

ALDENIR DE OLIVEIRA

**COLONIZAÇÃO DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* EM
MELOEIRO E SOBREVIVÊNCIA EM RESTOS DE CULTURA
E NO SOLO**

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

RECIFE – PE

FEVEREIRO, 2008

**COLONIZAÇÃO DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* EM
MELOEIRO E SOBREVIVÊNCIA EM RESTOS DE CULTURA
E NO SOLO**

ALDENIR DE OLIVEIRA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Professora Dr^a. Elineide Barbosa da Silveira – Orientadora

Professora Dr^a. Rosa de Lima Ramos Mariano – Co-orientadora

Recife – PE

FEVEREIRO, 2008

**COLONIZAÇÃO DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* EM
MELOEIRO E SOBREVIVÊNCIA EM RESTOS DE CULTURA
E NO SOLO**

ALDENIR DE OLIVEIRA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 29 de fevereiro
de 2008.

ORIENTADORA:

Prof^ª. Dra. Elineide Barbosa da Silveira

EXAMINADORES:

Prof^ª. Dra. Andréa Maria André Gomes (Faculdade Maurício de Nassau)

Prof^º. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

Prof^ª. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE)

RECIFE – PE

FEVEREIRO, 2008

**“Poderdes perfeitamente
compreender, qual seja a largura, e o
comprimento, e a altura, e a
profundidade, e conhecer o amor de
Cristo, que excede todo o
entendimento, para que sejais cheios
de toda a plenitude de Deus”.**

Efésios 3:18-19

A Deus pelo maravilhoso dom da vida e por seu infinito e grandioso amor, que nos preenche a cada dia.

Aos meus queridos pais, Ivone e José Sebastião de Oliveira, por tanta doação de amor, carinho, respeito, incentivo e confiança durante todos os momentos da minha vida.

OFEREÇO

Ao meu esposo Washington Alves, pelo amor, carinho, apoio e por tanta paciência.

À minha querida amiga Ivanise Viana, pela amizade, pelo carinho e pela grande ajuda no decorrer do trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha amiga e orientadora, Elineide Barbosa da Silveira, pelo apoio, amizade, ensinamentos, incentivo e a enriquecedora orientação, desde a iniciação científica.

À Prof^a. Rosa de Lima Ramos Mariano, pelos ensinamentos e estímulo nas pesquisas, pela orientação e pelo carinho demonstrado.

A todos do Laboratório de Fitobacteriologia, em especial aos meus grandes amigos: Adenilda Moura, André Xavier, Érika Anjos, Grecy Miriam, Leandro Marinho e Myrzânia Guerra, e as minhas amigas Rosana Sampaio e Liliana Santos, pela primordial amizade, pela imensa colaboração e pela boa convivência.

E, finalmente, aos professores e funcionários da Área de Fitossanidade, especialmente Darci Martins e Luis Coelho, e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
Capítulo I – Introdução Geral	11
A cultura do meloeiro	12
Mancha-aquosa do meloeiro (<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>)	16
Colonização e sobrevivência de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	20
Referências Bibliográficas	25
Capítulo II - Colonização de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em meloeiro...	34
Resumo	35
Introdução	35
Material e métodos	37
Obtenção de mutante de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> resistente ao antibiótico rifampicina.....	37
Colonização de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em folhas verdadeiras e ramos	37
Colonização de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em hipocótilo, raízes, folhas cotiledonares, folhas verdadeiras e ramos	38
Colonização de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em estruturas florais	39
Análises Estatísticas	39
Resultados	39
Obtenção de mutante de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> resistente ao antibiótico rifampicina.....	39
Colonização de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em folhas verdadeiras e ramos	39
Colonização de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em hipocótilo, raízes, folhas cotiledonares, folhas verdadeiras e ramos	40
Colonização de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em estruturas florais	41
Discussão	41
Referências Bibliográficas	45
Capítulo III – Sobrevivência de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em restos de cultura e no solo	50
Resumo	51

Introdução	52
Material e Métodos	53
Sobrevivência de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em Restos de Cultura no Solo	53
Influência do Tipo de Solo na Sobrevivência de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> sob Condições Controladas	54
Influência da Temperatura na Sobrevivência de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em Solo sob Condições Controladas	55
Influência da Umidade na Sobrevivência de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> sob Condições Controladas	56
Análises Estatísticas	56
Resultados	56
Sobrevivência de <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em Restos de Cultura no Solo	56
Influência do Tipo de Solo na Sobrevivência de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> sob Condições Controladas	57
Influência da Temperatura na Sobrevivência de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> em Solo sob Condições Controladas	58
Influência da Umidade na Sobrevivência de <i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> sob Condições Controladas	58
Discussão	58
Referências Bibliográficas	63
CONCLUSÕES GERAIS	71

RESUMO

Esta dissertação teve como objetivos estudar: colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro a partir da inoculação no primeiro par de folhas verdadeiras, sementes e flores hermafroditas; sobrevivência da bactéria em restos de folhas e frutos incorporados ao solo a diferentes profundidades (0, 5, 10 e 15 cm) e em solos na ausência da planta hospedeira, sob a influência de diferentes tipos de solo (sete solos), temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35°C) e umidades (50 e 100% da capacidade de campo). Para os estudos foi utilizado um mutante resistente a 100 ppm de rifampicina (*AacI*^{Rif}). Quando a bactéria foi inoculada nas folhas, a colonização foi detectada até os 30 dias, no 10° par de folhas verdadeiras, com população de 3,1 log UFC g⁻¹ de folha. Nesse mesmo período, observou-se a colonização no segmento de ramo compreendido entre o 10° e 11° par de folhas com população de 3,52 log UFC g⁻¹ de ramo. A partir de sementes, a bactéria colonizou o hipocótilo, raízes, folhas cotiledonares, folhas verdadeiras e ramos, até atingir níveis não detectáveis aos 27 dias após a inoculação. Não foi verificada colonização das flores pela bactéria. *AacI*^{Rif} foi encontrada em restos de frutos e folhas de meloeiro a 0, 5 e 10 cm durante 21 dias e a 15 cm por 14 dias. As maiores taxas de extinção relativa da população (TERP) ocorreram nos frutos na superfície do solo [0,1464 log (UFC) dia⁻¹] e nas folhas a 10 cm [0,084 log (UFC) dia⁻¹]. *AacI*^{Rif} sobreviveu nos sete tipos de solo apenas durante três dias e o solo C apresentou a maior TERP [0,9062 log (UFC) dia⁻¹]. Maiores concentrações de Na⁺ e silte bem como maiores populações de actinomicetos e *Trichoderma* estiveram correlacionadas a mais rápida extinção da população de *AacI*^{Rif} no solo. Para a maioria dos solos, as menores TERP foram atingidas a 10 ou 15°C e as maiores, a 30 ou 35°C. Não houve interação significativa (P=0,05) entre solos e umidade, contudo o teste de T evidenciou diferença significativa (P=0,1) entre as TERP a 100% [0,6685 log (UFC) dia⁻¹] e 50% [0,504591 log (UFC) dia⁻¹] da capacidade de campo. Independente da temperatura e umidade, *AacI*^{Rif} também sobreviveu nos solos apenas por três dias.

Palavras-chaves: *Cucumis melo*, mancha-aquosa, ecologia, colonização, sobrevivência, solo.

ABSTRACT

This dissertation aimed to study: colonization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melons after inoculation of the first pair of true leaves, seeds and hermaphrodite flowers; bacterial survival in fruit and leaf residues incorporated to the soil at 0, 5, 10 and 15 cm depth and in soils without the host plant, under the influence of different soil type, temperature (10, 15, 20, 25, 30 and 35°C) and humidity (50 and 100% of field capacity). In all studies a mutant resistant to 100 ppm of rifampicin (*AacI*^{Rif}) was utilized. Bacterial colonization was detected until 30 days after inoculation in the 10th pair of true leaves, with populations of 3.1 log UFC g⁻¹ of leaf. In the same period, the shoot segment between the 10th and 11th leaf pair showed population of 3.52 log UFC g⁻¹ of shoot. After seed inoculation the pathogen colonized the hypocotyl, roots, cotyledonary leaves, true leaves and shoots, until reach undetectable levels at 27 days after inoculation. Flower colonization by the bacteria was not verified. *AacI*^{Rif} was found in fruit and leaf residues at 0, 5 and 10 cm during 21 days and at 15 cm during 14 days. Highest population relative extinction rates (TERP) were presented by fruits on soil surface [0.1464 log (UFC) day⁻¹] and on leaves at 10cm [0.084 log (UFC) day⁻¹]. *AacI*^{Rif} survived on seven soil types only during three days and the soil C showed the highest TERP [0.9062 log (UFC) day⁻¹]. Higher concentrations of Na⁺ and silt as well as higher populations of actinomycetes and *Trichoderma* correlated to faster extinction of *AacI*^{Rif} populations in soil. Generally for all soils the lowers TERP were found at 10 or 15°C and the higher, at 30 or 35°C. There was no significant (P=0.05) interaction between soil and humidity, however the T test showed significant difference (P=0.05) between the TERP at 100% [0.6685 log (UFC) day⁻¹] and 50% [0.504591 log (UFC) day⁻¹] of field capacity. Independent of temperature and humidity, *AacI*^{Rif} also survived in soil only during three days.

Key words: *Cucumis melo*, bacterial fruit blotch, ecology, colonization, survival, soil.

Capítulo I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

A CULTURA DO MELOEIRO

O meloeiro (*Cucumis melo* L.) é uma espécie pertencente à família das cucurbitáceas. Seu centro de diversidade genética não está claramente estabelecido, podendo ter sido na África ou no continente asiático, tendo se dispersado a partir da Índia para todas as regiões do mundo (BRANDÃO FILHO; VASCONCELOS, 1998). Foi trazido ao Brasil pelos escravos, sendo conhecido desde o século XVI. A segunda introdução do meloeiro foi feita pelos imigrantes europeus, quando se iniciou de fato a expansão da cultura nas regiões Sul e Sudeste, sobretudo no Estado do Rio Grande do Sul, considerado o primeiro centro de cultivo da cultura no país (MELO; NAGAI; TRANI, 1998; ALVARENGA; RESENDE, 2002).

