

JANAÍNA CORTÊZ DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE

Acidovorax avenae subsp. *citrulli*

RECIFE - PE

FEVEREIRO, 2006

JANAÍNA CORTÊZ DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE

Acidovorax avenae subsp. *citrulli*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade, Área de concentração: Fitopatologia.

RECIFE - PE

FEVEREIRO, 2006

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE

Acidovorax avenae subsp. *citrulli*

JANAÍNA CORTÊZ DE OLIVEIRA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Prof^a. Dra. Elineide Barbosa da Silveira - Orientadora

Prof^a. Ph.D. Rosa de Lima Ramos Mariano – Co-orientadora

RECIFE - PE

FEVEREIRO, 2006

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE

Acidovorax avenae subsp. citrulli

JANAÍNA CORTÊZ DE OLIVEIRA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 03/02/2006

ORIENTADORA:

Prof^a. Dra. Elineide Barbosa da Silveira (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dra. Elvira Maria Régis Pedrosa (UFRPE/PE)

Dr. Rildo Sartori Barbosa Coêlho (IPA/PE)

Dr. Rui Sales Júnior (UFERSA/RN)

RECIFE – PE

FEVEREIRO, 2006

Aos meus pais, Manoel Lino (*In memoriam*) e Neuza Cortêz,
que em meio a tantas dificuldades tiveram amor, coragem,
persistência e sabedoria, permitindo sempre que eu seguisse em
frente.

DEDICO

A Manoel, meu noivo, pelo amor, dedicação,
companheirismo e incentivo.

Aos meus irmãos pelo exemplo de vida, apoio, e
confiança.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença viva em mim, conduzindo todos os meus passos e permitindo que meus sonhos sejam realizados.

À professora Elineide Silveira, pela excelente orientação, amizade, compreensão e paciência.

À professora Rosa Mariano, pelos ensinamentos e relevantes contribuições neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

Aos professores do Curso de Mestrado pelos conhecimentos transmitidos.

À Coordenação, Professores e Funcionários da Pós-Graduação em Fitossanidade pela amizade e préstimos.

Aos colegas do Laboratório de Fitobacteriologia, Adriano, Enildo, Juliana, Alessandro Jeane, Indira, Marco, Moacir, Marcelo, Mirzânia e Leandro pela amizade e colaboração.

À querida Ivanise, pela amizade e valiosas colaborações .

À Neilza Castro, pela amizade e carinho durante esse tempo.

Aos colegas do Mestrado, Daniela, Robson, Rosemberg e Jorge pela boa convivência.

Às amigas, Valéria Sandra, Zilderlânia e Beatriz pelo bom convívio e companheirismo.

Aos amigos conquistados durante o curso, Sandra, Lílian, Ana Rosa, Ilka, Érick, Rinaldo, Angélica, Albaneide, Genira, Marissônia, Andréa Chaves e Andréa Baltar, pelos bons momentos de convivência e apoio.

À Liliana e Diédja pelas colaborações neste trabalho;

À todos aqueles que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
Capítulo I - Introdução geral.....	13
Referências Bibliográficas	25
Capítulo II - Produção de enzimas, fitohormônio, polissacarídeo e toxina por isolados de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	36
Resumo	36
Abstract	37
Agradecimentos	42
Referências Bibliográficas	43
Capítulo III - Caracterização de isolados de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	47
Resumo	47
Abstract	48
Introdução	49
Material e Métodos.....	51
Resultados e Discussão	55
Agradecimentos	60
Referências Bibliográficas	60
Conclusões Gerais.....	69

RESUMO

A mancha-aquosa causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* é a principal doença bacteriana do meloeiro (*Cucumis melo*) no Nordeste do Brasil. Neste trabalho, foram estudados 41 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* com os objetivos de: investigar a produção de enzimas (pectinolíticas, amilolíticas, celulolíticas, lipolíticas e proteolíticas), fitohormônio (ácido indol acético), polissacarídeo (levana) e toxina (siringomicina) por isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* e; caracterizar essa população com base na severidade da doença em plântulas, plantas e frutos de meloeiro e melanciaira (*Citrullus lanatus*), reação de hipersensibilidade em fumo (*Nicotiana tabacum*), utilização de aminoácidos como fonte de carbono e energia e sensibilidade *in vitro* a cúpricos e antibióticos. Todos os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* produziram enzimas lipolíticas e ácido indol acético, e nenhum apresentou atividade pectinolítica, amilolítica, celulolíticas e proteolítica ou produção do polissacarídeo levana e da toxina siringomicina. Em plântulas, plantas e frutos, todos os isolados induziram sintomas típicos da mancha-aquosa em meloeiro e melanciaira. Pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ($P = 0,05$) os isolados foram separados quanto ao índice de doença em 5 e 7 grupos, respectivamente para plântulas meloeiro e melanciaira, e em 2 grupos para plantas das duas hospedeiras. Em frutos, os isolados foram separados em 3 e 10 grupos para a variável diâmetro da lesão externa e 2 e 9 grupos para profundidade da lesão, respectivamente para meloeiro e melanciaira. Todos os isolados também induziram reação de hipersensibilidade em fumo; utilizaram os aminoácidos asparagina, L-leucina e DL-ácido lático; foram sensíveis a oxiclreto de cobre ($120 \mu\text{g ml}^{-1}$), óxido cuproso ($120 \mu\text{g ml}^{-1}$), hidróxido de cobre ($138,2 \mu\text{g ml}^{-1}$), sulfato de estreptomicina ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) e Agrimaicin[®] 500 ($428 \mu\text{g ml}^{-1}$); e resistentes a kasugamicina ($87 \mu\text{g ml}^{-1}$), agrimicina ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$), eritromicina ($15 \mu\text{g}$), gentamicina ($10 \mu\text{g}$),

amoxicilina (10 µg), neomicina (30 µg), estreptomicina (10 µg), norfloxacinina (10 µg) e rifampicina (5 µg). Foi constatada variabilidade entre os 41 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* quanto a sensibilidade à tetraciclina (30 µg), sendo 41,5% resistentes, 46,32% moderadamente sensíveis e 12,2% altamente sensíveis.

ABSTRACT

The fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* is the main bacterial disease of melon (*Cucumis melo*) in the Northeast of Brazil. In this work 49 isolates of *A. avenae* subsp. *citrulli* were studied aiming: to investigate the production of enzymes (pectinolytic, amylolytic, cellulolytic, lipolytic and proteolytic), phytohormone (indoleacetic acid), polysaccharide (levan) and toxin (syringomycin) by isolates of *A. avenae* subsp. *citrulli* and; to characterize this population based upon disease severity on seedlings, plants and fruits of melon and watermelon (*Citrullus lanatus*), hypersensitivity in tobacco (*Nicotiana tabacum*), utilization of amino acids as carbon and energy sources, and *in vitro* sensitivity to copper and antibiotics. All isolates of *A. avenae* subsp. *citrulli* produced lipase and indoleacetic acid, and none showed pectinolytic, amylolytic, cellulolytic and proteolytic activity nor produced levan and syringomycin. All isolates induced typical symptoms of fruit blotch on seedlings, plants and fruits of melon and watermelon. The Scott-Knott test ($P = 0.05$) separated the isolates for disease index in 5 and 7 groups respectively for melon and watermelon seedlings and 2 groups for plants of these two hosts. In fruits all isolates were separated in 3 and 10 groups for the variable diameter of extern lesion and 2 and 9 groups for lesion depth, respectively for melon and watermelon. All isolates also induced hypersensitivity in tobacco; utilized the amino acids asparagine, L-leucine and DL-acid lactic; showed sensitivity to copper oxychloride ($120 \mu\text{g ml}^{-1}$), cuprous oxide ($120 \mu\text{g ml}^{-1}$), copper hydroxide ($138.2 \mu\text{g ml}^{-1}$), streptomycin sulfate ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) and Agrimaicin 500 ($428 \mu\text{g ml}^{-1}$); and resistance to kasugamycin ($87 \mu\text{g ml}^{-1}$), agrimicin ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$), erythromycin ($15 \mu\text{g}$), gentamicin ($10 \mu\text{g}$), amoxicilin ($10 \mu\text{g}$), neomycin ($30 \mu\text{g}$) streptomycin ($10 \mu\text{g}$), norfloxacin ($10 \mu\text{g}$) and rifampicin ($5 \mu\text{g}$). Variability was found among the 41 isolates in relation to

tetracycline (30 μg), 41.5% were resistant, 46.3 moderately sensitive and 12.2% highly sensitive.

Capítulo I

Introdução geral

INTRODUÇÃO GERAL

A mancha-aquosa, causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Willems et al. (Sin: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* Schaad et al.; *Pseudomonas avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Hu et al.), destaca-se como uma importante doença bacteriana para as culturas da melancia (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum. & Nakai) e do meloeiro (*Cucumis melo* L.).

Esta doença foi descrita primeiramente em melancia nos Estados Unidos da América em 1965 (WEBB; GOTH, 1965) e tem sido relatada em várias regiões produtoras deste país como Geórgia (SCHAAD et al., 1978), Ilhas Marianas (WALL; SANTOS, 1988), na Flórida (HOPKINS, 1989; SOMODI et al., 1991), Indiana (RANE; LATIN, 1990), Oklahoma (JACOBS et al., 1992) e Texas (ISAKEIT et al., 1997). Além dos Estados Unidos, foi relatada na Austrália (O'BRIEN; MARTIN, 1999), Turquia (DEMIR, 1996), Costa Rica (MORA-UMAÑA; ARAYA, 2002) Nicarágua (MUÑOZ; MONTERROSO, 2002), Venezuela (CONTRERAS et al., 1999), Israel (BURDMAN et al., 2005), Japão (SHIRAKAWA et al., 2000), Tailândia e China (SHAAD et al., 2003). No Brasil, Robbs et al. (1991) relataram o patógeno causando manchas em frutos nos municípios de Assis, Marília e Presidente Prudente, no estado de São Paulo. Recentemente, a mancha-aquosa foi assinalada causando doença em melancia no estado de Minas Gerais (MACAGNAN et al., 2003).

Em meloeiro, o primeiro relato da doença nos Estados Unidos da América foi em 1996, com incidência em mais de 50 % dos frutos em campos agrícolas no Texas (ISAKEIT et al., 1997). A mancha-aquosa em meloeiro também foi detectada na Austrália (O'BRIEN; MARTIN, 1999) e Israel (BURDMAN et al., 2005). No Brasil, *A. avenae* subsp. *citrulli* foi registrada em meloeiro nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste por

Robbs et al. (1992). Em 1997 a mancha-aquosa foi detectada pela primeira vez no Rio Grande do Norte (ASSIS et al., 1999) e, posteriormente, no Ceará (SANTOS; VIANA, 2000), Rio Grande do Sul (UENO et al., 2003), Pernambuco (MARIANO; SILVEIRA, 2004) e Bahia (MARIANO et al., 2004).

A importância dessa doença no Brasil está relacionada à cultura do meloeiro, especificamente para a região Nordeste, que é a principal produtora e exportadora no País. O Brasil, com uma produção de 180.000 t em 14.500 ha de área cultivada e apresentando produtividade média de 12,4 t ha⁻¹, é o 21º produtor mundial e o maior produtor de melão da América do Sul, seguido pela Argentina e Chile (FAO, 2005).

A Região Nordeste, no ano de 2003, foi responsável por 94,1 % da produção nacional, sendo o pólo Rio Grande do Norte-Ceará responsável por 83,53 % dessa produção. Bahia e Pernambuco neste mesmo ano contribuíram, respectivamente, com 7,47 e 3,11 % da produção do Nordeste (IBGE, 2004). A produtividade média na região está em torno de 15 t ha⁻¹, podendo chegar até 30 t ha⁻¹ (DIAS et al., 1998).

Em 2005 o Brasil exportou 827.708,334 t de frutas frescas, sendo o melão responsável por 21,73 % desse montante, superado apenas pela banana (*Musa* spp.) (25,63 %) (DATAFRUTA, 2006). O Rio Grande do Norte destaca-se como o líder nacional de exportação de melão (DIAS et al., 1998), criando divisas para o país. Além disso, nesse estado, o meloeiro tem grande importância social tendo gerado na safra 2000-2001, mão de obra aproximada de 60.000 empregos diretos e indiretos (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001).

A mancha-aquosa é hoje um problema para a cultura do meloeiro nas áreas produtoras do Nordeste, na estação das chuvas, principalmente nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (SANTOS; VIANA, 2000). Estimam-se que as perdas devido a essa doença no Rio Grande do Norte estejam em torno de 40 a 50 %, atingindo até 100 % no

período chuvoso (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001). Em levantamento realizado em 18 plantios de meloeiro nos municípios de Mossoró e Baraúna no Rio Grande do Norte, na safra 2001, foi registrada a prevalência da mancha-aquosa em 100% dos campos, com incidência variando de 4,30 a 47,29 % (SILVA et al., 2003). Contudo, essa doença ainda não é de grande expressão econômica para o estado da Bahia, uma vez que um levantamento da intensidade da doença realizado em Juazeiro, em 12 áreas comerciais, em dois períodos de 2004, constatou a ocorrência da mancha-aquosa em apenas um período, com prevalência de 33,33 % e incidência de 0,2 a 4,4 % (SILVA et al., 2005).

Os sintomas da mancha-aquosa ocorrem em plântulas, folhas e frutos, sendo mais comuns e facilmente visualizados nos frutos. Plântulas oriundas de sementes infectadas quando não entram em colapso total, apresentam extensas manchas encharcadas que progridem para verde-escuras (SANTOS; VIANA, 2000) e marrons nos cotilédones (Figura 1A) e às vezes necrose no hipocótilo (HOPKINS et al., 1996). Em áreas com produção adensada pode haver uma expansão rápida da doença (O'BRIEN; MARTIN, 1999).

As lesões nas folhas de plantas adultas são inicialmente pequenas, com aspecto oleoso e coloração verde-clara, assumindo posteriormente uma coloração marrom-escura (SANTOS; VIANA, 2000), com ou sem halo (HOPKINS et al., 1996). Lesões são freqüentemente observadas ao longo das nervuras ou nas margens da folha (O'BRIEN; MARTIN, 1999) (Figura 1B). Dependendo das condições climáticas e da cultivar, as manchas podem crescer e coalescer, e a necrose estender-se por quase toda a área foliar (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001). Mesmo quando a infecção na folha tem pouco ou nenhum efeito sobre o desenvolvimento da planta ela serve como fonte de inóculo para infecção nos frutos (ISAKEIT, 1999).

