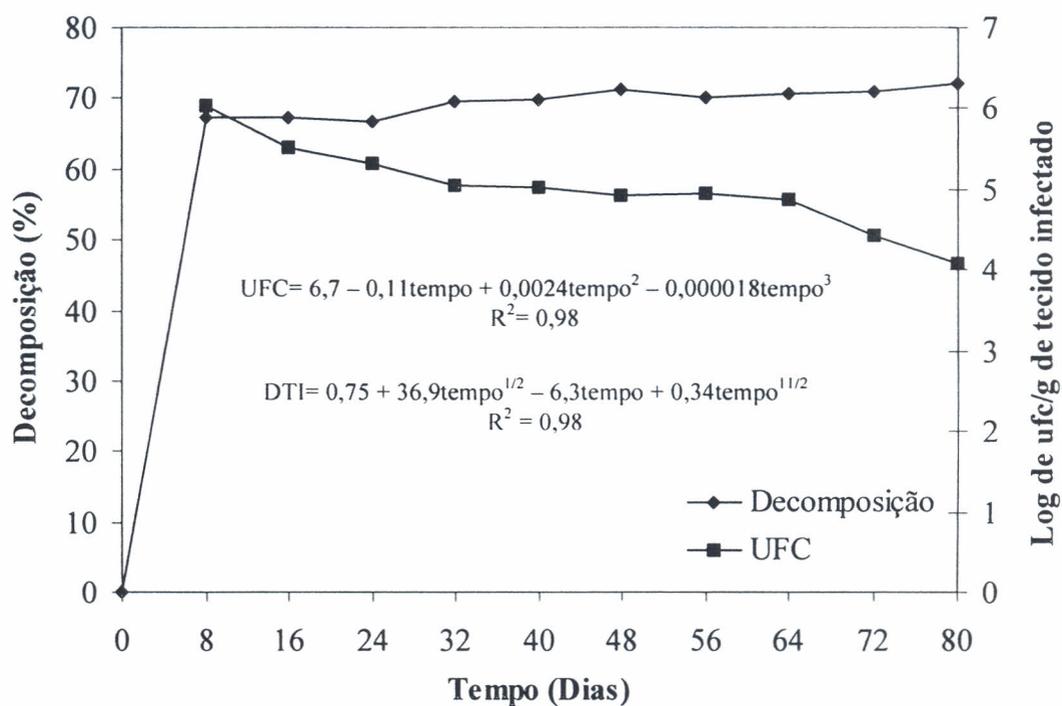
WYDRA, K. et al. A diagnostic medium for the semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. **European Journal of Plant Pathology**, v.110, n.10, p.991-1001, 2004.

YUEN, G.Y.; RAABE, R.D. Effects of small-scale aerobic composting on survival of some fungal plant pathogens. **Plant Disease**, v.68, n.2, p.134-136, 1984.

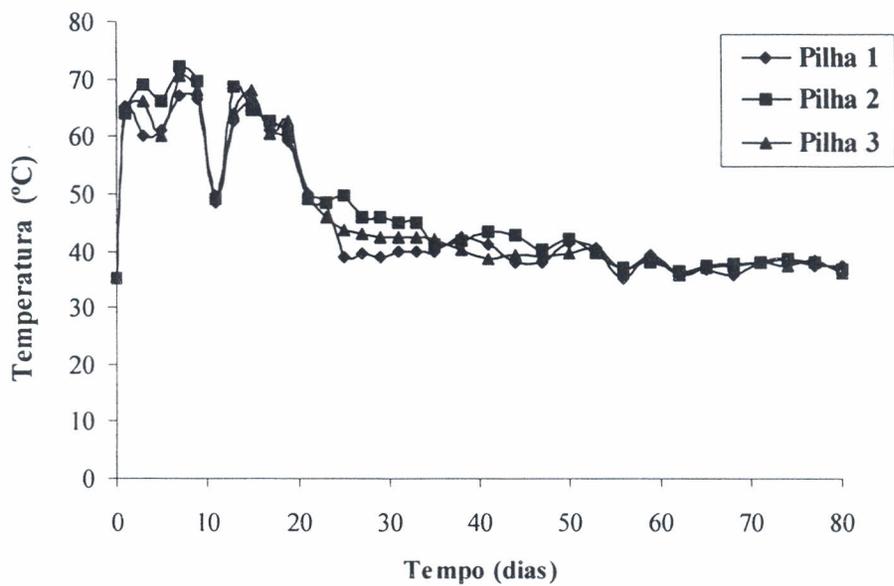
ZHAO, Y. et al. Detection, survival, and sources of inoculum for bacterial diseases of leafy crucifers in Oklahoma. **Plant Disease**, v.86, n.8, p.883-888, 2002.