Essa espécie é altamente polimórfica, apresentando diversas variedades botânicas que se cruzam sem que haja nenhuma barreira (PINTO, 1977). Os principais melões produzidos comercialmente e as variedades botânicas foram agrupadas e pertencem atualmente a dois grupos: *Cucumis melo* var. *inodorus* Naud. e *C. melo* var. *cantaloupensis* Naud., que correspondem, respectivamente, aos melões inodoros e aos melões aromáticos. Existe também a classificação comercial por tipo, que facilita a comunicação no agronegócio do melão. Entende-se por tipo, um grupo de cultivares ou híbridos que apresenta uma ou mais características semelhantes, facilmente identificáveis e diferenciadas dos demais, como por exemplo, o aspecto da casca (a coloração quando maduro, a presença ou ausência de suturas, cicatrizes, reticulação ou rendilhamento), a cor da polpa e o formato do fruto, entre outras (ALVES, 2000).

Os frutos pertencentes ao grupo *C. melo* var. *inodorus* são chamados melões de inverno, que apresentam casca lisa ou levemente enrugada, coloração amarela, branca ou verde escura. A polpa é geralmente espessa (20 a 30 mm), de coloração que varia de branco a verde-claro, com elevado teor de açúcares. Possuem longo período de conservação pós-colheita (30 dias), são mais resistentes ao transporte à longa distância e ao armazenamento em temperatura ambiente e, geralmente, têm frutos maiores e mais tardios que os aromáticos (FERNANDES, 1996; FREITAS, 2003). Na região Nordeste, os mais cultivados são os híbridos comerciais de casca amarela, a exemplo do Amarelo Vereda, AF-6764.

Já os frutos pertencentes ao grupo *C. melo* var. *cantaloupensis* são muito aromáticos, sendo mais doces que os inodoros. Apresentam tamanho médio, têm superfície reticulada, verrugosa ou escamosa, podendo apresentar gomos, e possuem polpa de coloração alaranjada, salmão ou às vezes, verde (FERNANDES, 1996). Necessitam de maiores cuidados no manejo cultural e na pós-colheita, principalmente em relação à cadeia de frio (FREITAS, 2003). Os tipos mais comuns são: Charentais (de casca lisa, de casca verde-escura e de casca reticulada), Gália, Cantaloupe (ALVES, 2000) e Orange flesh (FERNANDES, 1996). O tipo Charentais apresenta a casca verde escura reticulada com polpa de coloração salmão; o tipo Gália apresenta forma arredondada, a casca verde que fica amarela quando o fruto amadurece, a polpa é branca ou branca-esverdeada; o tipo Cantaloupe que é o mais produzido no mundo, caracterizando-se pela forma esférica, superfície reticulada, polpa de cor salmão e aroma muito intenso (ALVES, 2000); e o Orange flesh que tem formato arredondado, casca creme-esverdeada, polpa de textura crocante e cor laranja (FERNANDES, 1996).

Aproximadamente 70 % do melão produzido e comercializado no Brasil é do tipo Amarelo do qual fazem parte diversas cultivares e híbridos, sendo também o principal tipo que se destina ao mercado externo. Essa preferência deve-se ao potencial produtivo e a maior resistência do melão amarelo ao transporte por longas distâncias e no armazenamento em temperatura ambiente (COSTA et al., 2001; BUAINAIN; BATALHA, 2007).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas, cuja produção supera os 40 milhões de toneladas. A fruticultura demanda mão-de-obra intensiva e qualificada, fixando o homem no campo e permitindo a vida digna de uma família dentro de pequenas propriedades e também nos grandes projetos. Além disso, para cada US\$ 10.000 investidos, geram-se três empregos diretos permanentes e dois empregos indiretos. Em 2006, as exportações brasileiras de frutas frescas geraram divisas superiores à US\$ 480 milhões para um volume aproximado de 830 mil toneladas quando comparado a 1998, cuja exportação foi de 297 mil toneladas e divisas de US\$ 119 milhões, um crescimento superior a 280 % em volume e 370 % em valor. As principais frutas focalizadas foram: uva, melão, manga, banana, limão e limas e maçã (GLOBAL 21, 2007). Em 2005, o melão foi a segunda fruta fresca mais exportada pelo Brasil, em valor de exportação, superado apenas pela uva (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

Em razão do crescimento do volume de melões exportados, 78,6 % entre 2001 e 2003, o Brasil tornou-se o terceiro maior fornecedor dessa fruta para o mundo. Em 2003, o País exportou US\$ 85,9 milhões, ultrapassando a Guatemala (US\$ 74,5 milhões de exportações do produto). Em 2005, esses países registraram respectivamente US\$ 112,4 milhões e US\$ 81,9 milhões. A Espanha aparece de forma consolidada como o maior exportador mundial (US\$ 260,2 milhões), seguida da Costa Rica (US\$ 121,2 milhões) (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

Entre 1994 e 2005, a produção brasileira de melão cresceu 95 %, passando de 151 mil toneladas em 1994 para 294 mil toneladas em 2005. Nesse período, a área cultivada com melão passou de 11.500 ha para aproximadamente 14.100 ha, tendo um aumento de 23 % (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

Os Estados do Ceará e Rio Grande do Norte destacam-se como líderes nacionais de produção e exportação de melão. Em 2005, estes Estados responderam por 40 e 34,5 % da produção nacional, respectivamente. O elevado crescimento da produção brasileira foi impulsionado, basicamente, pelo bom desempenho da produção cearense e potiguar, que cresceram respectivamente, 164 % e 111 % durante o mesmo período. Nesses Estados, as regiões produtoras caracterizam-se pela presença de empresas de médio e grande porte que lideram este agronegócio, mas também de muitos pequenos produtores que escoam a produção via grandes empresas (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

Há cerca de dez anos, no topo da lista de maiores produtores estavam os municípios de Mossoró (RN) e Juazeiro (BA). Este último com uma produção 8,15 % teve sua participação reduzida, chegando em 2004 a apenas 0,95 %. A participação de Mossoró na produção nacional decresceu de 43,5 % em 1996 para 17 % em 1999, cedendo a posição de primeiro produtor a Baraúna (RN), com 32 % da produção nacional, cujo ranking mantém-se assim até os dias de hoje (BUAINAIN; BATALHA, 2007). No Ceará, no Agropólo Baixo Jaguaribe os municípios maiores produtores são Acaraú, Icapuí, Itaiçaba, Jaguaruana e Quixeré (SEAGRI, 2006).

Os principais destinos das exportações mundiais de melão são os Estados Unidos, Alemanha, França, Canadá, Países Baixos e Reino Unido, os quais compraram em 2005, respectivamente, US\$ 176,7 milhões, US\$ 118,5 milhões, US\$ 89,6 milhões, US\$ 87,9 milhões, US\$ 73,4 milhões e US\$ 72,6 milhões. Países Baixos e Reino Unido foram os principais compradores do melão no Brasil em 2005, correspondendo

respectivamente a US\$ 38,5 milhões e US\$ 29,8 milhões. Esse valor representa 75 % do volume total de melão exportado pelo Brasil (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou câmaras setoriais para as frutas laranja, uva, melão, manga, maçã, banana e mamão papaia, com o objetivo de obter uma análise mais aprofundada de suas cadeias para que o Brasil possa cada vez mais se inserir no mercado internacional de frutas. O melão foi escolhido pelo seu excepcional desempenho exportador. Segundo a FAO (2005), as medidas sanitárias estão entre os elementos mais relevantes na regulação do comércio de frutas. Um dos focos da cadeia produtiva de frutos é o controle fitossanitário de pragas e doenças.

Além das pragas, o melão é suscetível a diversas doenças que podem causar prejuízos econômicos pela redução da quantidade e/ou qualidade de frutos comercializados (ALVES, 2000). Dentre os patógenos que ocorrem nessa cultura, as bactérias vêm assumindo uma importância crescente, destacando-se: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Willems et al. como a mais importante, além de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al.; *Pseudomonas syringae* (Van Hall); *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith; Bryan) Young et al.; *Pseudomonas cichorri* (Swingle) Stapp; *Pseudomonas* sp. (Migula); *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* (Bryan) Dye importantes para o país; e *Erwinia ananas* (Serrano) e *Erwinia tracheiphila* (Smith) com destaque em alguns países produtores de melão (SALES JUNIOR; MENEZES, 2001; TAVARES, 2002). As razões para essa crescente importância são diversas, com destaque para o desequilíbrio progressivo do agrossistema, o emprego de variedades com alto potencial produtivo, porém suscetíveis, e a própria competência das fitobactérias, capazes de sobreviver de forma variada e de se disseminar eficazmente com particular rapidez, se estabelecendo com sucesso quando introduzidas em determinadas regiões agrícolas (ARAÚJO; MICHEREFF; MARIANO, 2005).

A. avenae subsp. *citrulli* [(Sin: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* Schaad et al.; *Pseudomonas avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Hu et al.)] é o agente causal da mancha-aquosa, principal doença bacteriana que ocorre nos campos de melão do Nordeste, principalmente na estação chuvosa, ocasionando grandes perdas na produção e depreciação no valor comercial do fruto (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001).