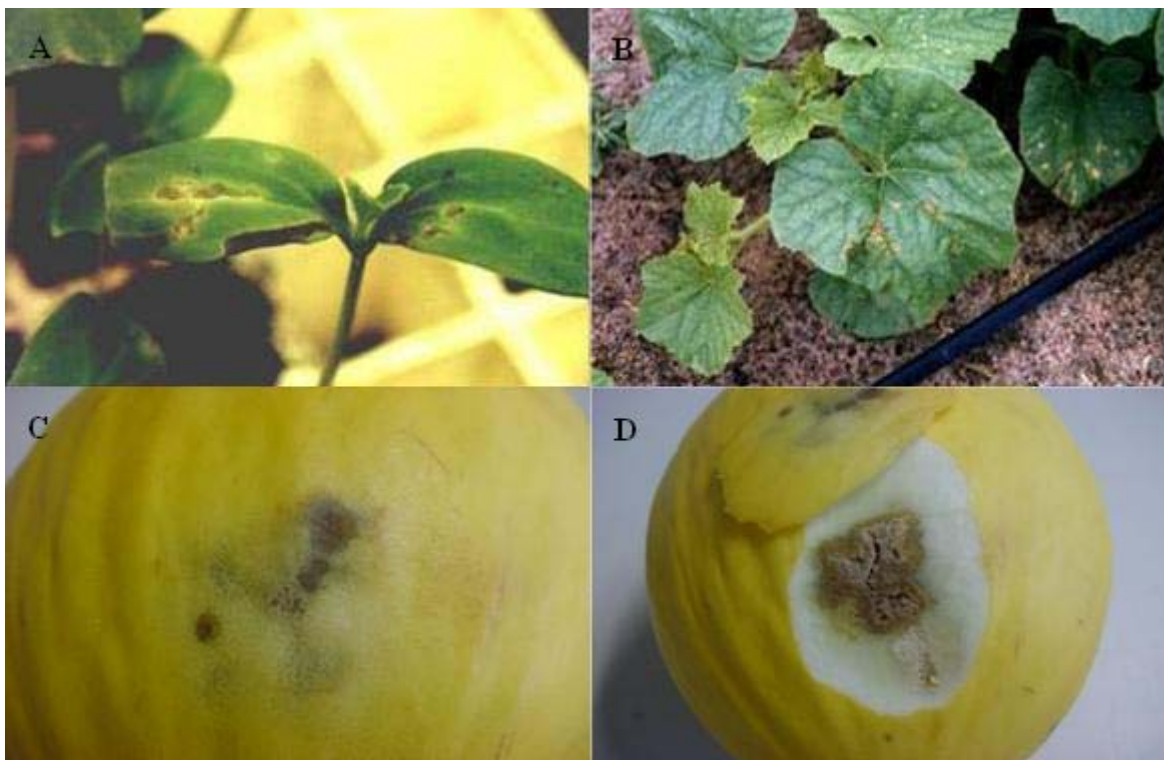


Figura 1 - Sintomas da mancha-aquosa em plântula (A), planta (B) e fruto (C e D) de meloeiro.

Os sintomas mais típicos da doença estão na casca dos frutos maduros antes da colheita, embora a infecção ocorra durante a floração e formação destes (ISAKEIT, 1999). Caracterizam-se inicialmente por pontos oleosos com 1 a 5 mm de diâmetro (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001), os quais se expandem e se tornam manchas marrons, necróticas com ou sem rachaduras no centro (SANTOS; VIANA, 2000). (Figura 1C). Essas rachaduras podem servir como porta de entrada para outros microrganismos que aceleram o apodrecimento do fruto (COSTA et al., 2001). As lesões necróticas localizam-se na superfície do fruto que não entra em contato com o solo, progredindo rapidamente (7 a 10 dias) e atingindo uma maior área antes da colheita (ISAKEIT, 1999). Abortamento de frutos também é observado. Os sintomas internos variam com a idade e o estágio de desenvolvimento do fruto no momento da infecção. Geralmente há uma descoloração da

polpa que se apresenta marrom-avermelhada abaixo da casca, (Figura 1D) embora, a necrose ou simples lesão na casca não reflita o dano que ocorre na polpa imediatamente abaixo, ou seja, a parte interna já pode estar bastante comprometida, mesmo quando a lesão externa tem de 0,5 cm a 2,0 cm de diâmetro (O'BRIEN; MARTIN, 1999). A bactéria, em geral, coloniza a polpa do fruto, onde causa podridão seca, contaminando a semente externa e internamente através da região do hilo, o que dificulta a erradicação (ISAKEIT, 1999). Após a colheita, a severidade do sintoma da mancha-aquosa não aumenta drasticamente nos frutos de meloeiro (MARIANO; SILVEIRA, 2004) ou melanciaira (RUSHING et al., 1997) infectados.

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* apresenta-se como bastonetes Gram negativos, aeróbicos e móveis por um flagelo polar. Apresenta bom crescimento em meio de cultura de rotina como ágar nutritivo - extrato de levedura - dextrose (NYDA) onde forma colônias pequenas com 0,7 a 1,0 mm, brancas ou cremes. Cresce a temperatura de 41 °C, mas não a 4 °C; não hidrolisa a arginina e possui reações positivas para os testes de catalase, oxidase, urease e lipase (SCHAAD et al., 1978). Cavalcanti et al. (2005), analisando as condições favoráveis ao cultivo de quatro isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*, observaram crescimento da bactéria na temperatura entre 5 e 45 °C, com máximo a 35 °C; e na faixa de pH de 5,0 a 9,0, com máximo em pH 7,0; tolerância a concentrações de 1, 2, 3 e 4 % de NaCl, com crescimento máximo a 2 % e mínimo a 4 % e utilização dos carboidratos fermentáveis glucose, galactose, ramnose, sacarose, lactose, maltose, amido, inulina, manitol, dulcitol, sorbitol e salicina.

Além do meloeiro e melanciaira, a abóbora (*Cucumis maxima* L.) também é hospedeira de *A. avenae* subsp. *citrulli* (LANGSTON et al., 1999). Em estação de quarentena em Israel, a bactéria foi detectada em plântulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e berinjela (*Solanum melongena* L.) provenientes de sementes

importadas dos Estados Unidos (ASSOULINE et al., 1997). No Brasil, Robbs et al. (1991) observaram sintomas da doença, inoculando o patógeno em pepino (*Cucumis sativus* L.), abóbora e chuchu (*Sechium edule* L.). Inoculações artificiais de *A. avenae* subsp. *citrulli* em pepino, melancia, maxixe (*Cucumis anguria* L.), abóbora moranga (*Cucurbita maxima* Duchesne), tomate, berinjela e pimentão (*Capsicum annuum* L.) resultaram em sintomas (NASCIMENTO et al., 2004). Oliveira et al. (2003), relataram a ocorrência da mancha-aquosa em melão-pepino (*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud.) Também são citadas como hospedeiras alternativas de *A. avenae* subsp. *citrulli* as cucurbitáceas melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.), bucha (*Luffa cylindrica* M. Roem.) (SANTOS; VIANA, 2000) e melão pepino (*Cucumis melo* var. *Cantalupensis* Naud.) (OLIVEIRA et al., 2003). Na Austrália e no Texas, respectivamente as plantas invasoras *Cucumis myriocarpus* L. e *Citrullus lanatus* var. *citroides* foi assinalada como hospedeira da bactéria (ISAKEIT, 1999; O'BRIEN; MARTIN, 1999).

No campo, *A. avenae* subsp. *citrulli* sobrevive em plântulas voluntárias e nas hospedeiras alternativas citadas acima. No solo, aparentemente a bactéria não sobrevive mais do que algumas semanas na ausência de uma planta hospedeira (ISAKEIT, 1999), mas a semente é importante para a sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli*. Esse patógeno sobreviveu durante seis meses em sementes de melão armazenadas em condições de laboratório procedentes de frutos infectados de áreas produtoras (OLIVEIRA et al., 2001) e por 12 meses em sementes de melancia (HOPKINS et al., 1996).

As principais fontes de inóculo da bactéria são sementes contaminadas, plântulas infectadas e restos culturais. A disseminação do inóculo a longa distância ocorre principalmente por sementes contaminadas e pelo transplântio de mudas de cucurbitáceas infectadas (HOPKINS et al., 1996). Assis et al. (1999) sugeriram que a introdução da mancha-aquosa no Rio Grande do Norte ocorreu por sementes infectadas, hipótese que

também não deve ser descartada em relação ao surto da doença no estado do Ceará (VIANA et al., 2000). A transmissão de *A. avenae* subsp. *citrulli* por sementes é muito eficiente. O'Brien e Martin (1999) e Oliveira et al. (2001) verificaram transmissão variando de 33 a 91 % e 10 a 69 %, respectivamente. A transmissão dessa bactéria por sementes merece atenção especial, devido ao uso pelos agricultores de sementes da própria lavoura para novos plantios. Segundo Sales Júnior e Menezes (2001) esse é um dos fatores responsáveis pela ocorrência da doença na maioria dos campos de cultivo de meloeiro no Rio Grande do Norte. Após a germinação da semente contaminada, a bactéria é facilmente disseminada para plântulas ou plantas vizinhas através de respingos de água de chuva e irrigação, solos infestados, insetos, utensílios agrícolas, operários de campo (SANTOS; VIANA, 2000) e por aerossóis (HOPKINS et al., 1992). Além disso, as sementes oriundas de frutos infectados abandonados no solo podem resultar em plantas voluntárias infectadas, servindo de inóculo primário para o próximo plantio. As lesões nas folhas das plantas são importantes fontes de inóculo para os frutos (HOPKINS et al., 1992). Em condições favoráveis de temperatura e umidade, a bactéria pode disseminar-se rapidamente e poucos sítios de infecção primária no campo podem resultar em até 100 % de infecção em frutos na época da colheita (HOPKINS et al., 1992). A disseminação de *A. avenae* subsp. *citrulli* na pós-colheita pode ocorrer de forma limitada através do contato entre frutos sadios e doentes (RUSHING et al., 1997).

Em melancia, a bactéria penetra na folha ou no fruto através de estômatos e ferimentos (O' BRIEN; MARTIN, 1999). Frutos em estágio inicial de formação são mais susceptíveis, uma vez que frutos maduros apresentam a superfície coberta por uma espessa camada de cera que dificulta a penetração da bactéria pelos estômatos (FRANKLE et al., 1993). Trabalhos de microscopia eletrônica de varredura a partir de plantas e frutos de melão inoculados artificialmente revelaram que *A. avenae* subsp. *citrulli* penetra nas folhas

através de estômatos (SILVA NETO et al., 2004a) e nos frutos através de estômatos e lenticelas (SANTOS et al., 2004). Após a penetração no fruto, a bactéria, possivelmente, permanece em estado latente até o início do amadurecimento quando se multiplica intensamente (O' BRIEN; MARTIN, 1999). *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* parece não invadir sistemicamente as sementes de melão através do sistema vascular (RANE; LATIN, 1992), embora Hopkins et al. (1996) tenham obtido sementes de melancia infectadas extraídas de frutos sem sintomas da mancha-aquosa, os quais estavam adjacentes a frutos tipicamente doentes. Em melancieira, Walcott et al. (2003) verificaram que suas flores são um potencial local de penetração para infecção de frutos e sementes, no entanto Santos Filho et al. (2004) observaram que frutos obtidos de flores inoculadas e plântulas oriundas de sementes desses frutos não apresentaram sintomas da doença. Cardoso et al. (2005), avaliando 63 frutos de melão proveniente de flores inoculadas com *A. avenae* subsp. *Citrulli*, verificaram que apenas um apresentou sintomas da doença e que a bactéria não foi transmitida para as sementes.

Condições de alta umidade relativa e temperatura elevada contribuem para a colonização de folhas e frutos, rápido desenvolvimento da doença e disseminação secundária desta fitobactéria (O'BRIEN; MARTIN, 1999; WALCOTT et al., 2003). Durante períodos de temperaturas elevadas e dias ensolarados com chuvas ao entardecer, os sintomas da doença desenvolvem-se e a bactéria se dissemina sobre folhas e frutos mais rapidamente. A doença parece não se desenvolver durante tempo frio e chuvoso (HOPKINS et al., 1992). Em casa de vegetação, o período de incubação e a severidade da mancha-aquosa em meloeiros com 20 dias são influenciados pelo aumento da duração do período de molhamento foliar e pelo incremento da concentração de inóculo de *A. avenae* subsp. *citrulli* (SILVEIRA et al., 2003). Em frutos, a severidade da doença é influenciada pela temperatura, umidade e idade dos frutos (SILVEIRA et al., 2004).

Apesar da indicação de várias medidas de controle para a mancha-aquosa, sabe-se que uma vez introduzida em uma área, a erradicação é muito difícil (SALES JÚNIOR; MENEZES 2001). A primeira medida a ser tomada é a utilização de sementes livres da bactéria, de firmas credenciadas e em embalagens herméticas (SANTOS; VIANA, 2000; VIANA et al., 2000). Além disso, vários tratamentos de sementes têm sido recomendados: hipoclorito de sódio 0,5 % por 20 minutos; ácido clorídrico 1,8 % por 5 minutos (RANE; LATIN, 1992); ácido láctico 2 % por 20 minutos (SANTOS; VIANA, 2000); estreptomicina por 16 horas ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) (SOWELL; SCHAAD, 1979); sulfato de estreptomicina 0,1 % por 30 minutos; sulfato de estreptomicina 0,1 % + solução salina 1,5 % por 30 minutos; Bion 0,01 % (acibenzolar- S- metil) por 20 minutos (MORAES et al., 2002); Bion 0,01 %, sulfato de estreptomicina 0,1 %, kasugamicina 0,1 % e oxiclreto de cobre 0,5 %, isoladamente ou em mistura por 30 minutos (SILVA NETO et al., 2003); ácido peroxiacético $1.600 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 30 minutos seguindo-se secagem a baixa umidade a 40°C por 24 horas (HOPKINS et al., 2003) ou; água quente a 52°C por 10 minutos (SANTOS; VIANA, 2000).

Para evitar a doença em cultivos estabelecidos, deve-se proteger a planta através de aplicações quinzenais ou semanais com fungicidas cúpricos, iniciando-se na floração, ou antes, e se prolongando até a maturação dos frutos (WALCOTT et al., 2001). Sales Júnior et al. (2005) verificaram a eficiência de oxiclreto de cobre (1250 ppm), kasugamicina (70 ppm), kasugamicina + oxiclreto de cobre (40+1250 ppm) e sal de oxitetraciclina (82 ppm) na redução da incidência da doença em frutos no campo.