**Figura 1.** Crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, isolados selvagem Xcv2 e mutante Xcv2<sup>Rif</sup> em meio de cultura Caldo nutritivo-dextrose-extrato de levedura (NYD).



**Figura 2:** Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, mutante Xcv2<sup>Rif</sup> e percentual de decomposição de tecidos infectados de videira depositados na superfície do solo em microparcelas, Petrolina, PE, outubro, 2007



**Figura 3:** Curva de temperatura média (°C) das pilhas de compostagem de restos de poda de videira, Petrolina, PE, novembro, 2007.

**Tabela 1.** Eficácia do meio de cultura Ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura (NYDA) acrescido de antibióticos e fungicidas para estudos de sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, mutante Xcv2<sup>Rif</sup>

Meio de cultura + antibióticos + fungicidas	Eficácia (%)
NYDA + rifampicina + azoxystrobim <sup>1</sup>	68,75 <sup>2</sup> a
NYDA + rifampicina + ampicilina + azoxystrobim	53,15 a
NYDA + rifampicina + tiofanato metílico	8,80 b
NYDA + rifampicina + ampicilina + tiofanato metílico	6,84 b
C.V.	12,38

<sup>1</sup>Médias de cinco repetições; rifampicina (0,1g L<sup>-1</sup>); azoxystrobim (0,16g L<sup>-1</sup>); ampicilina (0,1g L<sup>-1</sup>); tiofanato metílico (0,7g L<sup>-1</sup>); <sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Dados originais transformados em  $\sqrt{x + 1}$ , para efeito de análise.

**Tabela 2.** População de espécies de bactérias antagonistas a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* mutante Xcv2<sup>Rif</sup> do composto resultante da compostagem de restos de poda de videiras, aos 80 dias, Petrolina, PE, janeiro, 2007.

Isolado	Espécie	População (x 10 <sup>4</sup> UFC g <sup>-1</sup> )
1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	7,5
2	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	1,0
3	<i>P. macerans</i>	2,0
4	Não identificada	10,0
5	<i>Bacillus megaterium</i>	1,0

## **Conclusões Gerais**

---

---

### Conclusões Gerais

1. O cultivo de explantes com 3 mm possibilitou a obtenção de plantas livres de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv) e com maior regeneração do que explantes com 1 mm de comprimento;
2. A termoterapia de mudas infectadas associada ao cultivo *in vitro* não foi eficiente na eliminação de Xcv;
3. O cultivo de explantes com 10 mm durante 40 dias em MGM+cefotaxima (300 mg L<sup>-1</sup>) proporcionou limpeza clonal das mudas;
4. A indexação de plantas de videira regeneradas *in vitro* quanto à infecção por Xcv utilizando NYDAM é uma alternativa econômica e eficiente para produção de plantas selecionadas;
5. O meio de cultura NYDAM + rifampicina + azoxystrobim foi eficiente para resgatar Xcv de tecidos infectados de videira, na superfície do solo;
6. Xcv foi capaz de sobreviver em altas populações em tecidos infectados de videira na superfície do solo, durante pelo menos 80 dias, constituindo fonte de inóculo primário para plantas saudáveis, em parreirais situados no Vale do Submédio São Francisco;
7. A decomposição dos tecidos infectados de videira na superfície do solo reduziu a sobrevivência de Xcv;
8. O processo de compostagem foi capaz de eliminar Xcv de tecidos infectados de videira em 10 dias;
9. A compostagem de restos de poda constitui uma maneira viável e segura de manejar estes resíduos em parreirais, sem perigo de sobrevivência do patógeno.