MANCHA-AQUOSA DO MELOEIRO (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)

A. avenae subsp. *citrulli* é uma bactéria Gram negativa, em forma de bastonete, aeróbica e móvel por um flagelo polar. Apresenta bom crescimento no meio de cultura de rotina ágar nutritivo – extrato de levedura – dextrose (NYDA) (PUSEY; WILSON, 1984), onde forma colônias pequenas com 0,7 a 1,0 mm, brancas ou cremes, e não é fluorescente em meio King B. Cresce a temperatura de 41°C, mas não a 4°C. Não hidrolisa a arginina e apresenta reação positiva para os testes de catalase, oxidase, urease e lipase (SCHAAD et al., 1978). Conforme a descrição do isolado tipo (*P. pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*), a espécie não induz reação de hipersensibilidade em fumo (*Nicotiana tabacum* L.), contudo, essa reação já foi observada em diversos isolados dessa bactéria (SOMODI et al., 1991; RANE; LATIN, 1992; SILVEIRA; MICHEREFF; MARIANO, 2003). Cavalcanti et al. (2005), analisando as condições favoráveis ao cultivo de quatro isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*, observaram o crescimento da bactéria 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: glicose, galactose, ramnose, sacarose, lactose, maltose, amido, inulina, manitol, dulcitol, sorbitol e salicina.

A mancha-aquosa foi relatada pela primeira vez em melancia (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum.; Nakai) nos Estados Unidos em 1965, causando manchas encharcadas em plântulas (WEBB; GOTH, 1965) e tem sido relatada em várias regiões produtoras deste país e em diversos outros países do mundo.

Em melão, o primeiro relato da doença nos Estados Unidos foi em 1996, mais precisamente na Flórida, Carolina do Sul e Indiana e, posteriormente no Texas, em melão Cantaloupe com incidência de frutos doentes superior a 50 % (ISAKEIT et al., 1997). No Brasil, foi registrada em meloeiro nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste por Robbs et al. (1991). Hoje é um problema para essa cultura nas áreas produtoras do Nordeste. Em 1997, a mancha-aquosa foi detectada pela primeira vez no Rio Grande do Norte (ASSIS et al., 1999). Posteriormente foi assinalada no Ceará (SANTOS; VIANA, 2000), Rio Grande do Sul (UENO; COUTO; UESUGI, 2003), Minas Gerais (MACAGNAN et al., 2003), Pernambuco (MARIANO; SILVEIRA, 2004) e Bahia (MARIANO et al., 2004). As perdas de produção ficam em torno de 40 a 50 %, mas chegou a dizimar totalmente algumas lavouras nos municípios de Quixeré

(Ceará) e Mossoró (Rio Grande do Norte) nos períodos chuvosos (SANTOS; VIANA, 2000). Um levantamento realizado na safra 2001, nos municípios de Mossoró e Baraúna no Rio Grande do Norte, em 18 plantios de meloeiro, registrou a prevalência da mancha-aquosa em 100 % dos campos, com incidência variando de 4,30 a 47,29 % (SILVA et al., 2003). Entretanto, essa doença parece não ter grande expressão econômica na Bahia, pois levantamento realizado em Juazeiro, em 12 áreas comerciais, em dois períodos de 2004, constatou a ocorrência da mancha-aquosa apenas no período de novembro de 2003 a janeiro de 2004, com prevalência de 33,33 % e incidência de 0,2 a 4,4 % (SILVA; SILVEIRA; MARIANO, 2006).

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

Os sintomas da mancha-aquosa podem se manifestar em qualquer fase de desenvolvimento da planta, ocorrendo comumente em plântulas, folhas e frutos, sendo mais comuns e facilmente visualizados nos frutos. Em plântulas oriundas de sementes infectadas, as lesões encharcadas são observadas nos hipocótilos e cotilédones, progredindo para verde-escuras (SANTOS; VIANA, 2000) e marrons nos cotilédones e às vezes necrose do hipocótilo, podendo levar ao colapso total ou tombamento e morte das mudas, após alguns dias (HOPKINS; CUCUZZA; WATERWON, 1996).

As lesões nas folhas de plantas adultas são inicialmente pequenas, com aspecto oleoso e coloração verde-clara, assumindo posteriormente uma coloração marrom-escura (SANTOS; VIANA, 2000), com ou sem halo (HOPKINS; CUCUZZA; WATERWON, 1996). Lesões são freqüentemente observadas ao longo das nervuras ou nas margens da folha (O'BRIEN; MARTIN, 1999). 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).

Na casca dos frutos maduros, antes da colheita, estão os sintomas mais notáveis da doença (ISAKEIT, 1999). Caracterizam-se como pequenas manchas verde-oliva, oleosas, variando de 1 a 5 mm de diâmetro, com ou sem halo, as quais progridem rapidamente, coalescem, tomando-se aquosas, marrom-claras ou marrom-escuras, podendo atingir grandes áreas da casca. No centro das lesões podem ocorrer rachaduras as quais permitem a entrada de outros microrganismos que aceleram o apodrecimento do fruto (SANTOS; VIANA, 2000; COSTA et al., 2001).

Os sintomas internos variam com a idade do fruto e com seu estágio de desenvolvimento no momento da infecção. 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). A necrose ou simples lesão na casca não reflete o dano que ocorre na polpa imediatamente abaixo, ou seja, a parte interna já pode estar bastante comprometida, mesmo quando a lesão externa tem apenas 0,5 cm a 2,0 cm de diâmetro (O'BRIEN; MARTIN, 1999).

Além da melancia e meloeiro, a abóbora (*Curcubita pepo* L.) (LANGSTON et al., 1999) é hospedeira de *A. avenae* subsp. *citrulli*. Hopkins e Thompson (2000) observaram a transmissão do patógeno em sementes obtidas de frutos inoculados, mas sem sintomas, de abóbora, pepino (*Cucumis sativus* L.) e abobrinha (*Cucumis pepo* L.). 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 da América (ASSOULINE et al., 1997), porém não são conhecidas infecções naturais dessas culturas (O'BRIEN; MARTIN, 1999). No Brasil, Robbs et al. (1991) obtiveram sintomas da doença, inoculando o patógeno em pepino, 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). 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; SALES JÚNIOR; MARIANO, 2001). Na Austrália e no Texas, respectivamente, as plantas invasoras *Cucumis myriocarpus* L. e *Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. var. *citroides* (Bailey) Mansf foram assinaladas como hospedeiras da bactéria (ISAKEIT, 1999; O'BRIEN; MARTIN, 1999).

A disseminação de *A. avenae* subsp. *citrulli* a longa distância ocorre principalmente por sementes contaminadas, com níveis variando de 10 a 91 % (O'BRIEN; MARTIN, 1999; OLIVEIRA; SALES JÚNIOR; MARIANO, 2001) e pelo transplântio de mudas de cucurbitáceas infectadas (HOPKINS; CUCUZZA; WATERWON, 1996). 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, implementos agrícolas, operários de

campo (SANTOS; VIANA, 2000) e aerossóis (HOPKINS et al., 1992). Ainda de acordo com estes, as lesões nas folhas das plantas são importantes fontes de inóculo para os frutos (HOPKINS et al., 1992) e as sementes oriundas de frutos infectados abandonados no solo podem resultar em plantas voluntárias infectadas, servindo de inóculo primário para o próximo plantio. Em condições favoráveis de temperatura e umidade, a bactéria pode disseminar-se rapidamente, e poucos sítios de infecção primária no campo podem resultar em 100 % de infecção de 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; COOK; KEINATH, 1997).

Sumarizando o ciclo da mancha-aquosa, sementes infectadas ou infestadas originam plântulas doentes; a bactéria se dissemina entre as plântulas (HOPKINS, 1993), sendo responsável por significativa proporção de mudas infectadas (HOPKINS, 1994); à medida que as plantas vão crescendo no campo, o patógeno dissemina-se para novas folhas e plantas vizinhas; lesões nas folhas são a principal fonte de inóculo para frutos imaturos (HOPKINS, 1995); frutos maduros infectados deixados no campo servem como fonte de infecção para plantas saudáveis (LATIN, 1996) e os colhidos, como fonte de infecção pós-colheita (RUSHING et al., 1997). Esses aspectos revelam a natureza policíclica da doença com número limitado de ciclos por ano, tal como ocorre com a podridão-negra das crucíferas (*X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson) (KOCKS, 1998).

A bactéria penetra nas folhas de meloeiro através dos estômatos e nos frutos via estômatos e lenticelas, sendo os frutos verdes mais susceptíveis à invasão pela bactéria do que os maduros (SILVA NETO et al., 2006). Segundo Hopkins et al. (1992), os frutos de melancia com aproximadamente duas a três semanas são mais suscetíveis à invasão pela bactéria, porque à medida que vão amadurecendo são cobertos por uma camada de cera que fecha os estômatos e previne a entrada da mesma. *A. avenae* subsp. *citrulli* penetra nas sementes pelo sistema vascular da planta, muito embora a abertura na região do hilo tenha a capacidade de servir como acesso durante o processo de extração das sementes (HOPKINS; CUCUZZA; WATERWON, 1996). Flores também são consideradas um potencial local de penetração de *A. avenae* subsp. *citrulli*, a qual foi detectada no estigma e estilete de flores de melancia (WALCOTT; GITAITIS; CASTRO, 2003; LESSL; FESSEHAIE; WALCOTT, 2007).

Após a penetração, a bactéria precisa colonizar efetivamente os tecidos da planta para exercer um efeito significativo na fisiologia da mesma e causar infecção, bem como apresentar mecanismos de sobrevivência que permitam a manutenção de fonte de inóculo para novos ciclos da doença.

COLONIZAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DE *A. avenae* subsp. *citrulli*

Silva Neto et al. (2006) estudaram a colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* em folhas de meloeiro, utilizando como ferramenta a microscopia eletrônica de varredura. Em amostras de folhas coletadas após a inoculação, foram observadas células bacterianas aderidas à superfície da folha em baixa população. Entretanto, nas amostras com 24, 48, 72, 96 e 120 h após a inoculação, foi verificada uma crescente população de células bacterianas, mostrando a necessidade de algumas horas para que ocorra a colonização epifítica dos tecidos. Também foi observada a presença de fibrilas nas células da bactéria interligando-as e ancorando-as a superfície do hospedeiro, o que favorece a sobrevivência no filoplano por proporcionar a aderência das células ao tecido da planta e, desta forma, diminuir o impacto de fatores mecânicos como o vento e a chuva, bem como proteger células individuais da dessecação. Além disso, as células dessa bactéria situavam-se preferencialmente em locais protegidos do filoplano, tais como depressões existentes entre as células epidermais, base dos tricomas e ao redor e dentro dos estômatos.