Outras medidas de controle, principalmente após a entrada de *A. avenae* subsp. *citrulli* no campo são: fazer rotação de culturas por pelo menos três anos; evitar plantio em áreas úmidas ou em períodos chuvosos; efetuar adubação equilibrada, evitando excesso de nitrogênio (VIANA et al., 2000); erradicar plântulas/plantas com sintomas e plantas

voluntárias; manter temperatura e umidade em níveis baixos em casa de vegetação e estufa (DIAS et al., 1998); destruir restos de culturas, principalmente plantas infectadas no campo; evitar movimentação de pessoas ou implementos no campo quando as plantas estiverem molhadas (orvalho, irrigação, chuva); evitar plantio direto (O'BRIEN; MARTIN, 1999) e; eliminar cucurbitáceas silvestres, como a bucha e o melão-de-são-caetano (VIANA et al., 2000).

Novas medidas de controle dessa doença estão sendo pesquisadas, tais como o controle biológico, em fase inicial no Brasil e no mundo (MEDEIROS et al., 2002; FESSEHAIE; WALCOTT, 2005), e a utilização de cultivares com algum grau de resistência a mancha-aquosa em melanciaira (HOPKINS et al., 1993; HOPKINS; THOMPSON, 2002) e meloeiro (BUSO et al., 2004).

Apesar da importância econômica da mancha-aquosa e do conhecimento acumulado sobre *A. avenae* subsp. *citrulli*, não existem informações sobre os isolados do Brasil quanto a produção de enzimas, fitohormônios, polissacarídeos e toxinas e, poucos estudos foram realizados envolvendo a caracterização de isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*.

Somodi et al. (1991) relataram pela primeira vez a diversidade em *A. avenae* subsp. *citrulli* ressaltando que os isolados obtidos nas epidemias de mancha-aquosa no fim da década de 80 eram diferentes do isolado tipo obtido em 1978 (SCHAAD et al., 1978). Concordando com esta idéia, O'Brien e Martin (1999) relataram dois grupos distintos de *A. avenae* subsp. *citrulli* entre isolados oriundos do norte e sul de Queensland com base na patogenicidade, utilização de L-leucina e 2-amino etanol. Também Walcott et al. (2004) verificaram a existência de 2 grupos genética e bioquimicamente distintos entre 64 isolados de diversas partes do mundo, com base na análise de fingerprint de DNA por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e REP-PCR. O grupo I continha 82 % dos isolados

provenientes de cucurbitáceas diferentes de melancia e não utilizavam L-leucina como única fonte de carbono, com exceção da sub-espécie tipo. Já no grupo II, onde 94 % dos isolados foram obtidos de melancia, 96 % utilizavam L-leucina. Isolados do grupo I foram moderadamente agressivos ao melão cantaloupe, abóbora e abobrinha, enquanto os do grupo II foram mais agressivos à melancia que as outras cucurbitáceas. A análise de 56 desses isolados evidenciou 24 haplotipos diferentes pela análise de fingerprint de DNA utilizando a enzima de restrição *SpeI* e PFGE.

Mais recentemente, estudos realizados por Burdman et al. (2005) com 12 isolados de melão e melancia, comprovaram a introdução de isolados dos dois grupos já descritos de *A. avenae* subsp. *citrulli* em Israel. Esses autores verificaram que todos os isolados apresentaram atividade celulolítica, fraca atividade proteolítica e pectinolítica e não produziram amilase. Digestão com *SpeI* seguida de PFGE dividiu os doze isolados em cinco diferentes haplotipos, os quais puderam ser reunidos nos grupos I e II, pré-existentes. Os isolados de meloeiro revelaram-se monogênicos, constituindo um único haplotipo enquanto os de melancia consistiram em quatro haplotipos diferentes. Apesar da homogeneidade genética, os isolados de meloeiro puderam ser diferenciados pela agressividade e perfil de utilização de substratos.

Silveira et al. (2003) relataram que 20 isolados apresentaram variabilidade em relação a componentes epidemiológicos da doença, quando inoculados em plântulas, plantas com 20 dias e em frutos, sendo agrupados em quatro grupos de similaridade. Esses autores enfatizaram a necessidade de se testar diferentes isolados do patógeno em programas de manejo integrado da mancha-aquosa.

A diversidade em *A. avenae* subsp. *citrulli* também pode ser observada com relação a reação de hipersensibilidade em fumo que não é induzida pelo isolado tipo do patógeno (SCHAAD et al., 1978), embora tenha sido relatada em outros isolados (RANE; LATIN,

1992; SILVEIRA et al., 2003; SOMODI et al., 1991). A controvérsia em relação a esta característica possibilita o uso da mesma em estudos de variabilidade.

Um dos grandes problemas na utilização do controle químico é a ocorrência natural de isolados bacterianos resistentes, mesmo se nunca expostos anteriormente a antibióticos (ROMEIRO; VIEIRA JÚNIOR, 2005), bem como o surgimento de populações resistentes devido ao uso continuado dos mesmos (LOPES; QUEZADO-SOARES, 1997; ROMEIRO, 2005; SILVA; LOPES, 1995). Desta forma, quando vários isolados de uma mesma bactéria fitopatogênica são testados para sensibilidade a um conjunto fixo de antibióticos, há tendência de se traçar um perfil característico da espécie em relação à sensibilidade (ROMEIRO et al., 1993). De forma semelhante, a sensibilidade a fungicidas pode ser utilizada para caracterizar populações de microrganismos (SILVA NETO et al., 2004b).

De acordo com Wiebe et al. (2004) a diversidade em populações de *A. avenae* subsp. *citrulli* favorece a adaptação à pressão de seleção exercida por ambiente desfavorável, introdução de cultivares resistentes e controle químico, dificultando o manejo da doença.

Tendo em vista a crescente importância da mancha-aquosa do meloeiro para o Nordeste do Brasil e a carência de conhecimentos básicos que dêem suporte ao controle dessa doença, o presente trabalho teve como objetivos: investigar a produção de enzimas, fitohormônio, polissacarídeo e toxina por isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*, (Capítulo II) e; caracterizar isolados dessa bactéria com base na severidade da doença em plantas, plântulas e frutos de meloeiro e melanciaira, utilização de aminoácidos, resposta de hipersensibilidade em fumo e sensibilidade *in vitro* a cúpricos e antibióticos (Capítulo III).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, S. M. P.; MARIANO, R. L. R.; SILVA-HANLIN, D. M. W.; DUARTE, V. Mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, no Estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 191, 1999.
- ASSOULINE, I.; MILSHTEIN, H.; MIZRAHI, M.; LEVY, E.; BEN-ZE'EV, I. S. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* transmitted by solanaceous seeds. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.25, n.2, p.117, 1997 (Resumo).
- BURDMAN, S.; KOTS, N.; KRITZMAN, G.; KOLEPOWITZ, J. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, 12, p.1339-1347, 2005.
- BUSO, G. S. C.; NASS, L. L.; MARQUES, A S. A.; LOPES, C. A.; BUSO, J. A. Avaliação de genótipos de melão, visando identificar fontes de resistência a *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Brasília: EMBRAPA, 2004. 12 p. (Comunicado Técnico 116).
- CARDOSO, E.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, A. J.; Mancha-aquosa do meloeiro: infecção pelas flores, transmissão por sementes e controle. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9, 2005, Recife. **Anais...** Recife: FACEPE/CNPq, 2005. p.29.
- CAVALCANTI, M. T; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* sob diferentes temperaturas, pH, concentrações de cloreto de sódio e fontes de carbono. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1313-1318, 2005.
- CONTRERAS, N.; VELÁSQUEZ, J.; GÓMEZ, N.; PINEDA, J.; CAMINO, J.M. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* en patilla en Venezuela. **Fitopatologia Venezolana**, v.1, p.35, 1999. (Abstract).

COSTA, N. D.; GRANGEIRO, L. V.; FARIA, C. M. B.; TAVARES, S. C. C. H.; ALENCAR, J. A.; ARAÚJO, J. L. P. **A cultura do melão**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 2001. 117p. (Coleção Plantar -série vermelha - Fruteiras).

DATAFRUTA. **Exportação brasileira de frutas frescas**. Comparativo das exportações brasileiras de frutas frescas. 2006. Disponível em <<http://www.famato.org.br/modules.php?name=Section&sop=printpage&artid=31>>. Acesso em: 22 jan. 2006.

DEMIR, G. A new bacterial disease of watermelon in Tuerkiye: bacterial fruit blotch of watermelon (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*) Willems *et al.*) **Journal of Turkish Phytopathology**, v.25, n.1-2, p.43-49, 1996.

DIAS, R. C. S.; COSTA, N. D.; CERDAN, C.; SILVA, P. C. G.; QUEIROZ, M. A.; ZUZA, F.; KEITE, L. A. S.; PESSOA, P. F. A. P.; TERAPO, D. A. A cadeia produtiva do melão no Nordeste. In: CASTRO, A. M. G.; LIMA, S. M. V.; GOEDERT, W. J.; FILHO, A. F.; VASCONCELOS, J. R. P. (Eds.). **Cadeias produtivas e sistemas naturais: prospecções tecnológicas**. Brasília: SPI, 1998. p. 440-493.

FAO. **FAOSTAT**. Agricultural statistics database. Rome: World Agricultural Information Centre, 2005. Disponível em: <<http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.pl>>. Acesso em: 05 jan. 2006.

FESSEHAIE, A.; WALCOTT, R. R. Biological control to protect watermelon blossoms and seed from infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, n. 4, p. 413-419, 2005.

FRANKLE, W. G. O.; HOPKINS, D. L.; STALL, R. E. Ingress of watermelon fruit blotch bacterium into fruit. **Plant Disease**, St. Paul, v.77, n.11, p.1090-1092, 1993.

HOPKINS, D. L. Bacterial fruit blotch of watermelon: a new disease in the eastern USA. **Proceedings of Cucurbitaceae**, local, v. 89, p. 74-75, 1989.

HOPKINS, D. L.; STALL, R. E.; LATIN, R.; RUSHING, J.; COOK, W. P.; KEINATH, A. P. B. **Bacterial fruit blotch of watermelon**. Florida: American Sunmelon, 1992. 2 p. (Bulletin).

HOPKINS, D. L.; THOMPSON, C. M.; ELMSTROM, G. W. Resistance of watermelon seedlings and fruit to the fruit blotch bacterium. **HortScience**, Alexandria, v. 28, p. 122-123, 1993.

HOPKINS, D. L.; CUCUZZA, J. D.; WATERWON, J. C. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 5, p. 529-532, 1996.

HOPKINS, D. L.; THOMPSON, C. M. Evaluation of Citrully sp. Germ Plasm for Resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 1, p. 61-64, 2002.

HOPKINS, D. L.; CUCUZZA, J. D.; WATTERSON, J. C. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1495-1499, 2003.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - **Banco de dados agregados**. Brasília: Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA, 2004. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp>>. Acesso em: 05 dez. 2005.

ISAKEIT, T. **Bacterial fruit blotch in watermelon**. Texas: The Agricultural Extension Service - USA, 1999. Disponível em: <<http://www.cygnus.tamu.edu/extlabn/vegetables/wmelon.htm>>. Acesso em: 22 dez. 2002.

ISAKEIT, T.; BLACK, M.C.; BARMES, L.W.; JONES, J.B. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.6, p.694, 1997. (Abstract).

- ISAKEIT, T.; BARMES, L. W.; JONES, J. B. Natural infection of Citronmelon with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 3, p. 351, 1998.
- JACOBS, J.L.; DAMICONE, J.P.; McCRAW, B.D. First report of bacterial fruit blotch of watermelon in Oklahoma. **Plant Disease**, St. Paul, v.76, n.11, p.1185, 1992. (Abstract).
- LANGSTON, D. B.; WALCOTT, R D.; GITAITIS, R. D.; SANDERS JUNIOR, F. H. First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 2, p. 199, 1999 (Abstract).
- LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das Hortaliças: Diagnóstico e controle**. Brasília: EMBRAPA - CNPH, 1997. 70 p.
- LUCAS, J. A. **Plant pathology and plant pathogens**. 3 ed. London: Blackwell Science, 1998. 274 p.
- MACAGNAN, D; ROMEIRO, R. S.; MENDONÇA, H. L.; BARRETO, R. W. Mancha bacteriana da melancia: uma nova doença no estado de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 29, n. 3, p. 286-287, 2003 (Resumo).
- MARIANO, R. L. R.; SILVA, V. A. V.; SILVA, A. M. F.; MEDEIROS, F. H. V.; VIANA, I. O. Ocorrência da mancha-aquosa do melão na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, suplemento, p. S147-148, 2004 (Resumo).
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Mancha-aquosa: importante bacteriose do meloeiro no Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v.1, p. 79-88, 2004.
- MEDEIROS F. H. V.; MORAES, I. S. F.; MARIANO, R. L. R. Utilização de sementes para o controle da mancha-aquosa do melão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasileira, v. 27, suplemento, p. S64, 2002 (Resumo).

MORAES, I. S. F.; MEDEIROS, F. H. V.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Proteção de plantas de melão contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* mediada por *Bacillus* spp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasileira, v.27, suplemento, p.S65-66, 2002 (Resumo).

MORA-UMAÑA, F.; ARAYA, C.M. Mancha bacteriana del fruto de melón y sandia: manejo integrado de una emergencia. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)**, n.66, p.105-110, 2002. (Hoja técnica, no. 43).

MUNÕS, M.; MONTERROSO, D. Identificación de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em semillas de sandia em Nicaragua. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)**, n.66, p.101-104, 2002. (Hoja técnica, no. 43).

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, E. I. Hospedeiros alternativos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 345-349, 2004.

O'BRIEN, R. G.; MARTIN, A. L. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 39, n. 4, p. 479-485, 1999.

OLIVEIRA, I. S.; SALES JÚNIOR, R.; MARIANO, R. L. R. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*: método de isolamento e transmissão por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasileira, v. 26, suplemento, p. 302, 2001. (Resumo).

OLIVEIRA, I. S.; SALES JÚNIOR, R.; MARIANO, R. L. R. Ocorrência da mancha-aquosa por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em melão-pepino no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 682, 2003.

RANE, K. K.; LATIN, R. X. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 5, p. 509-512, 1992.

RANE, K. K.; LATIN, R. X. Investigation of bacterial fruit blotch of watermelon.

Phytopathology, St. Paul, v. 80, n. 10, p. 1070, 1990.

ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J.; RAMOS, R. S.; SINIGAGLIA, C. Mancha bacteriana da melancia no estado de São Paulo, causada por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, suplemento, p. XLVIII, 1991. (Resumo).

ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAN, L. O. S. Podridões de frutos de melão em pós-colheita causadas por bactérias no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 195, 1992.

ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: Imprensa Universitária UFV, 2005. 417p.

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

ROMEIRO, R. S.; VIEIRA JÚNIOR, J. R. Importância de antibióticos para o controle de fitopatógenos e para outras finalidades em Fitopatologia. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 31, suplemento, p. 116-169, 2005.