Em sementes de melão, 24 h após a inoculação por imersão, células de *A. avenae* subsp. *citrulli* foram encontradas colonizando epifítica ou endofiticamente todas as partes das sementes analisadas, tais como: tegumentos externo e interno, embrião e endosperma. Isto comprova a eficiência com que a bactéria penetra e coloniza a semente (SILVA NETO et al., 2006). Segundo Isakeit (1999), *A. avenae* subsp. *citrulli* pode colonizar a polpa do fruto até atingir as sementes, contaminando-as externa e internamente através da região do hilo, embora parece não invadir sistemicamente as sementes de melão através do sistema vascular (RANE; LATIN, 1992). Walcott; Gitaitis e Castro (2003) verificaram que flores de melanciaira são um potencial local de penetração para infecção de frutos e sementes, no entanto Santos Filho, Mariano e Medeiros (2004) observaram que frutos de melão obtidos de flores inoculadas e plântulas oriundas de sementes desses frutos não apresentaram sintomas da doença. Cardoso; Mariano e Silva (2005), avaliando 63 frutos de melão provenientes 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.

Lessl; Fessehaie e Walcott (2007) investigaram a habilidade de *A. avenae* subsp. *citrulli* colonizar flores femininas de melancia e exploraram a relação entre a dosagem de inóculo no botão floral e transmissão para as sementes, em condições de casa de vegetação. A bactéria colonizou estigmas e estiletos de flores, alcançando populações de 10^7 a 10^8 UFC por flor até 96 horas após a inoculação. Em flores inoculadas com 10^3 UFC por flor verificou-se infestação de 36 a 55 % dos lotes de sementes de frutos assintomáticos e 14% das plântulas produzidas dessas sementes apresentaram sintomas de mancha-aquosa. Quando as flores foram inoculadas com 10^9 UFC mL⁻¹ a transmissão da bactéria para as sementes aumentou de 14 % para 38,4 %, indicando que há uma forte correlação positiva na relação entre a dosagem do inóculo por flor e a percentagem de transmissão da bactéria.

A umidade relativa alta e temperatura elevada colaboram para a colonização de folhas e frutos, para um rápido desenvolvimento da doença e disseminação secundária desta fitobactéria (O'BRIEN; MARTIN, 1999; WALCOTT; GITAITIS; CASTRO, 2003). Períodos de temperaturas elevadas e dias ensolarados com chuvas ao entardecer facilitam o desenvolvimento dos sintomas da doença e a rápida disseminação bacteriana sobre folhas e frutos. A doença parece não se desenvolver durante o período 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; MICHEREFF; MARIANO, 2003). Em frutos, a severidade da doença é influenciada pela temperatura, umidade e idade dos frutos (SILVEIRA et al., 2004).

Como qualquer microrganismo, as bactérias fitopatogênicas possuem seus próprios mecanismos de sobrevivência, associados ou não ao hospedeiro. Sobrevivem no solo, na superfície de plantas como população residente e em órgãos vegetais infectados como fonte primária de inóculo, incluindo sementes (ROMEIRO, 2005). A semente é muito eficiente para sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli*. Esse patógeno sobreviveu durante seis meses em sementes de melão tipo Amarelo armazenadas em condições de laboratório procedentes de frutos infectados de áreas produtoras (OLIVEIRA; SALES JÚNIOR; MARIANO, 2001) e por 12 meses em sementes de melancia (HOPKINS; CUCUZZA; WATERWON, 1996).

No campo, *A. avenae* subsp. *citrulli* sobrevive em plântulas voluntárias, isto é, em plântulas de meloeiro provenientes de sementes de frutos infectados deixados no campo, de um cultivo para outro, como também em hospedeiras alternativas como as cucurbitáceas nativas, presentes em áreas de cultivo de meloeiro. Aparentemente a bactéria não sobrevive no solo mais do que algumas semanas na ausência de uma planta hospedeira (ISAKEIT, 1999).

Estudos realizados em casa de vegetação e campo mostraram que um mutante *AacI*^{Rif} de *A. avenae* subsp. *citrulli* sobreviveu epifiticamente nas folhas de meloeiro durante 54 dias, observando-se inicialmente aumento da população bacteriana epifítica, com posterior declínio, sendo as populações finais semelhantes em condições de casa de vegetação e de campo. Nas raízes e na rizosfera em casa de vegetação, a população bacteriana decresceu ao longo do tempo até atingir aos 60 dias após a infestação do solo, níveis de 10^2 a 10^3 UFC.mL⁻¹ de raiz e de 10^1 UFC.g⁻¹ de solo. *AacI*^{Rif} não foi detectado sobrevivendo endofiticamente em folhas ou raízes de meloeiro. Por tratar-se de um patógeno habitante da parte aérea, a bactéria sobreviveu melhor nas folhas do que nas raízes, apesar destas terem sido inoculadas com maiores concentrações bacterianas (SILVA; SILVEIRA; MARIANO, 2006). Acredita-se que patógenos de folhagem não são bem adaptados a sobreviver no solo (HIRANO; UPPER, 1983). Através de microscopia eletrônica de varredura, essa bactéria também não foi visualizada no xilema e floema de plântulas de melancia infectadas (WALCOTT; GITAITIS; CASTRO, 2003).

Latin; Tikhonova e Rane (1995) examinaram a sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* durante o processo de produção de mudas de melancia em casa de vegetação, havendo detectado a sobrevivência por até 63 dias em bandejas plásticas vazias, em resíduos de substrato e raízes. O período de sobrevivência do patógeno decresceu com o tempo e a desinfestação das bandejas com água sanitária comercial a 10 % durante cinco minutos erradicou as células do patógeno.

Apesar de todo conhecimento acumulado sobre esse patossistema estudos que visem o esclarecimento sobre a colonização e sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* são imprescindíveis para que sejam estabelecidas medidas eficientes de controle. Inexistem estudos sobre a capacidade de colonização dessa bactéria em diferentes partes da planta e sobre sua sobrevivência em restos de cultura no solo e no solo na ausência de uma planta hospedeira. Essas características da ecologia da bactéria precisam ser

determinadas, porque além da importância econômica da doença para a região Nordeste do Brasil, a cultura do meloeiro é explorada de forma contínua.

Mutantes resistentes a antibióticos, tais como rifampicina e/ou ácido nalidíxico, têm se mostrado eficientes para estudos de colonização e sobrevivência de microrganismos, quando introduzidos em ecossistemas complexos (COMPEAU et al., 1988; MARIANO; McCARTER, 1991; 1993; LÓPEZ; HAEDO; MÉNDEZ, 1999), uma vez que essas mutações se comportam como marcadores dessas bactérias (ASSIS, 1995). Embora existam evidências de que o método de marcação por resistência a antibióticos para o estudo da dinâmica das populações bacterianas pode afetar a biologia dos organismos (SCHROTH, 1992), Silva; Silveira e Mariano (2006), visando estudos de sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli*, obtiveram um mutante espontâneo *AacI*^{Rif} resistente a 100 ppm de rifampicina o qual mostrou estabilidade para resistência ao antibiótico, além de causar doença em plantas de melão com severidade semelhante ao isolado selvagem.

Dentre os fatores que afetam a sobrevivência de bactérias fitopatogênicas têm-se a temperatura, umidade e características químicas, físicas e biológicas do solo (DE BOER, 1982). Os efeitos desses fatores na sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* ainda não foram investigados. Em geral, as bactérias sobrevivem no solo em uma faixa de temperatura que varia de 20 a 37 °C. Martins (2000) estudando a sobrevivência de *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuchii et al. em solos incubados a diferentes temperaturas, obteve uma maior recuperação de células viáveis da bactéria em faixa de temperatura de 27 a 37 °C.

Schaad e White (1974) mostraram que *X. campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson sobrevive no solo por um período de tempo relativamente curto quando desprotegida de tecidos de plantas hospedeiras, dependendo da estação do ano. Este patógeno foi recuperado de solos infestados durante um período de 42 dias no inverno, mas apenas 14 dias no verão.

O estudo da umidade do solo merece atenção especial, porque ela regula diretamente atividades da microbiota do solo, tais como, germinação, viabilidade e agressividade patogênica (MONDAL; KAGEYAMA; HYAKUMACHI, 1995). Levick et al. (1985), estudando a sobrevivência da bactéria *Streptomyces scabies* (Thaxter) Waksman e Henrici no solo, avaliada através da incidência da doença em cultivares de rabanete sob dois níveis de umidade do solo, verificaram maior incidência da sarna no

solo com 50 % de potencial mátrico, caracterizado por solo úmido com drenagem deficiente.

Para algumas bactérias, a estrutura física e composição química do solo são características que interferem na sobrevivência. Alvarado et al. (2007) avaliaram a taxa de extinção da população de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben et al. em 24 amostras de solos de Pernambuco e analisaram as características físicas, químicas e microbiológicas dos solos associadas com a supressividade ou condutividade ao patógeno, utilizando um mutante resistente a rifampicina (Pcc127^{Rif}). As taxas de extinção relativa das populações (TERP) variaram de 0,0547 a 0,6327 log (UFC) dia⁻¹, sendo identificados seis solos supressivos e cinco condutivos a Pcc127^{Rif}. A redução da população de Pcc127^{Rif} no solo pode ser atribuída à competição com bactérias nativas que utilizam os nutrientes mais eficientemente (ARMON et al., 1995). Uma maior compreensão da ecologia de *A. avenae* subsp. *citrulli* trará subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da mancha-aquosa, uma vez que até o momento não existe um controle efetivo para essa doença. Sabe-se que uma vez a mancha-aquosa introduzida em uma área a erradicação é muito difícil (SALES JÚNIOR; MENEZES 2001).

Esta dissertação teve como objetivos estudar: colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro a partir da inoculação em folhas, sementes e flores; sobrevivência da bactéria em restos de folhas e frutos incorporados ao solo a diferentes profundidades e em solos na ausência da planta hospedeira, sob a influência de diferentes tipos de solo, temperaturas e umidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARADO, I. C. M.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, A. M. F.; NASCIMENTO, C. W. A. Caracterização de solos de Pernambuco quanto à supressividade a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 222-228, 2007.

ALVARENGA, M. C. A.; RESENDE, G. M. **A cultura do melão**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 149 p.

ALVES, R. E. **Melão, pós-colheita**. Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE). - Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 43 p. (Frutas do Brasil; 10).

ARMON, R.; DOSORETZ, C.; YOIRISH, A.; SHELEF, G; NEEMAN, I. Survival of the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in sterile and non-sterile soil, sand and their admixture. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 79, p. 513-518, 1995.

ASSIS, S. M. P. **Antagonismo de *Bacillus* sp, e bactérias endofíticas a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson em plantas de couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala* L.)**. 1995. 130 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1995.

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.; BEM-ZE'EV, I. S. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* transmitted by solanaceous seeds. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 25, n. 2, p. 117, 1997.

BUAINAIM, A. M.; BATALHA, M. O. (Coords.). **Cadeia produtiva de frutas /** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola,

Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007. 102 p. (Agronegócios; v. 7).

BRANDÃO FILHO, J. U. T.; VASCONCELOS, M. A. S. A. cultura do melão. In: GOTO, R; TIVELLI, S. W. (Org.). **Produção de hortaliça em ambiente protegido:** condições subtropicais. São Paulo: Fundação Editora da UNESP. 1998. p. 161-193.

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.

COMPEAU, G.; AL-ACHI, B. J.; PLATSOUKA, E.; LEVY, S. Survival of rifampicin resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 10, p. 2432-2438, 1988.

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).

DE BOER, S. H. Survival of phytopathogenic bacteria. In: MOUNT, M. S.; LACY, G. H. (Eds.). **Phytopathogenic prokaryotes**. New York: Academic Press, v. 1, 1982. p. 285-306.

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.2007.

FERNANDES, P. M. G. C. **Armazenamento ambiente e refrigeração de melão, híbrido Orange Flesh, submetido à aplicação pós-colheita de cloreto de cálcio.** 1996. 68 f Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 1996.

FREITAS, J. A. D. **Normas técnicas e documentos de acompanhamento da produção integrada de melão.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 89p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 68).

GLOBAL 21. **Fruticultura.** Disponível em: <<http://www.global21.com.br/informessoriais/setor.asp?cod=6>>. Acesso em: 07 dez. 2007.

HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Ecology and epidemiology of foliar bacterial pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 21, p.243-269, 1983.

HOPKINS, D. L. Field spread of bacterial fruit blotch of watermelon. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 4, p. 466, 1993.

HOPKINS, D. L. Spread of bacterial fruit blotch of watermelon in the greenhouse. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 7, p. 755, 1994.

HOPKINS, D. L. Bacterial fruit blotch of watermelon: the hypothetical exam question becomes reality. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, n. 8, p. 761-765, 1995.

HOPKINS, D. L.; THOMPSON, C. M. **Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits.** Gainesville, Flórida, 2000. Disponível em: <<http://apsnet.org/meetings/div./so00abs.asp>>. Acesso em: 09 jan. 2008.

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. 2p. (Bulletin).

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.

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. 2007.

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.

KOCKS, C. G. Survival and extinction of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in soil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 911-923, 1998.

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.

LATIN, R. X. **Bacterial fruit blotch of cucurbits**. St Paul: Plant Health Progress-USA, 1996. Disponível em: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/management/bacterialblotch/> Acesso em: 09 jan. 2008.

LATIN, R. X. Survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon transplant production facilities. 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. 3-4, 1997.

LATIN, R. X.; TIKHONOVA, I.; RANE, K. Factors affecting the survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon transplant production facilities. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, p. 1413-1417, 1995.

LESSL, J. T.; FESSEHAIE, A.; WALCOTT, R. R. Colonization of female watermelon blossoms by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and the relationship between blossom

inoculums dosage and seed infestation. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 114-121, 2007.

LEVICK, D. R.; EVANS, T. A.; STEPHENS, C. T.; LACY, M. L. Etiology of radish scab and its control through irrigation. **Phytopathology**, St. Paul, v. 49, p. 323-456, 1985.

LÓPEZ, N. I.; HAEDO, A. S.; MÉNDEZ, B. S. Evaluation of *Xanthomonas campestris* survival in soil microcosm system. **International Microbiology**, Ibérica, v. 2, p. 111-114, 1999.

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.; McCARTER, S. M. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato and weeds. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, p.86-91, 1991.

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

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.

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

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).

MARTINS, O. M. **Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.** 2000. 127f. Tese (Doctorate in Agriculture) – Faculty of Agricultural Sciences, Georg-August University, Gottingen, Germany, 2000.

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

MONDAL, S. N.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. Influence of soil matric potential on the debilitation of oospores of *Pythium aphanidermatum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 1319-1324, 1995.

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

O'BRIEN, R. G.; MARTIN, A. L. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 39, 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**, Brasília, v. 26, suplemento, p. 302, 2001.

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

PUSEY, P. L.; WILSON, C. L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, p. 753-756, 1984.

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

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

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, n. 2, p. XLVIII, 1991.

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).

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 de melão pela proteção das flores. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8, 2004, Recife. **Resumos...** Recife: FACEPE/CNPq, 2004. p. 31.

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

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.

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

SEAGRI – Secretaria da Agricultura e Pecuária, 2006. **Custos de produção e análise de rentabilidade de melão**. Disponível em: <<http://www.seagri.ce.gov.br/siga/cproducao/Melao.pdf>>. Acesso em: 17/10/2007.

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. A. V.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Sobrevivência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 381-386, 2006.

SILVA NETO, E. B.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; NOGUEIRA, N. L.; ROSSI, M. L. Colonização e penetração de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em folhas, sementes e frutos de melão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, suplemento, p. 54, 2006.

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.034-038, 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, p. 1053-1056, 1991.

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

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).

WALCOTT, R. R.; GITAITIS, R.; 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.

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

Capítulo II

COLONIZAÇÃO DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* EM MELOEIRO

COLONIZAÇÃO DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

EM MELOEIRO

A. Oliveira^a, A. S. Xavier^a, I. O. Viana^a, E. B. Silveira^b e R. L. R. Mariano^a

^aDepartamento de Agronomia/Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

^bDepartamento de Biologia/Microbiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos, 52171-900 - Recife/PE - Brasil.

* E-mail: rmariano@truenet.com.br Fone: 00 55 81 3320-6211

Resumo

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* causa a mancha-aquosa, importante fitobacteriose em meloeiro. A capacidade de colonização dessa bactéria em diversos órgãos do meloeiro, a partir da inoculação no primeiro par de folhas verdadeiras, sementes e flores hermafroditas, foi estudada utilizando um mutante resistente a rifampicina (*AacI*^{Rif}). A intervalos de três dias, as amostras de hipocótilo, folhas cotiledonares, raízes, folhas ou ramos foram fragmentadas, maceradas e processadas para isolamento pelo método de diluição, sendo as populações de *AacI*^{Rif} determinadas em log UFC g⁻¹ de amostra. Nas flores, as avaliações foram realizadas em estigmas e estilete 0, 6, 12, 24, 48 e 96 h após a inoculação. Quando a bactéria foi inoculada nas folhas, a colonização foi detectada até os 30 dias, no 10º par de folhas verdadeiras, com população de 3,1 log UFC g⁻¹ de folha. Nesse mesmo período, o segmento de ramo compreendido entre o 10º e 11º par de folhas apresentou população de 3,52 log UFC g⁻¹ de ramo. A partir de sementes, a bactéria colonizou o hipocótilo, raízes, folhas cotiledonares, folhas verdadeiras e ramos, até atingir níveis não detectáveis aos 27 dias após a inoculação. Não foi verificada colonização das flores por *A. avenae* subsp. *citrulli*.

Palavras-chave adicionais: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Cucumis melo*, ecologia, fitobactéria, mancha-aquosa.

Introdução

A mancha-aquosa causada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*) Willems *et al.*, é um dos principais problemas para a cultura do melão no Nordeste do Brasil, principalmente na estação chuvosa (Sales Júnior & Menezes, 2001).

34 Os danos principais são verificados nos frutos, onde os sintomas da mancha-aquosa se
35 manifestam como pequenas manchas verde-oliva e oleosas, com ou sem halo, as quais
36 progridem rapidamente, coalescem, tornando-se aquosas, marrom-claras ou marrom-
37 escuras. Internamente, a bactéria coloniza a polpa do fruto e causa uma podridão seca
38 (Isakeit, 1999).

39 No ciclo da mancha-aquosa, sementes infectadas ou infestadas originam
40 plântulas doentes; a bactéria se dissemina entre as plântulas (Hopkins, 1993), sendo
41 responsável por significativa proporção de mudas infectadas (Hopkins, 1994); à medida
42 que as plantas vão crescendo no campo, o patógeno dissemina-se para novas folhas e
43 plantas vizinhas; lesões nas folhas são a principal fonte de inóculo para frutos imaturos
44 (Hopkins, 1995); frutos maduros apresentam sintomas típicos da doença (Latin, 1996).
45 Sementes de frutos maduros infectados deixados no campo vão dar origem a plantas
46 voluntárias infectadas que servirão de inóculo para novos plantios. Em condições
47 favoráveis de temperatura e umidade, a bactéria pode disseminar-se rapidamente, e
48 poucos sítios de infecção primária no campo podem resultar em 100% de infecção de
49 frutos na época da colheita (Hopkins *et al.*, 1992).