RUSHING, J. W.; COOK, W. P.; KEINATH, A. P. Postharvest behavior of watermelon fruit blotch. In: HOPKINS, D.; STALL, R. E.; LATIN, R.; RUSHING, J. W.; COOK, W. P.; KEINATH, A. P. Bacterial fruit blotch of watermelon. Tampa: **Citrus & Vegetable Magazine**, p. 5-6, 1997.

SALES JÚNIOR, R.; MENEZES, J. B. **Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e viróticas do cultivo do melão no Estado do RN**. Mossoró: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 2001. 25 p. (Relatório Técnico).

- SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, I. S.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, G. F.; NUNES, G. H. S. Efeito de kasugamicina e oxiclureto de cobre no controle da mancha-aquosa do meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 295-298, 2005.
- SANTOS, L. A.; CAVALCANTE, C. M.; SILVEIRA, E. B. Colonização e penetração de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em frutos e flores de meloeiro. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRPE, 14. 2004, Recife. **Anais...** Recife, 2004. CD ROM.
- SANTOS, A. A.; VIANA, F. M. **Mancha-aquosa do melão**. Fortaleza: EMBRAPA-SPI, 2000. 2 p.
- SANTOS FILHO, J. A; MARIANO, R. L. R; MEDEIROS, F. H. V. Infecção de frutos de meloeiro e controle da mancha-aquosa do melão pela proteção das flores. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8, 2004, Recife. **Resumos...** Recife: FACEPE/CNPq, 2004. p. 31.
- SCHAAD, N. W.; SOWELL, G.; GOTH, R. W.; COLWELL, R. R.; WEBB, R. E. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 28, p. 117-125, 1978.
- SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; RANDHAWA, P. Emergence of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as crop threatening disease of watermelon and melon. In: IACOBELLIS, N.S.; COLLMER, A.; HUTCHESON, S.W.; MANSFIELD, J.M.; MORRIS, C.E.; MURILLO, J.; SCHAAD, N.W.; STEAD, D.E.; SURICO, G.; ULLRICH, M.S. (Eds). ***Pseudomonas syringae* and related pathogens** – Biology and genetics. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 573-582.
- SHIRAKAWA, T.; KIKUCHI, S.; KATO, T.; ABIKO, K.; KAIWA, A. Occurrence of watermelon bacterial fruit blotch in Japan. **Japanese Journal of Plant Pathology**, v.66, p. 223-231, 2000.

SILVA NETO, E.B.; MEDEIROS, F. H. V.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Controle químico da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, suplemento, p. S340, 2003 (Resumo).

SILVA NETO, E. B.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L.; SANTOS, L. A. Colonização e penetração de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em folhas, sementes e frutos de melão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, suplemento, p. S54, 2004a (Resumo).

SILVA NETO, E. B.; SILVEIRA, E. B.; RIOS, P. R. P.; GOMES, A. M. A. Caracterização fisiológica a benomyl de isolados de *Colletotrichum lagenarium* causador da antracnose do pepino em Pernambuco. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 427-431, 2004b.

SILVA, E. I.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, I. S. Levantamento da incidência da mancha-aquosa do melão no Rio Grande do Norte e determinação do tamanho das amostras para quantificação da doença. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 29, n. 2, p. 172-176, 2003.

SILVA, V. L.; LOPES, C. A. Isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistentes a estreptomicina e oxitetraciclina em tomateiros pulverizados ou não com antibióticos agrícolas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 80-84, 1995.

SILVA, V. A. V.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. Levantamento da intensidade da mancha-aquosa do meloeiro em Juazeiro, Bahia. **Caatinga**, Mossoró, v. 18, n. 1, p. 41-46, 2005.

SILVEIRA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Severidade da mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 171-175, 2003.

SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; OLIVEIRA, S. M. A. Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 34-38, 2004.

SOMODI, G. C.; JONES, J. B.; HOPKINS, D. L.; STALL, R. E.; KUCHARÉK, T. A.; HODGE, N. C.; WATTERSON, J. C. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, n. 10, p. 1053-1056, 1991.

SOWELL, G.; SCHAAD, N. W. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon: seed transmission and resistance of plant introductions. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 63, p. 437-441, 1979.

UENO, B.; COUTO, M. E. O.; UESUGI, C. H. Ocorrência de mancha-aquosa em melão no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, suplemento, p. S246, 2003 (Resumo).

VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A.; CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O.; LOPES, C. A. **Surto da mancha-aquosa em frutos de melão nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte**: recomendações preliminares de controle. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 4 p. (Comunicado Técnico, 50).

WALCOTT, R. R.; LANGSTON, D.; GITAITIS, R. D.; GAY, D.; HOPKINS, D. L. KUCHARÉK, T. A.; LATIN, R.; EGGEL, D.; COOK, W. P.; KEINATH, A. P.; LOVIC, B. Guidelines for managing bacterial fruit blotch disease. Georgia, 2001. Disponível em: <<http://www.tifton.uga.edu/veg//Alerts/.htm>>. Acesso em: 18 jan.. 2006.

WALCOTT, R. R.; GITAITIS, R. D.; CASTRO, A. C. Role blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 5, p. 528-534, 2003.

WALCOTT, R. R.; FESSEHAIE, A.; CASTRO, A. C. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hozsta. **Journal of Phytopathology**, St. Paul, v. 152, n. 5, p. 277-285, 2004.

WALL, G. C.; SANTOS, V. M. A. New bacterial disease of watermelon in the Mariana Islands. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 12, p. 1605, 1988.

WEBB, R. E.; GOTH, R. W. A. Seedborne bacterium isolated from watermelon. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 48, p. 818-821, 1965.

WIEBE, W.L.; HOPKINS, D.L. & WALCOTT, R.R. **Bacterial Fruit Blotch - Questions and answers with the experts.** Bulletin, 2004. 12 p. Disponível em: <www.seedquest.com/vegetables/watermelon/pdf/bfb.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2006.

Capítulo II

Produção de enzimas, fitohormônio, polissacarídeo e toxina

por isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

1 **PRODUÇÃO DE ENZIMAS, FITOHORMÔNIO, POLISSACARÍDEO E TOXINA**
2 **POR ISOLADOS DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli****

3

4 **JANAÍNA C. DE OLIVEIRA^{1**}, ELINEIDE B. DA SILVEIRA² ROSA L. R.**5 **MARIANO^{1**} & IVANISE. O. VIANA^{1**}**

6

7 ¹Departamento de Agronomia/Fitossanidade; ²Departamento de Biologia/Microbiologia, e-
8 mail: elineidebs@yahoo.com.br; Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE,
9 52171-030, Recife, PE.

10

11 (Aceito para publicação em / /)

12 Autor para correspondência: Elineide B. Silveira

13

14 OLIVEIRA, J.C., SILVEIRA, E.B., MARIANO, R.L.R. & VIANA, I. O. Produção de
15 enzimas, fitohormônio, polissacarídeo e toxina por isolados de *Acidovorax avenae* subsp.
16 *citrulli*. Fitopatologia Brasileira.

17

18 **RESUMO**

19 A mancha-aquosa causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* é a principal
20 doença bacteriana do meloeiro (*Cucumis melo*) no Nordeste do Brasil. Este trabalho teve
21 como objetivo investigar a produção de enzimas (pectinolíticas, amilolíticas, celulolíticas,
22 lipolíticas e proteolíticas), fitohormônio (ácido indol-acético), polissacarídeo (levana) e
23 toxina (siringomicina) por isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*. Testes *in vitro* foram
24 realizados com 41 isolados do patógeno obtidos de frutos e sementes de meloeiro, melão-
25 pepino (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*) e melanciaira (*Citrullus lanatus*) infectados.

** Bolsista do CNPq

26 Todos os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* produziram enzimas lipolíticas e ácido indol
27 acético, e nenhum apresentou atividade pectinolítica, , amilolítica, celulolítica e
28 proteolítica ou produção de levana e siringomicina. Os resultados indicam que não existiu
29 diversidade na população de *A. avenae* subsp. *citrulli* em relação as características
30 estudadas.

31 **Palavras-chave adicionais:** mancha-aquosa, enzimas, fitohormônio,
32 polissacarídeo, toxina.

33

34 **ABSTRACT**

35 **Production of enzymes, phytohormone, polysaccharide and toxin by isolates of**
36 ***Acidovorax avenae* subsp. *citrulli***

37 The fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* is the main bacterial
38 disease of melon (*Cucumis melo*) in the Northeast of Brazil. This work aimed to
39 investigate the production of enzymes (pectinolytic, amyolytic, cellulolytic, lipolytic e
40 proteolytic), phytohormone (indoleacetic acid), polysaccharide (levan) and toxin
41 (syringomycin) by isolates of *A. avenae* subsp. *citrulli*. *In vitro* tests were performed with
42 41 pathogen isolates obtained from fruits and seeds of infected melon, *Cucumis melo* var.
43 *cantalupensis* and watermelon (*Citrullus lanatus*). All isolates of *A. avenae* subsp. *citrulli*
44 produced lipase and indoleacetic acid, and none showed pectinolytic, amyolytic,
45 cellulolytic and proteolytic activity nor produced levan and syringomycin. Theses results
46 suggested no diversity of *A. avenae* subsp. *citrulli* isolates in relation to studied
47 characteristics.

48 **Additional keywords:** fruit-blotch, enzymes, phytohormone, polysaccharide,
49 toxin.

50

51 A mancha-aquosa, causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*)
52 Willems *et al.* (Sin: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* Schaad *et al.* *P. avenae*
53 subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*) Hu *et al.*, é a principal doença bacteriana da cultura do
54 meloeiro (*Cucumis melo* L.) no Nordeste do Brasil, sendo responsável por grandes perdas
55 na produção e depreciação dos frutos no Rio Grande do Norte e Ceará. Essa doença é
56 particularmente importante para essa Região que é a principal produtora e exportadora
57 nacional de frutos frescos de melão.

58 Somodi *et al.* (1991) relataram pela primeira vez a diversidade em *A. avenae*
59 subsp. *citrulli* ressaltando que os isolados obtidos nas epidemias de mancha-aquosa no fim
60 da década de 80 eram diferentes do isolado tipo obtido em 1978 (Schaad *et al.*, 1978).
61 Posteriormente, grupos distintos de *A. avenae* subsp. *citrulli* foram relatados por O'Brien
62 & Martin (1999), Walcott *et al.* (2004) e Burdman *et al.* (2005) com base em
63 características genéticas, bioquímicas, de patogenicidade e agressividade. De acordo com
64 Wiebe *et al.* (2004) esta diversidade em populações de *A. avenae* subsp. *citrulli* favorece a
65 adaptação à pressão de seleção exercida por ambiente desfavorável, introdução de
66 cultivares resistentes e controle químico, dificultando o manejo da doença.

67 Apesar da importância econômica da mancha-aquosa e do conhecimento
68 acumulado sobre *A. avenae* subsp. *citrulli*, não existem informações sobre os isolados do
69 Brasil quanto a produção de enzimas, fitohormônios, polissacarídeos e toxinas, sendo este
70 o objetivo do presente trabalho.

71 Foram utilizados 41 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* obtidos de frutos e
72 sementes de meloeiro, melão-pepino (*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud.) ou
73 melanciaira (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum. & Nakai) infectados (Tabela 1) e
74 pertencentes a Coleção de Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE.

75 Os isolados foram testados quanto à produção de enzimas pectinolíticas,
76 amilolíticas, celulolíticas, lipolíticas e proteolíticas, através de métodos específicos
77 descritos por Cattelan (1999) e Mariano *et al.* (2005). A depressão no meio de cultura foi o
78 indicativo positivo para produção de enzimas pectinolíticas e a presença de halo claro ao
79 redor das colônias de *A. avenae* subsp. *citrulli* para as demais enzimas. Como padrões
80 positivos foram utilizados os isolados Pss28 de *Pectobacterium carotovorum* subsp.
81 *carotovorum* (Jones) Hauben *et al.* (pectinolítica), XccR4 de *Xanthomonas campestris* pv.
82 *campestris* (Pammel) Dowson (amilolítica, celulolítica e lipolítica), da Coleção de
83 Culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE, e UNB1216 de *Xanthomonas*
84 *campestris* pv. *viticola* Nayudu (proteolítica), cedido pela Universidade de Brasília.

85 Para produção do polissacarídeo levana, o crescimento bacteriano foi semeado no
86 centro da placa de Petri contendo o meio ágar nutritivo-sacarose, incubado em
87 Biochemistry Oxygen Demand (B.O.D.) a temperatura de 30 °C e avaliado após três dias.
88 O isolado IBSBF 451 de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, cedido pela
89 Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, foi utilizado como padrão
90 positivo. A produção de colônias grandes, usualmente brancas, mucóides e elevadas,
91 indicaram a produção de levana (Mariano *et al.*, 2005).

92 Na determinação da produção do ácido indol-acético (AIA), um fitohormônio do
93 grupo das auxinas, foi utilizado o método colorimétrico adaptado por Cattelan (1999) no
94 qual as bactérias foram transferidas para placas de Petri contendo meio TSA (Tryptic soy
95 agar) 1/10 enriquecido com 1,021 g de L-triptofano e cobertas com uma membrana de
96 nitrocelulose de 0,45mm de porosidade (Millipore,USA) por 24 h, a 30 °C. Após este
97 período, a membrana foi removida para outra placa, saturada com a solução de Salkowski
98 e mantida a temperatura ambiente (27 ± 2 °C). O isolado GW2103 de *Chryseobacterium*
99 (*Flavobacterium*) *indologenes* (Yabuuchi & Vandamme), cedido pelo Centro Nacional de

100 Pesquisa da Soja-EMBRAPA, foi utilizado como padrão positivo. O resultado positivo foi
101 caracterizado pela formação de halo avermelhado na membrana, no local correspondente a
102 colônia, no período entre 30 min e 2 h.

103 Na avaliação da produção da toxina siringomicina, o crescimento bacteriano foi
104 depositado em quatro pontos equidistantes da placa de Petri contendo o meio ágar
105 nutritivo-extrato de levedura-dextrose e as placas foram mantidas em B.O.D. por 48 h a 30
106 °C. Após esse período, uma suspensão de 10^6 conídios ml^{-1} do fungo *Geotrichum*
107 *candidum* Link. exPers com seis dias de cultivo foi pulverizada com atomizador manual
108 por toda a superfície do meio, sendo a mesma tampada, selada com filme PVC e incubada
109 por um período de 48 h. O padrão positivo utilizado foi o isolado IBSBF 451 de *P.*
110 *syringae* pv. *syringae*. A presença de halo (não crescimento do fungo) em torno da colônia
111 bacteriana indicou o teste positivo para siringomicina, conforme descrito por Sinden *et al.*
112 (1971).

113 Todos os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* produziram enzimas lipolíticas
114 (Tabela 1) assemelhando-se ao verificado por Schaad *et al.* (1978) na descrição do isolado
115 tipo da subespécie e verificado de maneira geral para os isolados de *A. avenae* subsp.
116 *citrulli* (Somodi *et al.*, 1991). As enzimas lipolíticas degradam os lipídios presentes na
117 membrana das células da planta em ácidos graxos, os quais são utilizados pelos
118 fitopatógenos nas atividades metabólicas (Pascholati, 1995).

119 A produção de enzimas celulolíticas não foi detectada nos 41 isolados testados
120 (Tabela 1), diferindo do observado por Burdman *et al.* (2005) em relação a 12 isolados
121 dessa bactéria, onde todos apresentaram atividade celilolítica. As celulases atuam na
122 degradação da celulose, principal componente estrutural das paredes celulares vegetais
123 (Pascholati, 1995), liberando compostos necessários ao desenvolvimento do
124 microrganismo.

125 Nenhum dos isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* apresentou atividade pectinolítica
126 (Tabela 1), embora Burdman *et al.* (2005) tenham detectado fraca atividade pectinolítica
127 em 12 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* de meloeiro e melanciaeira oriundos de Israel. A
128 produção de enzimas pectinolíticas por *A. avenae* subsp. *citrulli* pode não ter sido
129 verificada no presente trabalho por diferença de métodos utilizados. Sabe-se que as
130 enzimas pectinolíticas são responsáveis pela degradação dos tecidos parenquimatosos
131 causando sintomas de podridão-mole, no entanto, o papel dessas enzimas na virulência de
132 *A. avenae* subsp. *citrulli* necessita ser investigado.

133 Os isolados também não apresentaram atividade amilolítica ou proteolítica (Tabela
134 1). Somodi *et al.* (1991) e Burdman *et al.* (2005) não detectaram produção de enzimas
135 amilolíticas por isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*, porém Burdman *et al.* (2005)
136 verificaram uma fraca atividade proteolítica. Diversos fitopatógenos produzem enzimas
137 que degradam o amido, principal polissacarídeo de reserva nas células vegetais, em
138 glicose, a qual é utilizada como substrato em atividades metabólicas (Pascholati, 1995). Já
139 as enzimas proteolíticas agem, provavelmente, sobre as glicoproteínas da parede celular,
140 proteínas de defesas elicidadas ou quitinases (Kyöstiö *et al.*, 1991).

141 O polissacarídeo levana não foi produzido pelos isolados de *A. avenae* subsp.
142 *citrulli* (Tabela 1). Melo *et al.* (2004) caracterizando 12 isolados dessa bactéria, oriundos
143 de meloeiro, verificaram que nenhum produziu esse polissacarídeo. Segundo Rudolph
144 (1995) a levana está envolvida no congestionamento de água nos espaços intercelulares dos
145 tecidos infectados das plantas, promovendo o sintoma de encharcamento.

146 Todos os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* produziram ácido indol-acético, não
147 havendo referência na literatura sobre a produção desse fitohormônio por esta bactéria.
148 Segundo Pascholati (1995) o papel das substâncias de crescimento produzido por
149 patógenos ainda não é bem compreendido.

150 Nenhum isolado produziu siringomicina, o que era esperado, desde que esta toxina
151 é comumente produzida por patovares de *Pseudomonas syringae* van Hall (Bender, 1999).
152 No entanto, bactérias fluorescentes também podem ser isoladas de lesões similares as da
153 mancha-aquosa (R. L. R. Mariano, dados não publicados; Somodi *et al.*, 1991) e com base
154 nos resultados do presente trabalho, além da produção de fluorescência em meio de King
155 B, a produção de siringomicina pode ser utilizada como um teste diferencial entre *A.*
156 *avenae* subsp. *citrulli* e *P. syringae*. A siringomicina tem propriedades antibacterianas,
157 antifúngicas e fitotóxicas e apesar de não ter sido produzida pelos isolados de *A. avenae*
158 subsp. *citrulli* testados, Hu & Young (1998) relataram que outros isolados dessa bactéria
159 produziram substâncias com atividade antifúngica contra *Rhodotorula mucilaginosa*
160 Harrison.

161 Os resultados obtidos permitem concluir que os isolados de *A. avenae* subsp.
162 *citrulli* produziram enzimas lipolíticas e o fitohormônio ácido indol-acético, e não
163 produziram enzimas pectinolíticas, amilolíticas, celulolíticas e proteolíticas, o
164 polissacarídeo levana e a toxina siringomicina, indicando que não há diversidade na
165 população estudada em relação a essas características.

166

167

AGRADECIMENTOS

168 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
169 Tecnológico (CNPq, Proc 551.198/2002-8) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia
170 do Estado de Pernambuco (FACEPE, APQ 23-CAG-03/ 2001-01/01-24) pela concessão
171 de bolsa e auxílio financeiro.

172

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 173
- 174 BENDER, C.L., ALARCON, C.F. & GROSS, D.C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins:
175 mode of action, regulation and biosynthesis by peptide and polyketide synthases.
176 Microbiology and Molecular Biology Reviews 63:226-292. 1999.
- 177 BURDMAN, S., KOTS, N., KRITZMAN, G. & KOLEPOWITZ, J. Molecular,
178 physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates
179 from watermelon and melon in Israel. Plant Disease 89:1339-1347. 2005.
- 180 CATELLAN, A.J. Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e
181 fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Londrina.
182 EMBRAPA Soja. 1999.
- 183 HU, F.P. & YOUNG, J.M. Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*,
184 *Herbaspirillum*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* spp. Journal of Applied Microbiology
185 84:263-271. 1998.
- 186 KYÖSTIÖ, S.R.M., CRAMER, C.L. & LACY, G.H. *Erwinia carotovora* subsp.
187 *carotovora* extracellular protease: characterization and nucleotide sequence of the gene.
188 Journal of Bacteriology 173:6537-6547. 1991.
- 189 MARIANO, R.L.R., SILVEIRA, E.B., ASSIS, S.M.P. & GOMES, A.M.A. Identificação
190 de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano, R.L.R. & Silveira, E.B. (Coords.) Manual de
191 práticas em Fitobacteriologia. 2. ed. Recife. R.L.R. Mariano. 2005. pp. 67-111.
- 192 MELO, L.A.; MENDES, A.P.; SANTOS, J.P. & MARQUES, A.S.A. Mancha-aquosa do
193 melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*: caracterização de isolados. Brasília:
194 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 24p. (Boletim de Pesquisa e
195 Desenvolvimento, 70).

- 196 O'BRIEN, R. G. & MARTIN, A. L. Bacterial blotch of melons caused by strains of
197 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Australian Journal of Experimental Agriculture 39:
198 479-485.1999.
- 199 PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: Arsenal Enzimático. In: Bergamin Filho, A.,
200 Amorim, L. & Kimati, H. (Eds). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 3. ed.
201 São Paulo. Agronômica Ceres. 1995. v.1. pp. 343-364.
- 202 RUDOLPH, K.W.E. *Pseudomonas syringae* pathovars. In: Singh, V.S., Singh, R.P. &
203 Kohmoto, K. (Eds.). Pathogenesis and host specificity in plant disease: Hystopathological,
204 Biochemical, Genetic and molecular bases. Amsterdam. Elsevier Science. v.1. 1995. pp.
205 47-138.
- 206 SCHAAD, N.W., SOWELL, G., GOTH, R.W., COLWELL, R.R. & WEBB, R.E.
207 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* nov. International Journal of Systematic
208 Bacteriology. 28:117-125. 1978.
- 209 SINDEN, S., DEVAY, J. & BACKMAN, P. Properties of syringomycin, a wide spectrum
210 antibiotic and phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae* and its role in the bacterial
211 canker disease in peach tree. Physiology Plant Patology 1:199-213. 1971.
- 212 SOMODI, G.C., JONES, J.B., HOPKINS, D.L., STALL, R.E., KUCHARÉK, T.A.,
213 HODGE, N.C. & WATTERSON, J.C. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in
214 Florida. Plant Disease 75:1053-1056. 1991.
- 215 WALCOTT, R.R.; FESSEHAIE, A. & CASTRO, A.C. Differences in pathogenicity
216 between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit
217 host. Journal of Phytopathology 152: 277-285. 2004.
- 218 WIEBE, W.L.; HOPKINS, D.L. & WALCOTT, R.R. Bacterial Fruit Blotch - Questions
219 and answers with the experts. Bulletin, 2004. 12 p. Disponível em:
220 <www.seedquest.com/vegetables/watermelon/pdf/bfb.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2006.

TABELA 1 – Produção de enzimas, polissacarídeo, fitohormônio e toxina¹ por isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac), obtidos de sementes e frutos de meloeiro, melanciaira* e melão-pepino**.

Isolados	Enzima					Fitohormônio	Polissacarídeo	Toxina
	Pectinolítica	Amilolítica	Lipolítica	Celulolítica	Proteolítica	Ácido indol-acético	Levana	Siringomicina
Aac1	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.5	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.12	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.31	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.35	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.36	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.37	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.39	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.40	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.43	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.45	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.49	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.50	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.70	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.71	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.72	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.73	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.78	-	-	+	-	-	+	-	-
AacMP1**	-	-	+	-	-	+	-	-
AacMP2**	-	-	+	-	-	+	-	-
AacR2	-	-	+	-	-	+	-	-
AacR3	-	-	+	-	-	+	-	-
AacR7	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac4.9	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac5.1	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac5.3	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac5.16	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac5.20	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac5.28	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.83	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1213*	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1214*	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac180*	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1225	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1627	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1.84	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac1521	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac8	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac14	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac12	-	-	+	-	-	+	-	-
Aac9	-	-	+	-	-	+	-	-

¹sinal positivo (+) indica presença e sinal negativo (-) indica ausência de produção de enzima, fitohormônio, polissacarídeo ou toxina

Capítulo III

Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

1 **CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli****

2
3 **JANAÍNA C. DE OLIVEIRA^{1**}, ELINEIDE B. SILVEIRA², ROSA L. R.**

4 **MARIANO^{1**} & ENILDO CARDOSO¹**

5
6 ¹Departamento de Agronomia/Fitossanidade; ²Departamento de Biologia/Microbiologia, e-
7 mail:elineidebs@yahoo.com.br; Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE,
8 52171-030, Recife, PE.
9

10 (Aceito para publicação em / /)

11
12 Autor para correspondência: Elineide B. Silveira
13

14 OLIVEIRA, J.C., SILVEIRA, E.B., MARIANO, R.L.R. & CARDOSO, E. Caracterização
15 de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Fitopatologia Brasileira.
16

17 **RESUMO**

18 O objetivo dessa pesquisa foi caracterizar 41 isolados de *Acidovorax avenae*
19 subsp. *citrulli* com base na severidade da doença em plântulas, plantas e frutos de meloeiro
20 (*Cucumis melo*) e melanciaira (*Citrullus lanatus*), reação de hipersensibilidade em fumo
21 (*Nicotiana tabacum*), utilização de aminoácidos como fonte de carbono e energia e
22 sensibilidade *in vitro* a cúpricos e antibióticos. Todos os isolados induziram sintomas
23 típicos da mancha-aquosa em plântulas, plantas e frutos de meloeiro e melanciaira. Pelo
24 teste de agrupamento de Scott-Knott (P = 0,05) os isolados foram separados quanto ao

* Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco. (2006)

** Bolsista do CNPq

25 índice de doença em 5 e 7 grupos, respectivamente para plântulas de meloeiro e
26 melanciaira, e em 2 grupos para plantas das duas hospedeiras. Em frutos, os isolados foram
27 separados em 3 e 10 grupos para a variável diâmetro da lesão externa e 2 e 9 grupos para
28 profundidade da lesão, respectivamente para meloeiro e melanciaira. Todos os isolados
29 também induziram reação de hipersensibilidade em fumo; utilizaram os aminoácidos
30 asparagina, L-leucina e DL-ácido láctico; foram sensíveis a oxiclreto de cobre ($120 \mu\text{g ml}^{-1}$)
31 ¹), óxido cuproso ($120 \mu\text{g ml}^{-1}$), hidróxido de cobre ($138,2 \mu\text{g ml}^{-1}$), sulfato de
32 estreptomicina ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) e Agrimaicin 500 ($428 \mu\text{g ml}^{-1}$); e resistentes a kasugamicina
33 ($87 \mu\text{g ml}^{-1}$), agrimicina ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$), eritromicina (15 μg), gentamicina (10 μg),
34 amoxicilina (10 μg), neomicina (30 μg), estreptomicina (10 μg), norfloxacina (10 μg) e
35 rifampicina (5 μg). Foi constatada variabilidade entre os 41 isolados de *A. avenae* subsp.
36 *citrulli* quanto a sensibilidade à tetraciclina (30 μg), sendo 41,5% resistentes, 46,3%
37 moderadamente sensíveis e 12,2% altamente sensíveis.

38 **Palavras-chave adicionais:** mancha-aquosa, *Cucumis melo*, *Citrullus lanatus*,
39 aminoácidos, hipersensibilidade, cúpricos, antibióticos

40

41 **ABSTRACT**

42 **Characterization of strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli***

43 This work aimed to characterize 41 isolates of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*
44 based upon disease severity on seedlings, plants and fruits of melon and watermelon
45 (*Citrullus lanatus*), hypersensitivity in tobacco (*Nicotiana tabacum*), utilization of amino
46 acids as carbon and energy sources, and *in vitro* sensitivity to copper and antibiotics. All
47 isolates induced typical symptoms of fruit blotch on seedlings, plants and fruits of melon
48 and watermelon. The Scott-Knott test ($P = 0.05$) separated the isolates for disease index
49 in 5 and 7 groups respectively for melon and watermelon seedlings and 2 groups for plants

50 of these two hosts. In fruits all isolates were separated in 3 and 10 groups for the variable
51 diameter of extern lesion and 2 and 9 groups for lesion depth, respectively for melon and
52 watermelon. All isolates also induced hypersensitivity in tobacco; utilized the amino acids
53 asparagine, L-leucine and DL-acid lactic; showed sensitivity to copper oxychloride (120
54 $\mu\text{g ml}^{-1}$), cuprous oxide (120 $\mu\text{g ml}^{-1}$), copper hydroxide (138.2 $\mu\text{g ml}^{-1}$), streptomycin
55 sulfate (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and Agrimaicin 500 (428 $\mu\text{g ml}^{-1}$); and resistance to kasugamycin (87
56 $\mu\text{g ml}^{-1}$), agrimicin (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$), erythromycin (15 μg), gentamicin (10 μg), amoxicilin
57 (10 μg), neomycin (30 μg) streptomycin (10 μg), norfloxacin (10 μg) and rifampicin (5
58 μg). Variability was found among the 41 isolates in relation to tetracycline (30 μg), 41.5%
59 were resistant, 46.3 moderately sensitive and 12.2% highly sensitive.