50 A colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* foi evidenciada em folhas, sementes,
51 flores e frutos. Em folhas de meloeiro, as células situavam-se preferencialmente em
52 locais protegidos do filoplano, tais como depressões existentes entre as células
53 epidermais, base dos tricomas e ao redor e dentro dos estômatos. Nas sementes foi
54 observada colonização epifítica e endofítica, tendo sido a bactéria detectada nos
55 tegumentos externo e interno, embrião e endosperma (Silva Neto *et al.*, 2006). A
56 colonização em flores de melancieira foi verificada em estigmas e estiletos alcançando
57 populações de 10^7 a 10^8 UFC por flor até 96 horas após a inoculação (Lessl; Fessehaie;
58 Walcott, 2007). Segundo Isakeit (1999) esta bactéria pode colonizar a polpa do fruto até
59 atingir as sementes, contaminando-as externa e internamente através da região do hilo.

60 A colonização e sobrevivência de bactérias na planta e no solo podem ser
61 monitoradas pelo uso de mutantes resistentes a antibióticos uma vez que estas mutações
62 se comportam como marcadores destas bactérias (Mariano & McCarter, 1993; Assis,
63 1995; López *et al.*, 1999). Mutante de *A. avenae* subsp. *citrulli* resistente a rifampicina
64 foi utilizado com sucesso em estudo de sobrevivência em folhas e raízes de meloeiro
65 (Silva *et al.*, 2006).

66 O estudo da capacidade de *A. avenae* subsp. *citrulli* colonizar sementes, folhas,
67 ramos e flores de meloeiro e servir como fonte de inóculo para a infecção de frutos é de

68 grande importância para o manejo da mancha-aquosa, mas inexistem pesquisas que
69 quantifiquem esta colonização a partir do ponto de inoculação.

70 Este trabalho teve como objetivo estudar a colonização de *A. avenae* subsp.
71 *citrulli* em meloeiro a partir da inoculação em folhas, sementes e flores.

72

73

Material e métodos

74 **Obtenção de mutante de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* resistente ao antibiótico** 75 **rifampicina**

76 Para obtenção do mutante de *A. avenae* subsp. *citrulli* resistente ao antibiótico
77 rifampicina foi utilizado o isolado *Aac1*, pertencente à coleção de bactérias do
78 Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Brasil.
79 Alíquotas de 0,1 mL de suspensão bacteriana ($3,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹) foram plaqueadas
80 em meio de cultura ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura (NYDA: 20 g ágar
81 nutritivo, 10 g glicose, 5 g extrato de levedura, 3 g extrato de carne, 5 g peptona de
82 carne) contendo 50 ppm de rifampicina (Rif), sendo as placas incubadas em B.O.D.
83 (Biochemistry Oxygen Demand) (Tecnal) a 30°C por 48 h. A partir de uma colônia
84 crescida nessas condições foi obtido pelo mesmo método um mutante resistente a 100
85 ppm de rifampicina. A estabilidade do mutante foi testada realizando-se repicagens
86 alternadamente para meio NYDA com e sem antibiótico, por 10 vezes.

87 O mutante foi comparado ao isolado selvagem quanto ao crescimento em meio
88 líquido NYD, monitorado em fotocolorímetro (Mectronic M3) as 24, 48, 96 e 144 h
89 após semeio (Silva *et al.*, 2006), e patogenicidade em folhas de plantas de meloeiro
90 híbrido Amarelo AF-646 (Sakata) com 20 dias de idade inoculadas por pulverização e
91 avaliadas após 15 dias quanto à presença de sintomas típicos da doença (Silveira *et al.*,
92 2003).

93

94 **Colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* em folhas verdadeiras e ramos**

95 O primeiro par de folhas verdadeiras de plantas de meloeiro com 20 dias,
96 mantidas em condições de casa de vegetação, foi pulverizado até o escorrimento com a
97 suspensão do patógeno ($3,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹), sendo as plantas submetidas à câmara
98 úmida de pré e pós-inoculação por 24 h (Silveira *et al.*, 2003). As avaliações foram
99 realizadas a intervalos de três dias, até 36 dias após a inoculação (considerando as duas
100 últimas avaliações onde a bactéria não foi isolada), coletando-se folhas e ramos no
101 sentido apical. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro

102 repetições, sendo a unidade experimental constituída pelo par de folhas verdadeiras ou
103 um fragmento de ramo de meloeiro, compreendido entre dois pares de folhas
104 verdadeiras, a ser analisado a cada tempo de amostragem. Este experimento foi
105 realizado duas vezes.

106 Em cada avaliação as amostras foram coletadas, cortadas em pequenos
107 fragmentos, misturadas, pesadas (0,5 g) e adicionadas a 4,5 mL de água destilada
108 esterilizada (ADE) em tubos, os quais foram submetidos a banho de ultra-som (Densply
109 Neytech) por 5 minutos, na potência 10. Em seguida, foram realizadas diluições em
110 série até 10^{-3} , plaqueando-se 10 μ L das suspensões em meio NYDA-Rif, com três
111 repetições. As placas foram incubadas por 36 horas a 30°C, em B.O.D. e a avaliação
112 realizada pela contagem do número de colônias, determinando-se a população
113 bacteriana em UFC g^{-1} de amostra.

114 Em todas as amostragens, para confirmação da colonização epifítica de *AacI*^{Rif}
115 foi realizada a técnica de impressão de folhas ou *imprinting* (Leben, 1961). Amostras de
116 folhas inteiras de meloeiro foram coletadas e tiveram a parte adaxial levemente
117 pressionada sobre a superfície do meio NYDA-Rif. As placas foram incubadas em
118 B.O.D. a 30°C por 36 h e verificada a presença de colônias bacterianas.

119

120 **Colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* em hipocótilo, raízes, folhas cotiledonares,** 121 **folhas verdadeiras e ramos**

122 Sementes de melão tipo Amarelo foram inoculadas pelo método de infiltração a
123 vácuo com o mutante (Somodi *et al.*, 1991). Depois de lavadas em água corrente por 10
124 minutos e secas a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), as sementes foram imersas na
125 suspensão bacteriana ($3,4 \times 10^7$ UFC mL^{-1}) e submetidas a infiltração a vácuo (450 mg
126 de Hg) por dois minutos. Este processo de infiltração foi repetido por duas vezes, sendo
127 as sementes colocadas em pratos plásticos perfurados sobre papel toalha, para secagem
128 por 16 h, à temperatura ambiente. Após este período, foram plantadas em vasos
129 contendo 3,5 kg da mistura solo esterilizado + substrato Tropstrato (Vida Verde) (2:1) e
130 mantidas em casa de vegetação.

131 As avaliações foram realizadas aos 0, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 dias após o
132 plantio. No dia zero (duas horas após a inoculação) foram avaliadas as sementes; aos 6
133 dias, os hipocótilos; aos 9 dias, as raízes; aos 12 dias, folhas cotiledonares; e dos 15 aos
134 30 dias, pares de folhas verdadeiras e ramos intermediários. Em cada avaliação, as
135 amostras foram processadas como descrito anteriormente. O delineamento experimental

136 foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo a unidade experimental
137 constituída pelo órgão do meloeiro a ser analisado, a cada tempo de amostragem.

138

139 **Colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* em estruturas florais**

140 Plantas de meloeiro foram cultivadas em condições de casa de vegetação, e
141 quando iniciaram o seu ciclo reprodutivo flores hermafroditas abertas foram inoculadas,
142 usando um pipetador, pela deposição de 10 µL da suspensão do patógeno em tampão
143 PBS ($3,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹). Às 0, 6, 12, 24, 48 e 96 h após a inoculação, o estigma e
144 estilete de cada flor foram separados, macerados e colocados em eppendorf contendo
145 1mL de PBS com 0,1% de Tween 20, sendo agitados vigorosamente por 5 min (Lessl *et*
146 *al.*, 2007). De cada suspensão, foram feitas diluições seriadas em tampão PBS e
147 plaqueadas em meio NYDA-Rif, sendo as placas incubadas em B.O.D. por 72 h e
148 avaliadas pela contagem do número de colônias. O delineamento experimental foi
149 inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo a unidade experimental
150 constituída pelo estigma ou estilete a ser analisado a cada tempo de amostragem. Este
151 experimento foi repetido três vezes.

152

153 **Análises Estatísticas**

154 A população obtida foi transformada em log₁₀ UFC g⁻¹ de amostra e analisada
155 utilizando regressão linear pelo SAEG[®] 9.0 (Sistema de Análises Estatísticas e
156 Genéticas, Universidade Federal de Viçosa – MG, 2005). Foram calculados também os
157 desvios padrão das médias.

158

159 **Resultados**

160 **Obtenção de mutante de *A. avenae* subsp. *citrulli* resistente ao antibiótico** 161 **rifampicina**

162 Foi obtido o mutante espontâneo *AacI*^{Rif} resistente a 100 ppm de rifampicina, o
163 qual mostrou estabilidade para resistência ao antibiótico. *AacI*^{Rif} não diferiu do isolado
164 selvagem *AacI* de *A. avenae* subsp. *citrulli* quanto ao crescimento em NYD e indução
165 de sintomas de mancha-aquosa em plantas de meloeiro.