60 **Additional key-words:** fruit-blotch, *Cucumis melo*, *Citrullus lanatus*, amino acids,
61 hypersensitivity, copper, antibiotics

62

63 INTRODUÇÃO

64 A mancha-aquosa, causada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad
65 *et al.*) Willems *et al.* (Sin: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* Schaad *et al.*; *P.*
66 *avenae* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*) Hu *et al.*, desde 1997 constitui problema econômico
67 para a cultura do meloeiro (*Cucumis melo* L.) no Nordeste do Brasil, nos estados do Rio
68 Grande do Norte e Ceará (Assis *et al.*, 1999), ocorrendo de forma epidêmica e ocasionando
69 perdas de até 100% (Sales Júnior & Menezes, 2001). Com pouca expressão econômica,
70 essa doença também foi detectada nos estados de Pernambuco, Bahia e Rio Grande do Sul
71 (Santos & Viana, 2000; Mariano *et al.*, 2004; Mariano & Silveira, 2004; Ueno *et al.*, 2003).

72 Em melanciaira (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum. & Nakai) a mancha-aquosa
73 foi relatada no Brasil em 1991 (Robbs *et al.*, 1991) nos municípios de Assis, Marília e
74 Presidente Prudente, no estado de São Paulo, e recentemente foi assinalada em Minas

75 Gerais (Macagnan *et al.*, 2003). Uma vez que essa cultura é hospedeira de *A. avenae* subsp.
76 *citrulli* e amplamente cultivada no Nordeste, existe risco potencial de estabelecimento da
77 doença, a exemplo dos Estados Unidos e outros países onde a mancha-aquosa tem grande
78 importância econômica (Walcott *et al.*, 2004).

79 O controle da mancha-aquosa é baseado principalmente no uso de sementes sadias,
80 tratamento químico e físico de sementes, proteção da planta com fungicidas cúpricos,
81 rotação de culturas, erradicação de plantas doentes e cucurbitáceas silvestres, além do não
82 plantio em áreas contaminadas, úmidas e em épocas chuvosas (Santos & Viana, 2000;
83 Viana *et al.*, 2000). Outras estratégias de controle já testadas foram seleção de cultivares
84 resistentes (Hopkins *et al.*, 1993) e controle biológico (Medeiros *et al.*, 2003). Apesar da
85 utilização de todas essas medidas, o controle da doença é pouco eficiente, indicando a
86 necessidade de um maior conhecimento sobre esse patossistema, incluindo estudos sobre
87 as populações de *A. avenae* subsp. *citrulli*.

88 A caracterização das populações de um patógeno pode determinar o potencial de
89 adaptação do organismo às diferentes condições ambientais ou do hospedeiro, sendo um
90 importante subsídio para que medidas eficientes sejam estabelecidas no manejo de
91 doenças. Adaptação a diferentes genótipos do hospedeiro, resposta a químicos, biologia do
92 microrganismo e componentes epidemiológicos da doença são os tipos de variabilidade
93 mais freqüentemente pesquisadas em populações de fitopatógenos (Brown, 1998).

94 Trabalhos envolvendo a caracterização de isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*,
95 quanto a componentes epidemiológicos (Silveira *et al.*, 2003), utilização de substratos
96 como fonte de carbono (Walcott *et al.*, 2004; Burdman *et al.*, 2005) e reação de
97 hipersensibilidade (Somodi *et al.*, 1991; Rane & Latin, 1992; Silveira *et al.*, 2003) já foram
98 realizados. No entanto, pesquisas mais aprofundadas sobre esses aspectos e

99 estudos em novas populações do patógeno na região Nordeste são necessárias para um
100 melhor manejo da doença.

101 Este trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*
102 com base na severidade da doença em plântulas, plantas e frutos de meloeiro e melanciaira;
103 reação de hipersensibilidade em fumo (*Nicotiana tabacum* L.); utilização de aminoácidos
104 como fonte de carbono e energia; e sensibilidade *in vitro* a cúpricos e antibióticos.

105

106

MATERIAL E MÉTODOS

107 Em todos os experimentos foram utilizados 41 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*
108 pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade
109 Federal Rural de Pernambuco (Tabela 1). As suspensões bacterianas foram ajustadas em
110 fotocolorímetro (560 nm) à concentração de $3,4 \times 10^7$ UFC ml⁻¹ de acordo com equação
111 previamente estabelecida.

112

113 **Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* com base na** 114 **severidade da mancha-aquosa**

115 Para avaliar a severidade em plântulas, sementes de meloeiro tipo Amarelo, híbrido
116 AF-646 e melanciaira ‘Crimson Sweet’ foram inoculadas com suspensão de cada isolado
117 de *A. avenae* subsp. *citrulli* contendo Tween 20 (0,005%), pelo método de infiltração à
118 vácuo (Assis & Mariano, 2005). Decorridas 12 horas, as sementes foram plantadas em
119 bandejas de isopor (poliestireno expandido) contendo a mistura solo: substrato Plantmax[®]
120 (2:1 v:v), e mantidas em casa de vegetação a temperatura média de 30 ± 2 °C. Após
121 emergência, as plântulas foram submetidas à câmara úmida por 48 h. O delineamento
122 experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo a unidade
123 experimental constituída por dez plântulas. As plântulas foram avaliadas nove dias após o

124 plantio quanto à severidade estimada com o auxílio de escala descritiva de 0 a 5 (Araújo *et*
125 *al.*, 2005), sendo o índice de doença (IDO), calculado de acordo com McKinney (1923),
126 pela fórmula $IDO = \frac{\sum (\text{grau da escala} \times \text{frequência})}{n^{\circ} \text{ total de unidades} \times \text{grau}}$
127 máximo da escala.

128 Para avaliação da severidade da mancha-aquosa em plantas, folhas definitivas de
129 plantas de meloeiro tipo Amarelo, híbrido AF-646 e melancieira ‘Crimson Sweet’ com 20
130 dias de cultivo em recipientes plásticos de 250 ml contendo a mistura solo: substrato
131 Plantmax[®] (2:1 v:v), foram pulverizadas com a suspensão de cada isolado contendo Tween
132 20 (0,005%). As plantas foram submetidas à câmara úmida por 48 h antes e após a
133 inoculação, sendo mantidas em casa de vegetação (30 ± 2 °C). O delineamento
134 experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo a unidade
135 experimental constituída por duas folhas da planta. As plantas foram avaliadas cinco dias
136 após a inoculação quanto à severidade, utilizando uma escala descritiva com notas
137 variando de 0 a 6 (Silveira *et al.*, 2003), sendo calculado o IDO (McKinney, 1923).

138 A inoculação em frutos comerciais de meloeiro e melancieira foi realizada pelo
139 método de injeção subepidérmica com suspensão de cada isolado de *A. avenae* subsp.
140 *citrulli* (Somodi *et al.*, 1991). Os frutos foram submetidos a câmara úmida por 48 h e
141 mantidos em incubadora tipo B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) a 30 °C durante oito
142 (melão) ou cinco dias (melancia). O delineamento experimental foi inteiramente
143 casualizado, com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por três
144 pontos de inoculação. Os frutos foram avaliados quanto ao diâmetro da lesão externa
145 (DLE) e profundidade da lesão (PL), medidos com o auxílio de um paquímetro.

146 Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias
147 comparadas pelo teste de Scott-Knott (P=0,05).

148

149 **Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* com base na reação de**
150 **hipersensibilidade**

151 As suspensões dos 41 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* foram infiltradas nos
152 espaços intercelulares da região contida entre duas nervuras laterais, na face dorsal das
153 folhas expandidas de fumo (cultivar NC-95). Após a infiltração, as plantas foram mantidas
154 em ambiente com baixa umidade relativa do ar. A avaliação foi realizada 24 h após o teste,
155 sendo a reação de hipersensibilidade caracterizada por necrose e dessecamento do tecido
156 da região infiltrada (Mariano, 2005).

157

158 **Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* com base na utilização**
159 **de aminoácidos**

160 Um pouco do crescimento bacteriano foi depositado, com alça de platina, em tubos
161 de ensaio com tampa de rosca contendo 4,5 ml de meio de clara basal (0,5 g de
162 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g de KH_2PO_4 e 1000 ml de água destilada) acrescido dos aminoácidos
163 asparagina, L-leucina ou DL-ácido lático a 10%, os quais foram adicionados por filtração
164 ao meio já autoclavado (Mariano *et al.*, 2005). Os isolados foram incubados em B.O.D. a
165 30 °C e avaliados após 48 h quanto à turvação do meio, indicativo da utilização do
166 aminoácido como única fonte de carbono e energia.

167

168 **Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* com base na**
169 **sensibilidade *in vitro* a cúpricos e antibióticos**

170 Os produtos comerciais oxiclureto de cobre ($120 \mu g ml^{-1}$); óxido cuproso ($120 \mu g$
171 ml^{-1}); hidróxido de cobre ($138,2 \mu g ml^{-1}$); sulfato de estreptomicina ($25 \mu g ml^{-1}$);
172 kasugamicina (2% de cloridrato de kasugamicina) ($87 \mu g ml^{-1}$); agrimaicin 500 (3% de
173 oxitetraciclina e 50% de sulfato tribásico de cobre) ($428 \mu g ml^{-1}$) e agrimicina (1,5% de

174 oxitetraciclina e 15% de sulfato de estreptomicina) ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) foram diluídos em 4,5 ml
175 de ADE, agitados por três minutos no agitador para tubos tipo Vortex e adicionados ao
176 meio ágar nutritivo-extrato de levedura-dextrose (NYDA). Os cúpricos foram adicionados
177 ao meio antes de sua autoclavagem. Alíquotas de 5 μl das suspensões bacterianas foram
178 depositadas em quatro pontos equidistantes da placa de Petri contendo NYDA
179 suplementado com os produtos nas concentrações acima citadas. As placas foram mantidas
180 em B.O.D. ajustada para $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 72 h. A avaliação foi realizada
181 considerando-se como sensíveis isolados que não apresentaram crescimento confluyente.

182 Foram também testados os seguintes antibióticos em discos: amoxicilina (10 μg);
183 eritromicina (15 μg); estreptomicina (10 μg); gentamicina (10 μg); neomicina (30 μg);
184 norfloxacina (10 μg); rifampicina (5 μg) e tetraciclina (30 μg) através do método de
185 difusão em ágar (Madigan *et al.*, 1997). Alíquotas de 3 ml das suspensões dos 41 isolados
186 de *A. avenae* subsp. *citrulli* foram depositadas em 100 ml de meio NYDA semi-sólido
187 vertido sobre uma fina camada de meio ágar - água (2%), contida em placas de Petri. Após
188 a solidificação, os discos dos antibióticos foram colocados em quatro pontos equidistantes
189 da placa de Petri, as quais foram mantidas em B.O.D. a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 24 h. O
190 delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada
191 repetição constituída por um disco de antibiótico. A avaliação foi realizada através da
192 medição do halo de inibição do crescimento bacteriano, em dois sentidos diametralmente
193 opostos, com o auxílio de um paquímetro. Os isolados foram classificados em três grupos,
194 de acordo com as reações de resistência (halo $\leq 14 \text{ mm}$), sensibilidade média ($14 \text{ mm} <$
195 halo $< 20 \text{ mm}$) e sensibilidade alta (halo $\geq 20 \text{ mm}$), estabelecidos conforme valores médios
196 dos halos de inibição referentes a cada antibiótico (Acar & Goldstein, 1986).

197 Os isolados foram agrupados quanto aos níveis de similaridade, com base na
198 sensibilidade aos antibióticos mensurada pelo tamanho do halo de inibição, pela análise da
199 distância Euclidiana por ligações simples.

200

201 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

202 Foram constatadas diferenças significativas ($P = 0,05$) entre os isolados quanto ao
203 índice de doença, permitindo a separação em 5 e 7 grupos em plântulas, respectivamente
204 para meloeiro e melanciaira, e 2 grupos em plantas para as duas hospedeiras. Os índices
205 variaram para meloeiro e melanciaira, respectivamente de 5 a 77% e 3,7 a 100% em
206 plântulas e de 3,1 a 20,6% e 3,1 a 29% em plantas (Tabela 2). O'Brien & Martin (1999)
207 também obtiveram diferentes níveis de severidade da mancha-aquosa em plântulas para
208 uma mesma cultivar de meloeiro ou de melanciaira quando inoculados com diferentes
209 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*. Os sintomas da mancha-aquosa em plântulas se
210 caracterizaram por extensas manchas encharcadas que progrediram para verde-escuras e
211 marrons nos cotilédones e às vezes no hipocótilo, e em plantas, por manchas pequenas nas
212 folhas, com aspecto oleoso, coloração verde-clara a marrom-escura.

213 Em plântulas e plantas de meloeiro e melanciaira todos os isolados de *A. avenae*
214 subsp. *citrulli* causaram sintomas típicos da mancha-aquosa, inclusive os de melão-pepino
215 (*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud.) (AacMP1 e AacMP2) (Tabela 2). Contudo,
216 O'Brien & Martin (1999) estudando a patogenicidade de dois isolados de *A. avenae* subsp.
217 *citrulli*, obtidos de melanciaira, a plântulas de duas cultivares de melanciaira e duas de
218 meloeiro, verificaram que um isolado da bactéria não causou sintomas ao meloeiro.

219 Em plântulas de melanciaira, a média dos índices da mancha-aquosa dos 3 isolados
220 provenientes de melanciaira foi de 97,7%, enquanto que os outros 36 isolados de meloeiro
221 foram muito menos agressivos (média de índice de doença = 23,2%) (Tabela 2). O mesmo

222 aconteceu em menor escala em plântulas de meloeiro, nas quais os isolados provenientes
223 de meloeiro induziram índice médio de doença de 34,3% comparado aos 23,9% de
224 melancieira. Isto demonstrou uma especificidade patógeno-hospedeiro, também relatada
225 por Burdman *et al.* (2005).

226 Uma menor agressividade da maioria dos isolados de meloeiro a plântulas de
227 melancieira observada neste trabalho pode explicar porque *A. avenae* subsp. *citrulli* ainda
228 não foi assinalada em campos de produção de melancia no Nordeste, constituindo
229 problema econômico apenas para meloeiro. O'Brien & Martin (1999) e Walcott *et al.*
230 (2004) também verificaram fato similar com isolados de melancieira em relação à cultura
231 do meloeiro. Contudo, a cultura da melancieira é susceptível a isolados de *A. avenae* subsp.
232 *citrulli* oriundos de melão, o que pode representar risco potencial em propriedades
233 agrícolas produtoras de melão e melancia, prática frequentemente observada no pólo
234 agrícola Mossoró-Baraúna.

235 Em frutos, todos os isolados foram patogênicos as duas culturas, sendo separados
236 em 3 e 10 grupos para diâmetro da lesão externa e 2 e 9 grupos para profundidade da lesão
237 em meloeiro e melancieira, respectivamente, de acordo com a análise de agrupamento de
238 Scott-Knott ($P = 0,05$) (Tabela 2). Os sintomas nos frutos se caracterizaram por pequenas
239 manchas verde-claras e oleosas que progrediram para marrom-claras a marrom-escuras,
240 atingindo grande extensão da superfície, ocorrendo internamente podridão seca marrom-
241 avermelhada da polpa. Esse comportamento diferiu do que foi assinalado para *A. avenae*
242 subsp. *citrulli* onde o isolado tipo da subespécie (*P. pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*),
243 aparentemente só causa lesão em plântulas, e sintomas nos frutos não são observados
244 (Saddler, 1994).

245 Aos oito dias após inoculação, o diâmetro médio das lesões em frutos de meloeiro
246 foi de 14,2 mm enquanto a profundidade média atingiu 13,7 mm. Em pesquisa similar com

247 20 isolados também incluídos no presente estudo, Silveira *et al.* (2003) verificaram que o
248 diâmetro médio das lesões em meloeiro foi de 13,5 mm, enquanto a profundidade média
249 atingiu 9,7 mm. Em frutos de melancia, o diâmetro médio das lesões foi de 6,9 mm e a
250 profundidade média atingiu 13,1 mm aos cinco dias após inoculação. Somodi *et al.* (1991)
251 verificaram em frutos de melancia lesões de até 94 mm de diâmetro aos 14 dias após
252 inoculação. Verificou-se que 97,6% dos isolados induziram maior PL do que DLE em
253 frutos de melancia comparado a 53,7% em meloeiro. Em geral, frutos infectados
254 naturalmente apresentam a polpa já bastante comprometida mesmo quando a lesão externa
255 se mostra com apenas alguns centímetros de diâmetro (O'Brien & Martin, 1999).

256 Dos 41 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* avaliados, todos induziram reação de
257 hipersensibilidade em fumo. Na literatura existem controvérsias quanto a essa
258 característica. De acordo com a descrição do isolado tipo, a subespécie não induz
259 hipersensibilidade em fumo (Schaad *et al.*, 1978), contudo reações positivas foram obtidas
260 com isolado de melancia por Rane & Latin (1992) e Somodi *et al.* (1991) e isolados de
261 meloeiro por Silveira *et al.* (2003). Esses últimos autores avaliaram 20 isolados incluídos
262 no presente estudo, os quais tiveram essa reação positiva confirmada.

263 Os aminoácidos asparagina, L-leucina e DL- ácido lático foram utilizados por todos
264 os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* como fonte de carbono e energia. Walcott *et al.*
265 (2004), estudando dois grupos geneticamente distintos de *A. avenae* subsp. *citrulli* quanto
266 a utilização de aminoácidos, utilizando o sistema BIOLOG[®], verificaram que os isolados
267 do Brasil Aac1, Aac1.5, Aac1.12 e AacR2 utilizaram asparagina, apenas Aac R2 não
268 utilizou o DL- ácido lático e nenhum deles L-leucina. O resultado diferente constatado no
269 presente trabalho em relação a esses isolados pode ter ocorrido em função do método
270 utilizado. O'Brien & Martin (1999) e Burdman *et al.* (2005) também verificaram
271 comportamento diferente entre isolados dessa bactéria quanto à utilização de L-leucina.

272 Segundo esses últimos autores L-leucina pode ser utilizada para separar isolados de *A.*
273 *avenae* subsp. *citrulli* de melanciaira (L-leucina positivo) de outras cucurbitáceas (L-
274 leucina negativo),o que difere do constatado na presente pesquisa e dos resultados de
275 O'Brien & Martin (1999).

276 Todos os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* foram sensíveis a oxiclreto de cobre
277 ($120 \mu\text{g ml}^{-1}$), óxido cuproso ($120 \mu\text{g ml}^{-1}$), hidróxido de cobre ($138,2 \mu\text{g ml}^{-1}$), sulfato de
278 estreptomicina ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) e Agrimaicin ($428 \mu\text{g ml}^{-1}$), e resistentes a kasugamicina (87
279 $\mu\text{g ml}^{-1}$) e agrimicina ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$). Sales Júnior *et al.* (2005) utilizando concentrações
280 diferentes dos produtos, relataram a eficiência de kasugamicina (700 ppm) na inibição *in*
281 *vitro* do crescimento de *A. avenae* subsp. *citrulli*, e de oxiclreto de cobre (1250 ppm),
282 kasugamicina (70 ppm), kasugamicina + oxiclreto de cobre (40+1250 ppm) e sal de
283 oxitetracina (82 ppm) na redução da incidência da mancha-aquosa em frutos no campo.
284 Walcott *et al.* (2004) verificaram que isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* de meloeiro e
285 melanciaira, provenientes de vários países, apresentaram sensibilidade diferente ao sulfato
286 de cobre. Os isolados de meloeiro oriundos do Rio Grande do Norte-Brasil Aac1.5,
287 Aac1.12 e AacR2 foram resistentes ao produto e Aac1 foi sensível.

288 A detecção da sensibilidade dos isolados a maioria dos produtos testados é
289 importante para a eficiência do controle da mancha-aquosa, uma vez que se recomenda
290 para o tratamento de sementes: estreptomicina por 16 h ($1,0 \text{ mg ml}^{-1}$) (Sowell & Schaad,
291 1979); sulfato de estreptomicina 0,1% por 30 min.; sulfato de estreptomicina 0,1% +
292 solução salina 1,5% por 30 min.; Bion 0,01% (acibenzolar-S-metil) por 20 min. (Moraes *et*
293 *al.*, 2002); Bion 0,01%, sulfato de estreptomicina 0,1%, kasugamicina 0,1% e oxiclreto de
294 cobre 0,5%, isoladamente ou em mistura por 30 min. (Silva Neto *et al.*, 2003). Aplicações
295 quinzenais ou semanais com fungicidas cúpricos, iniciando-se antes ou durante a floração,

296 e se prolongando até a maturação dos frutos, são indicadas para reduzir as perdas
297 associadas com a doença no campo (Walcott *et al.*, 2001).

298 Baseado na classificação de Acar & Goldstein (1986) todos isolados de *A. avenae*
299 subsp. *citrulli* apresentaram resistência aos antibióticos eritromicina (15 µg), gentamicina
300 (10 µg), amoxicilina (10 µg), neomicina (30 µg), estreptomicina (10 µg), norfloxacin
301 (10 µg) e rifampicina (5 µg). Utilizando método diferente, Burdman *et al.* (2005)
302 verificaram que isolados dessa bactéria oriundos de meloeiro foram sensíveis a rifampicina
303 (40 µg ml⁻¹) enquanto isolados de melanciaira foram resistentes, podendo esse teste ser
304 utilizado para diferenciar isolados das duas culturas. No presente estudo, porém, não foi
305 possível separar isolados de meloeiro e melanciaira com base nessa característica.

306 Foi constatada variabilidade entre os 41 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* quanto
307 a sensibilidade à tetraciclina (30 µg), sendo 41,5% resistentes, 46,3% moderadamente
308 sensíveis e 12,2% altamente sensíveis. Embora os isolados tenham apresentado
309 características diferentes quanto à sensibilidade à tetraciclina, todos foram sensíveis a
310 Agrimaicin (428 µg ml⁻¹), que contém tetraciclina na forma de oxitetraciclina em sua
311 composição.

312 Baseada na sensibilidade aos antibióticos, mensurada pelo tamanho do halo de
313 inibição, a análise da distância euclidiana por ligação simples permitiu a distinção de
314 quatro grupos de similaridade entre os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*, quando
315 considerada a distância de ligação 0,5. Os isolados Aac1.36 e Aac14 constituíram dois
316 grupos de similaridade distintos, enquanto Aac1.71 e Aac1521 formaram mais um grupo, e
317 os demais isolados formaram um único grupo de similaridade, confirmando a existência de
318 grupos com características distintas dentro da população (Figura 1).

319 De acordo com os resultados obtidos, em trabalhos futuros o teste de
320 patogenicidade em plântulas de melanciaira pode ser utilizado para caracterizar isolados de

321 *A. avenae* subsp. *citrulli* de meloeiro e melanciaira. Entretanto, a patogenicidade em
322 plantas e frutos de meloeiro e melanciaira e sensibilidade *in vitro* a tetraciclina também
323 podem ser considerados indicadores de variabilidade.

324

325

AGRADECIMENTOS

326 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
327 Tecnológico (CNPq, Proc 551.198/2002-8) e Fundação de Amparo à Ciência e tecnologia
328 do Estado do Pernambuco (FACEPE, APQ 23-CAG-03/ 2001-01/01-24) pela concessão
329 de bolsa e auxílio financeiro.

330

331

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

332 ACAR, J.F. & GOLDSTEIN, F.W. Disk susceptibility test. In: Rorian, V. (ed.) Antibiotics
333 in laboratory medicine. London. Willians & Wilkins. 1986. v.1, pp.27-62.

334 ARAÚJO, D.V., MARIANO, R.L.R. & MICHEREFF, S.J. Métodos de inoculação de
335 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em melão. Summa Phytopathologica 31:69-73. 2005.

336 ASSIS, S.M.P. & MARIANO, R.L.R. Inoculação de bactérias fitopatogênicas. In:
337 Mariano, R.L.R, Silveira, E.B. (Coords.) Manual de práticas em Fitobacteriologia. 2.ed.
338 Recife. R.L.R. Mariano. 2005. pp.51-62.

339 ASSIS, S.M.P., MARIANO, R.L.R., SILVA-HANLIN, D.M.W. & DUARTE, V. Mancha-
340 aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, no Estado do Rio Grande
341 do Norte. Fitopatologia Brasileira 24:191. 1999.

342 BROWN, J.K.M. Surveys of variation in pathogen population and their applications to
343 disease control. In: Jones, C. (Ed). The epidemiology of plant disease. Dordrecht. Kluwer.
344 1998. pp.73-102.

- 345 BURDMAN, S., KOTS, N., KRITZMAN, G. & KOLEPOWITZ, J. Molecular,
346 physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates
347 from watermelon and melon in Israel. *Plant Disease* 89:1339-1347. 2005.
- 348 HOPKINS, D.L., THOMPSON, C.M. & ELMSTROM, G.W. Resistance of watermelon
349 seedlings and fruit to the fruit blotch bacterium. *HortScience* 28:22-123. 1993.
- 350 MACAGNAN, D, ROMEIRO, R.S., MENDONÇA, H.L., & BARRETO, R.W. Mancha
351 bacteriana da melancia: uma nova doença no estado de Minas Gerais. *Summa*
352 *Phytopathologica* 29:286-287. 2003 (Resumo).
- 353 MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. & PARKER, J. Brock biology of microorganisms.
354 8nd ed. New Jersey. Printice Hall. 1997.
- 355 MARIANO, R.L.R. Reação de hipersensibilidade em bactérias fitopatogênicas. In:
356 Mariano, R.L.R & Silveira, E.B. (Coords.) Manual de práticas em Fitobacteriologia. 2.ed.
357 Recife. R.L.R. Mariano. 2005. pp.63-64.
- 358 MARIANO, R.L.R., SILVEIRA, E.B., ASSIS, S.M.P. & GOMES, A.M.A. Identificação
359 de bactérias fitopatogênicas. In: Mariano, R.L.R. & Silveira, E.B. (Coords.) Manual de
360 práticas em Fitobacteriologia. 2. ed. Recife. R.L.R. Mariano. 2005. pp. 67-111.
- 361 MARIANO, R.L.R. & SILVEIRA, E.B. Mancha-aquosa: importante bacteriose do
362 meloeiro no Brasil. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. 1:79-88.
363 2004.
- 364 MARIANO, R.L.R, SILVA, V.A.V., SILVA, A.M.F., MEDEIROS, F.H.V. & VIANA,
365 I.O. Ocorrência da mancha-aquosa do melão na Bahia. *Fitopatologia Brasileira*. 29:S147-
366 S148. 2004 (Resumo).
- 367 McKINNEY, R.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat
368 seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*. 6:195-218.
369 1923.

- 370 MEDEIROS, F.H.V., MARIANO, R.L.R., FERREIRA, I.S.F., SILVA NETO, E.B.,
371 VIANA, I.O. Biological control of bacterial fruit blotch in melon. 6^a International PGPR
372 workshop. Session VII - Mechanisms of biological control, Calicut, Índia. 2003. pp. 510-
373 515.
- 374 MORAES, I.S.F., MEDEIROS, F.H.V., MARIANO, R.L.R. & VIANA, I. O. Proteção de
375 plantas de melão contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* mediada por *Bacillus* spp.
376 Fitopatologia Brasileira 27:S65-66. 2002 (Resumo).
- 377 O'BRIEN, R.G. & MARTIN, A.L. Bacterial blotch of melons caused by strains of
378 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Australian Journal of Experimental Agriculture 39:479-
379 485. 1999.
- 380 RANE, K.K. & LATIN, R.X. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the
381 pathogen with seed. Plant Disease 76:509-512. 1992.
- 382 ROBBS, C.F.; RODRIGUES NETO, J.; RAMOS, R.S. & SINIGAGLIA, C. Mancha
383 bacteriana da melancia no estado de São Paulo, causada por *Pseudomonas*
384 *pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*. Fitopatologia Brasileira 16:XLVIII. 1991 (Resumo).
- 385 SADDLER, G.S. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Imi. Descriptions of fungi and
386 bacteria n^o 1213. Mycopathologia 128:47-48. 1994.
- 387 SALES JÚNIOR, R. & MENEZES, J.B. Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e
388 viróticas do cultivo do melão no Estado do RN. Mossoró. Escola Superior de Agricultura de
389 Mossoró. 2001 (Relatório Técnico).
- 390 SALES JÚNIOR, R., OLIVEIRA, I.S., MARIANO, R.L.R., SILVA, G.F. & NUNES,
391 G.H.S. Efeito de kasugamicina e oxicleto de cobre no controle da mancha-aquosa do
392 meloeiro. Fitopatologia Brasileira 30:295-298. 2005.
- 393 SANTOS, A.A. & VIANA, F.M. Mancha-aquosa do melão. Fortaleza. EMBRAPA-SPI.
394 2000.