166

167 **Colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* em folhas verdadeiras e ramos**

168 No primeiro par de folhas verdadeiras inoculadas com a suspensão de *AacI*^{Rif} a
169 $3,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ ($7,53 \log$ UFC mL⁻¹) foi verificada após 2 h (dia zero) uma

170 população real de $5,8 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de folha (Figura 1). Três dias após a inoculação,
171 ainda no primeiro par de folhas verdadeiras, o tamanho da população permaneceu
172 estável ($5,6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de folha), contudo verificou-se colonização do primeiro ramo
173 intermediário com população de $4,54 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de ramo (Figura 1). Ao longo das
174 avaliações verificou-se, de maneira geral, nas folhas e ramos, um gradiente de
175 decréscimo no tamanho da população, sendo evidenciada, no entanto, uma redução
176 drástica nos terceiro e sexto pares de folhas verdadeiras e ramos intermediários (Figura
177 1).

178 A colonização de *AacI*^{Rif} foi detectada até os 30 dias após a inoculação, no 10º
179 par de folhas verdadeiras, com população de $3,1 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de folha. Nesse mesmo
180 período, observou-se a colonização no segmento de ramo compreendido entre o 10º e
181 11º par de folhas com população de $3,52 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de ramo.

182 A cada amostragem, os estudos de impressão das folhas confirmaram a presença
183 de *AacI*^{Rif} colonizando epifiticamente esse órgão à distância do ponto de inoculação.
184 Em meio de cultura foi verificado crescimento bacteriano agregado em alguns pontos
185 das folhas.

186

187 **Colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* em hipocótilo, raízes, folhas cotiledonares,** 188 **folhas verdadeiras e ramos**

189 Nas sementes inoculadas com *AacI*^{Rif} por infiltração a vácuo, também se
190 verificou após 2 h (dia zero) uma diminuição da população inicial de $7,53 \log \text{ UFC mL}^{-1}$
191 para $5,0 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de semente (Figura 2). A bactéria colonizou hipocótilo e raízes,
192 com populações de $4,45 \log \text{ UFC g}^{-1}$ e $4,34 \log \text{ UFC g}^{-1}$ respectivamente. Nas folhas
193 cotiledonares detectou-se um aumento da população de *A. avenae* subsp. *citrulli* e a
194 partir daí houve colonização das folhas verdadeiras e dos ramos, até atingir níveis não
195 detectáveis aos 30 dias após a inoculação. As últimas populações detectadas, 24 dias
196 após a inoculação, foram de $2,21 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de folha no quarto par de folhas
197 verdadeiras e de $1,96 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de ramo no quarto ramo intermediário, compreendido
198 entre o quarto e quinto pares de folhas (Figura 2).

199 Observando a dinâmica populacional de *AacI*^{Rif} nas folhas e ramos de meloeiro
200 ao longo das avaliações (Figuras 1 e 2), verificou-se uma menor população quando a
201 bactéria foi inoculada nas sementes do que no primeiro par de folhas verdadeiras, sendo
202 as populações nos primeiros pares de folhas dos dois experimentos, respectivamente

203 4,41 log e 5,8 log UFC g⁻¹ de folha, decrescendo a níveis não detectáveis aos 27 e 33
204 dias após a inoculação.

205 Foram verificados sintomas da mancha-aquosa até o quinto ou primeiro pares de
206 folhas verdadeiras de meloeiro (Figuras 1 e 2) respectivamente pela inoculação em
207 folhas e sementes de meloeiro e sintomas não foram evidenciados nas raízes e ramos.
208 Nos hipocótilos e folhas cotiledonares foram observadas lesões encharcadas, que
209 progrediram para marrons. Nas folhas de plantas adultas, as lesões inicialmente foram
210 verde-claras e de aspecto oleoso, tornando-se escuras, com ou sem halo.

211

212 **Colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* em estruturas florais**

213 Nos três experimentos realizados não foi verificada colonização de estigmas e
214 estiletos por *AacI*^{Rif}.

215

216

Discussão

217 A marcação por resistência a rifampicina não afetou a biologia do mutante
218 *AacI*^{Rif} obtido, que se comportou de forma semelhante ao isolado selvagem quanto ao
219 crescimento em meio líquido e patogenicidade a meloeiro. Silva *et al.* (2006) estudando
220 a sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* utilizando um isolado mutante resistente a
221 rifampicina também verificaram esse mesmo comportamento.

222 A diminuição da população de *AacI*^{Rif} no primeiro par de folhas verdadeiras
223 verificada após 2 h de inoculação (Figura 1) em relação à concentração da suspensão
224 aplicada, pode ter ocorrido por deriva, morte de células, adesão de células à superfície,
225 localização em sítios protegidos, penetração e ainda, pouca sensibilidade do método de
226 quantificação para detecção de células viáveis mas não cultiváveis, como verificado em
227 outros patossistemas (Beattie & Lindow, 1999; Pujol *et al.*, 2007).

228 O gradiente de decréscimo no tamanho da população verificado à medida que a
229 bactéria foi colonizando folhas verdadeiras e ramos intermediários, até atingir níveis
230 não detectáveis aos 33 dias após a inoculação (Figura 1), pode estar relacionado ao
231 estágio fenológico da planta. Efeito sistêmico da estrutura da planta sobre o tamanho da
232 população bacteriana epifítica pode também refletir diferenças fisiológicas entre as
233 folhas em função da idade da planta. Kinkel *et al.* (2000) verificaram que folhas velhas
234 de espécies de grama (próximas à base da planta) consistentemente têm maiores
235 populações bacterianas do que folhas jovens no ápice da planta. Isto pode ser atribuído a
236 diferenças na taxa de exsudação de nutrientes correlacionadas com a idade da folha

237 (Weller & Saettler, 1980), micro-climatologia associada com a posição da folha
238 (Burage, 1976), ou incompleta colonização de folhas jovens (Kinkel *et al.*, 2000).
239 Diferenças na posição da folha são fortemente correlacionadas com diferenças na
240 população de bactérias que colonizam folhas individuais, no tempo (Kinkel *et al.*,
241 2000).

242 A redução da população de *AacI*^{Rif} nos terceiro e sexto pares de folhas
243 verdadeiras e ramos intermediários (Figura 1), nos dias que precederam as avaliações,
244 provavelmente resultou de alterações drásticas de temperatura atingindo cerca de 41°C,
245 pois sabe-se que a temperatura ótima para o crescimento do patógeno é de 35°C
246 (Cavalcanti *et al.*, 2005).

247 A impressão das folhas de meloeiro em meio de cultura revelou crescimento
248 bacteriano agregado em alguns pontos das folhas, indicando que a bactéria não coloniza
249 em um padrão uniforme, mas localizada em sítios específicos da superfície foliar. Silva
250 Neto *et al.* (2006) estudaram a colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* em folhas de
251 meloeiro, utilizando a microscopia eletrônica de varredura, e também observaram que
252 as células dessa bactéria se encontram agregadas e raramente isoladas, com fibrilas que
253 proporcionam aderência às células do tecido do hospedeiro, e situam-se
254 predominantemente em locais protegidos do filoplano, tais como depressões existentes
255 entre as células epidermais, base dos tricomas e ao redor e dentro dos estômatos. Outras
256 bactérias, a exemplo de *P. syringae* pv. *syringae* (Mariano & McCarter, 1991a),
257 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Mariano & McCarter, 1991b) e *P. viridiflava*
258 (Mariano & McCarter, 1993) também apresentam esse tipo de colonização em folhas de
259 tomate.

260 Quando *AacI*^{Rif} foi inoculado nas sementes verificou-se a colonização do
261 hipocótilo e raízes, aumento dessa população nas folhas cotiledonares e posterior
262 colonização de folhas verdadeiras e ramos (Figura 2). Apesar da superfície foliar ser
263 considerada um ambiente hostil para colonização bacteriana, por ter limitada fonte de
264 nutrientes, estar exposta à rápida variação de temperatura, umidade relativa e água livre
265 (Lindow & Brand, 2003), *A. avenae* subsp. *citrulli* apresentou maior adaptação a
266 filósfera do que ao hipocótilo e raiz. Silva *et al.* (2006) verificaram que a *A. avenae*
267 subsp. *citrulli* sobreviveu epifiticamente por 54 dias em folhas de meloeiro, em
268 condições de casa de vegetação e campo, com população de 10^3 a 10^4 UFC g⁻¹ de folhas,
269 independente da concentração do inóculo inicial, e nas raízes e rizosfera, nesse mesmo

270 período, em casa de vegetação, com níveis de 10^2 a 10^3 UFC g^{-1} de raiz e 10^1 UFC g^{-1} de
271 solo.

272 A menor população de *AacI*^{Rif} nas folhas e ramos de meloeiro ao longo das
273 avaliações (Figuras 1 e 2) quando a bactéria foi inoculada nas sementes em relação a
274 inoculação nas folhas, pode estar relacionada à população inicial detectada nos
275 primeiros pares de folhas, respectivamente 4,41 e 5,8 log UFC g^{-1} . Também foi
276 evidenciado que nos dois experimentos a bactéria não atingiu as flores.

277 A ausência de sintomas da mancha-aquosa a partir do sexto ou segundo pares de
278 folhas de meloeiro, respectivamente com a inoculação de folhas e sementes, pode ser
279 atribuída a baixa concentração bacteriana detectada, que variou de 3,11 log a 2,77 log
280 UFC g^{-1} de folha ou principalmente devido as condições de molhamento foliar. Isto foi
281 comprovado por Silveira *et al.* (2003) que verificaram sintomas da mancha-aquosa em
282 folhas de meloeiro quando pulverizadas diretamente com uma concentração de $3,4 \times 10^1$
283 UFC mL^{-1} , submetendo-as a uma condição de alto molhamento foliar (câmara-úmida
284 por 48 horas antes e após a inoculação).