- 395 SCHAAD, N.W., SOWELL, G., GOTH, R.W., COLWELL, R.R. & WEBB, R.E.
396 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* nov. International Journal of Systematic
397 Bacteriology 28:117-125. 1978.
- 398 SILVA NETO, E.B. MEDEIROS, F.H.V.; MARIANO, R.L.R. & SILVEIRA, E.B.
399 Controle químico da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes. Fitopatologia
400 Brasileira 28:S340. 2003 (Resumo).
- 401 SILVEIRA, E.B; MARIANO, R.L.R. & MICHEREFF, S.J. Variabilidade de isolados de
402 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* provenientes de melão produzido no estado do Rio
403 Grande do Norte. Summa Phytopathologica 29:255-261. 2003.
- 404 SOMODI, G.C., JONES, J.B., HOPKINS, D.L., STALL, R.E., KUCHARREK, T.A.,
405 HODGE, N.C. & WATTERSON, J.C. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in
406 Florida. Plant Disease 75:1053-1056. 1991.
- 407 SOWELL, G. & SCHAAD, N.W. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on
408 watermelon: seed transmission and resistance of plant introductions. Plant Disease
409 Reporter 63:437-441. 1979.
- 410 UENO, B, COUTO, M.E.O, UESUGI, C.H. Ocorrência de mancha-aquosa em melão no
411 estado do Rio Grande do Sul. Fitopatologia Brasileira 28:S246. 2003 (Resumo).
- 412 VIANA, F.M.P., SANTOS, A.A., CARDOSO, J.E., FREIRE, F.C.O. & LOPES, C.A.
413 Surto da mancha-aquosa em frutos de melão nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte:
414 recomendações preliminares de controle. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical. 2000
415 (Comunicado Técnico, 50).
- 416 WALCOTT, R.R., FESSEHAIE, A. & CASTRO, A.C. Differences in pathogenicity
417 between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit
418 hosts. Journal of Phytopathology 152:277-285. 2004.

419 WALCOTT, R.R., LANGSTON, D., GITAITIS, R., GAY, D., HOPKINS, D.,
420 KUCHARÉK, T., LATIN, R., EGEL, D., COOK, K., KEINATH, A. & LOVIC, B.
421 Guidelines for managing bacterial fruit blotch disease. Geórgia. 2001. Disponível em:
422 <<http://www.tifton.uga.edu/veg//Alerts/.htm>>. Acesso em: 18 jan. 2006.
423

TABELA 1 - Origem dos isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) da coleção de bactérias fitopatogênicas do laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE.

Isolados	Cucurbitácea	Fonte	Local de Origem
Aac1	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.5	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.12	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.31	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.35	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.36	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.37	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.39	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.40	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.43	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.45	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.49	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.50	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.70	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.71	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.72	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.73	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.78	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
AacMP1	Melão Pepino	Fruto	Mossoró/RN
AacMP2	Melão Pepino	Fruto	Mossoró/RN
AacR2	Melão Charantais	Semente	Baraúna/RN
AacR3	Melão Amarelo	Semente	Baraúna/RN
AacR7	Melão Amarelo	Semente	Baraúna/RN
Aac4.9	Melão Orange	Fruto	Baraúna/RN
Aac5.1	Melão Pele de Sapo	Fruto	Baraúna/RN
Aac5.3	Melão Pele de Sapo	Fruto	Baraúna/RN
Aac5.16	Melão Pele de Sapo	Fruto	Baraúna/RN
Aac5.20	Melão Pele de Sapo	Fruto	Baraúna/RN
Aac5.28	Melão Pele de Sapo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.83	Melão	Fruto	Baraúna/RN
Aac1213	Melancia	Fruto	Presidente Prudente/SP
Aac1214	Melancia	Fruto	Presidente Prudente/SP
Aac180	Melancia	Fruto	Petrolina/PE
Aac1225	Melão	Fruto	Assú/RN
Aac1627	Melão	Semente	-
Aac1.84	Melão	Fruto	Baraúna/RN
Aac1521	Melão	Fruto	Baraúna/RN
Aac8	Melão	Semente	-
Aac14	Melão	Semente	-
Aac12	Melão	Semente	-
Aac9	Melão	Semente	-

TABELA 2 - Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* com base na severidade da mancha-aquosa em plântulas, plantas e frutos de meloeiro e melanciaira.

Isolados	Meloeiro				Melanciaira			
	Plântulas IDO ¹ (%)	Plantas IDO (%)	Frutos ²		Plântulas IDO (%)	Plantas IDO (%)	Frutos	
			DLE (mm)	PL (mm)			DLE (mm)	PL (mm)
Aac1	32,4 b ³	16,7 a	10,0 c	10,3 b	20,0 e	16,7 a	5,4 g	5,9 i
Aac1.5	5,0 e	12,2 a	13,6 c	23,0 a	19,5 e	10,2 b	5,1 g	9,7 g
Aac1.12	64,6 a	20,6 a	15,6 b	24,2 a	14,8 f	16,7 a	1,1 j	20,7 b
Aac1.31	9,5 e	16,7 a	9,1 c	11,2 b	21,4 e	12,2 a	8,5 e	13,4 e
Aac1.35	62,9 a	10,2 b	16,8 b	25,6 a	57,1 c	8,3 b	6,0 f	17,7 c
Aac1.36	9,5 e	10,2 b	18,2 b	22,7 a	25,8 d	12,2 a	5,9 f	7,6 h
Aac1.37	5,7 e	5,5 b	11,1 c	28,2 a	7,3 g	10,6 b	6,0 f	9,4 g
Aac1.39	61,0 a	14,3 a	11,3 c	12,3 b	16,5 e	7,0 b	3,4 h	12,1 f
Aac1.40	9,5 e	8,7 b	6,8 c	10,0 b	9,9 f	12,2 a	5,1 g	13,2 e
Aac1.43	64,6 a	14,3 a	5,2 c	12,8 b	12,9 f	8,3 b	2,1 i	10,7 f
Aac1.45	10,2 e	5,8 b	17,0 b	13,1 b	11,4 f	8,3 b	8,7 e	15,0 d
Aac1.49	53,5 a	4,4 b	24,9 a	12,7 b	8,0 g	3,1 b	7,9 e	11,2 f
Aac1.50	10,2 e	10,2 b	11,2 c	13,5 b	9,4 f	16,7 a	0,0 k	9,4 g
Aac1.70	55,2 a	12,2 a	15,5 b	14,2 b	12,7 f	5,5 b	5,7 f	12,7 e
Aac1.71	55,2 a	5,8 b	18,0 b	15,0 b	3,7 g	4,4 b	6,1 f	8,6 h
Aac1.72	36,4 b	14,3 a	15,5 b	12,0 b	31,1 d	8,7 b	8,2 e	20,5 b
Aac1.73	36,6 b	12,2 a	9,6 c	8,2 b	21,6 e	14,3 a	6,5 f	11,0 f
Aac1.78	55,2 a	12,2 a	21,2 a	12,0 b	11,8 f	16,7 a	3,9 h	4,8 i
AacMP1	37,3 b	8,7 b	20,9 a	19,0 a	63,3 b	10,2 b	3,7 h	18,6 c
AacMP2	77,0 a	3,1 b	19,1 b	14,0 b	49,6 c	16,7 a	2,9 i	15,5 d
AacR2	19,2 d	10,2 b	23,7 a	25,0 a	27,3 d	3,1 b	3,4 h	7,1 h
AacR3	27,9 c	8,3 b	9,9 c	8,0 b	42,7 c	8,3 b	8,9 e	12,7 e
AacR7	26,0 c	20,6 a	29,5 a	23,5 a	13,0 f	16,7 a	10,0 d	13,6 e
Aac4.9	56,3 a	16,7 a	8,8 c	8,9 b	70,1 b	4,4 b	7,5 e	14,7 d
Aac5.1	34,2 b	16,7 a	18,0 b	21,2 a	28,8 d	7,0 b	7,7 e	9,5 g
Aac5.3	18,2 d	16,7 a	4,7 c	2,9 b	13,6 f	14,3 a	2,9 i	13,2 e
Aac5.16	6,4 e	14,3 a	14,4 b	9,9 b	17,6 e	16,7 a	8,6 e	11,2 f
Aac5.20	43,4 b	5,5 b	13,0 c	11,3 b	15,2 f	5,8 b	3,4 h	15,0 d
Aac5.28	43,6 b	8,3 b	13,1 c	8,6 b	16,8 e	14,3 a	6,0 f	13,2 e
Aac1.83	64,6 a	16,7 a	17,9 b	8,5 b	53,8 c	7,0 b	13,7 b	19,7 b
Aac1213	27,9 c	8,3 b	11,7 c	5,9 b	100,0 a	16,7 a	15,0 a	19,7 b
Aac1214	16,0 d	3,1 b	14,2 b	8,3 b	100,0 a	29,0 a	11,2 c	18,7 c
Aac180	27,9 c	5,5 b	7,9 c	14,0 b	93,2 a	24,7 a	14,7 a	25,0 a
Aac1225	5,0 e	8,7 b	16,5 b	13,0 b	10,0 f	10,2 b	6,0 f	16,6 d
Aac1627	18,9 d	14,3 a	6,2 c	4,0 b	22,9 e	8,7 b	4,7 g	11,2 f
Aac1.84	15,4 d	10,2 b	21,1 a	16,0 b	63,8 b	12,2 a	5,9 f	16,0 d
Aac1521	17,3 d	12,2 a	13,0 c	14,5 b	11,0 f	12,2 a	6,6 f	7,7 h
Aac8	56,3 a	8,7 b	8,0 c	12,9 b	11,8 f	8,7 b	11,9 c	8,2 h
Aac14	61,0 a	8,3 b	17,1 b	9,6 b	53,2 c	4,4 b	9,5 d	10,0 g
Aac12	49,0 a	12,2 a	11,0 c	10,6 b	26,5 d	7,0 b	13,5 b	13,5 e
Aac9	33,4 b	8,7 b	13,7 c	11,3 b	23,1 e	12,2 a	10,2 d	14,2 e
C.V. (%)	14,9	26,4	10,3	11,6	12,6	27,6	2,4	2,4

¹ IDO - Índice de doença aos nove dias após o plantio (plântulas) ou cinco dias após a inoculação (plantas), calculado de acordo com McKINNEY (1923), utilizando-se os dados de severidade da doença, estimada com o auxílio de escalas descritivas (Araújo *et al.*,2005; Silveira *et al.*,2003).

² DLE e PL – respectivamente, diâmetro da lesão externa e profundidade da lesão em fruto, aos oito (melão) e cinco dias (melancia) após a inoculação.

³ Médias seguidas da mesma letra, no sentido vertical, não diferem significativamente entre si ($P = 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

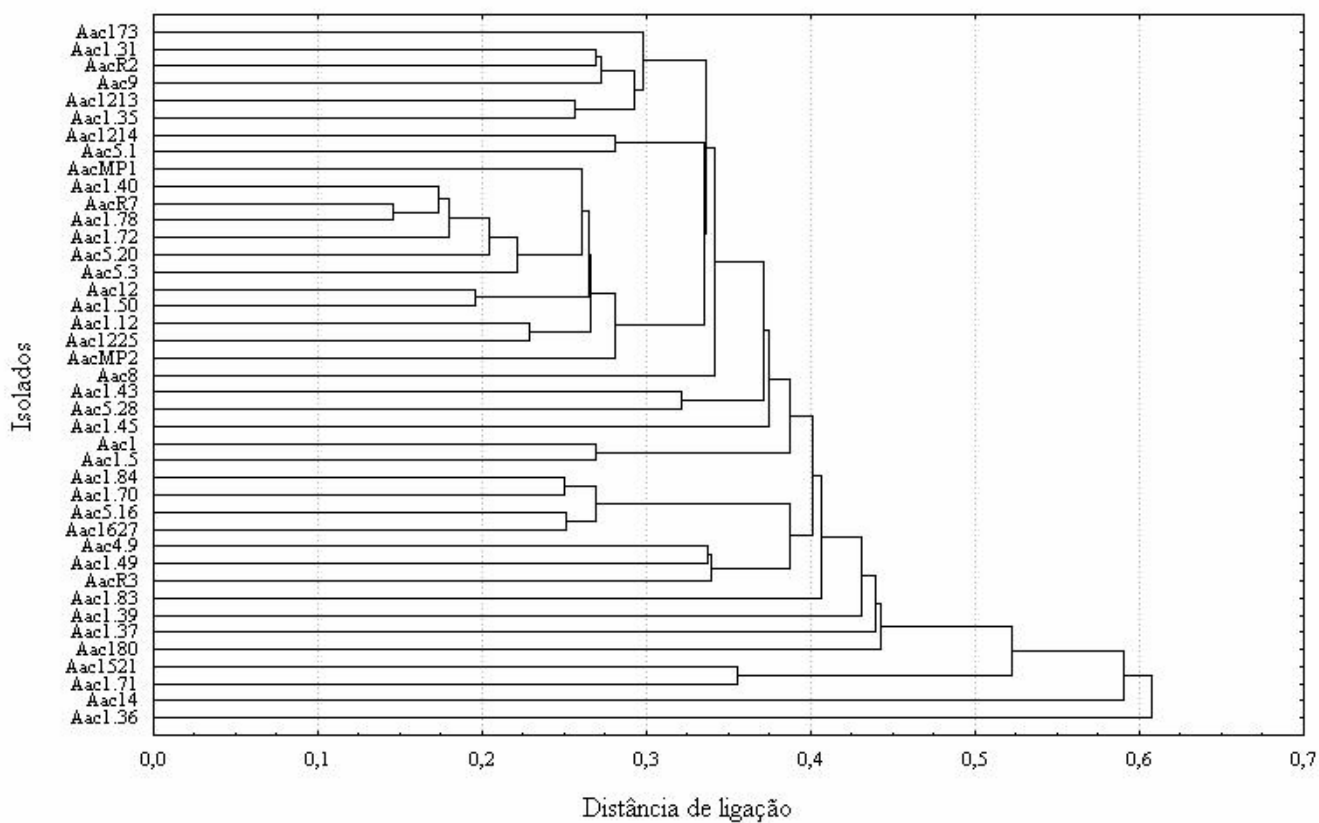


FIG. 2 - Agrupamento de 41 isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* baseado na análise da distância Euclidiana por ligações simples, considerando a sensibilidade aos antibióticos amoxicilina, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, neomicina, norfloxacina, rifampicina e tetraciclina.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- 1- Todos os isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* produziram enzimas lipolíticas e ácido indol-acético, mas não produziram enzimas pectinolíticas, amilolíticas, celulolíticas e proteolíticas; o polissacarídeo levana e a toxina siringomicina;
- 2- Isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* oriundos de meloeiro, melancia e melão pepino foram patogênicos a plântulas, plantas e frutos de meloeiro e melancia;
- 3- Houve maior especificidade dos isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* aos seus hospedeiros de origem;
- 4- Todos os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* induziram reação de hipersensibilidade em fumo;
- 5- Todos os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* utilizaram os aminoácidos asparagina, L-leucina e DL-ácido láctico como fonte de carbono e energia;
- 6- Dentre os cúpricos e antibióticos testados *in vitro*, os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* apresentaram diferenças apenas quanto à sensibilidade a tetraciclina.