285 Populações associadas interna e externamente às folhas têm, provavelmente,
286 uma continuidade em função dos processos de entrada (ingresso) ou saída (egressão)
287 deste órgão. Numerosos estudos sugerem que aplicação do patógeno na superfície
288 resulta em colonização interna (O'Brien & Lindow, 1989; Dane & Shaw, 1996).
289 Considerando que para aplicação de *AacI*^{Rif} no primeiro par de folhas verdadeiras foi
290 utilizada câmara úmida de pré e pós-inoculação, deve ter ocorrido uma considerável
291 multiplicação epifítica e penetração da bactéria pelos estômatos já nas primeiras horas,
292 conforme relatado por Young (1974) e também evidenciado por Silva *et al.* (2006). A
293 egressão também é importante na ecologia de fitopatógenos. Yang *et al.* (2001)
294 verificaram que cerca de 14% da população de *Xanthomonas axonopodis* pv.
295 *malvacearum* estava presente na superfície da folha após infiltração das mesmas,
296 indicando que a egressão é de importância quantitativa na população externa. Este
297 fenômeno também deve ter ocorrido quando as sementes foram inoculadas com *AacI*^{Rif}.

298 Quando inoculado nas flores de melão, *AacI*^{Rif} não foi detectado nos estigmas e
299 estiletos, ao contrário do esperado, uma vez que Lessl *et al.* (2007), utilizando
300 metodologia semelhante, demonstraram que a bactéria pode colonizar flores de
301 melancia polinizadas e não polinizadas, com populações variando de 10^7 a 10^8 UFC g^{-1}
302 por flor, 96 h após a inoculação. O resultado negativo da colonização de estigmas e
303 estiletos por *A. avenae* subsp. *citrulli* pode ser atribuído às temperaturas da casa de

304 vegetação, que variaram de 33 a 38°C, comparadas às condições controladas do referido
305 experimento (temperatura de 25 a 33°C). Essa variação pode ter contribuído para uma
306 baixa sobrevivência da bactéria, que cresce entre 4 a 41°C e apresenta crescimento
307 ótimo a 35°C (Cavalcanti *et al.*, 2005). A flor é considerada um ambiente favorável à
308 colonização por bactérias, uma vez que células papilares sobre os estigmas produzem
309 secreções que contêm carboidratos, proteínas e lipídios (Sedgley, 1982). No entanto, é
310 desconhecido se existe variação entre os exsudados das flores de melancia e melão.
311 Além disso, a microbiota existente nas flores destas duas espécies pode ser diferente e
312 ter influenciado a colonização pelo patógeno que, de acordo com Lessl *et al.* (2007),
313 possui menor capacidade competitiva em relação a outras bactérias epifíticas. A
314 importância do estudo da colonização das flores de melão por *A. avenae* subsp. *citrulli*
315 se deve a capacidade de transmissão da bactéria para as sementes, como já demonstrado
316 em alguns trabalhos com melancia (Walcott *et al.*, 2003; Lessl *et al.*, 2007). Novos
317 estudos precisam ser realizados para esclarecer o papel das flores de melão na
318 patogênese e epidemiologia da mancha-aquosa e, desta forma, subsidiar o manejo da
319 doença na produção de sementes de melão.

320 A capacidade de colonização de *A. avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro é
321 fundamental no ciclo da mancha-aquosa, em função das características de disseminação
322 da bactéria no campo. A partir de plântulas doentes oriundas de sementes infectadas ou
323 infestadas, a bactéria é facilmente disseminada, por respingos de água de chuva e
324 irrigação, aerossóis, insetos, implementos agrícolas e operários de campo, para novas
325 folhas e plantas vizinhas e lesões nas folhas são a principal fonte de inóculo para frutos
326 imaturos (Hopkins, 1993, 1994, 1995; Hopkins *et al.*, 1992; Santos & Viana, 2000).

327 *A. avenae* subsp. *citrulli* colonizou diferentes partes da planta à medida que a
328 mesma foi crescendo e, dependendo da localização do inóculo inicial, foi encontrada até
329 30 dias após a inoculação no 10º par de folhas verdadeiras e 10º ramo intermediário,
330 refletindo o potencial desses órgãos da planta como fonte de inóculo para os frutos.

331

332

Agradecimentos

333 Os autores agradecem ao CNPq (PQ-304313/2005-0) pela concessão de bolsa e
334 a FACEPE (APQ-0350-5.01/06) pelo auxílio financeiro.

335

Referências Bibliográficas

- 336
337 Assis SMP, 1995. *Antagonismo de Bacillus sp., e bactérias endofíticas a Xanthomonas*
338 *campestris pv. campestris (Pammel) Dowson em plantas de couve (Brassica oleraceae*
339 *var. acephala L.)*. Pernambuco, Brasil: Universidade Federal Rural de Pernambuco,
340 Mestre dissertação.
- 341 Beattie GA, Lindow SE, 1999. Bacterial colonization of leaves: A spectrum of
342 strategies. *Phytopathology* **89**, 353-9.
- 343 Burance SW, 1976. Aerial microclimate around plant surfaces. In: Dickinson CH, Preece
344 TF eds. *Microbiology Aerial Plant Surface*. San Francisco: Academic Press, 173-84.
- 345 Cavalcanti MT, Silveira EB, Mariano RLR, Oliveira IV, 2005. Crescimento de
346 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* sob diferentes temperaturas, pH, concentração de
347 cloreto de sódio e fontes de carbono. *Ciência Rural* **35**, 1313-8.
- 348 Dane F, Shaw JJ, 1996. Survival and persistence of bioluminescent *Xanthomonas*
349 *campestris pv. campestris* on host and non-host plants in the field environment. *Journal*
350 *Applied Bacteriology* **80**, 73-80.
- 351 Hopkins DL, 1993. Field spread of bacterial fruit blotch of watermelon. *Phytopathology*
352 **83**, 466.
- 353 Hopkins DL, 1994. Spread of bacterial fruit blotch of watermelon in the greenhouse.
354 *Phytopathology* **84**, 755.
- 355 Hopkins DL, 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon: the hypothetical exam question
356 becomes reality. *Plant Disease* **79**, 761-5.
- 357 Hopkins DL, Stall RE, Latin R, Rushing J, Cook WP, Keinath APB, 1992. *Bacterial*
358 *fruit blotch of watermelon*. Florida: American Sunmelon. (Bulletin).
- 359 Hopkins DL, Cucuzza JD, Waterwon JC, 1996. Wet seed treatments for the control of
360 bacterial fruit blotch of watermelon. *Plant Disease* **80**, 529-32.
- 361 Isakeit T, 1999. Bacterial fruit blotch in watermelon. *The Agricultural Extension*
362 *Service*. [<http://www.cygnus.tamu.edu/extlabn/vegetables/wmelon.htm>] 1996/20000
363 gibbs.
- 364 Kinkel LL, Wilson M, Lindow SE, 2000. Plant species and plant incubation conditions
365 influence variability in epiphytic bacterial population size. *Microbial Ecology* **39**, 1-11.
- 366 Latin RX, 1996. Bacterial fruit blotch of cucurbits. *Plant Health Progress*
367 [<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/management/bacterialblotch>]
368 1996/14000 gibbs.
- 369 Leben C, 1961. Microorganisms on cucumber seedlings. *Phytopathology* **51**, 553-7.

- 370 Lessl JT, Fessehaie A, Walcott RR, 2007. Colonization of female watermelon blossoms
371 by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and the relationship between blossom inoculums
372 dosage and seed infestation. *Journal Phytopathology* **155**, 114-21.
- 373 Lindow SE, Brandl MT, 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and*
374 *Environmental Microbiology* **69**, 1875-83.
- 375 López NI, Haedo AS, Méndez BS, 1999. Evaluation of *Xanthomonas campestris*
376 survival in soil microcosm system. *International Microbiology* **2**, 111-4.
- 377 Mariano RLR, McCarter SM, 1991a. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv.
378 *syringae* on tomato and weeds. *Fitopatologia Brasileira* **16**, 92-7.
- 379 Mariano RLR, McCarter SM, 1991b. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv.
380 *tomato* on tomato and weeds species. *Fitopatologia Brasileira* **16**, 86-92.
- 381 Mariano RLR, McCarter SM, 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on
382 tomato and selected weeds species. *Microbial Ecology* **26**, 47-58.
- 383 O'Brien RD, Lindow SE, 1989. Effect of plant species and environmental conditions on
384 epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. *Phytopathology*
385 **79**, 619-27.
- 386 Pujol M, Badosa E, Montesinos E, 2007. Epiphytic fitness of a biological control agent
387 off fire blight in apple and pear orchards under Mediterranean weather conditions. *FEMS*
388 *Microbial Ecology* **59**, 186-93.
- 389 Sales Júnior R, Menezes JB, 2001. *Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e*
390 *viróticas do cultivo do melão no Estado do RN*. Mossoró, BRA: Escola Superior de
391 Agricultura de Mossoró (Relatório Técnico).
- 392 Santos AA, Viana FM, 2000. *Mancha-aquosa do melão*. Fortaleza, BRA: EMBRAPA –
393 SPI.
- 394 Sedgley, M, 1982. Anatomy of the unpollinate and pollinate watermelon stigma.
395 *Journal Cell Science* **54**, 341-55.
- 396 Silva VAV, Silveira EB, Mariano RLR, 2006. Sobrevivência de *Acidovorax avenae*
397 subsp. *citrulli* em meloeiro. *Fitopatologia Brasileira* **31**, 381-6.
- 398 Silva Neto EB, Silveira EB, Mariano RLR, Nogueira NL, Rossi ML, 2006. Colonização
399 e penetração de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em folhas, sementes e frutos de
400 melão. *Fitopatologia Brasileira* **29**, 54.
- 401 Silveira EB, Michereff SJ, Mariano RLR, 2003. Severidade da mancha-aquosa em
402 meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de
403 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Fitopatologia Brasileira* **28**, 171-5.

404 Somodi GC, Jones JB, Hopkins DL, Stall RE, Kucharek TA, Hodge NC, Watterson JC,
405 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. *Plant Disease* **75**,
406 1053-6.

407 Walcott RR, Gitaitis R, Castro AC, 2003. Role of blossoms in watermelon seed
408 infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* **93**, 528-34.

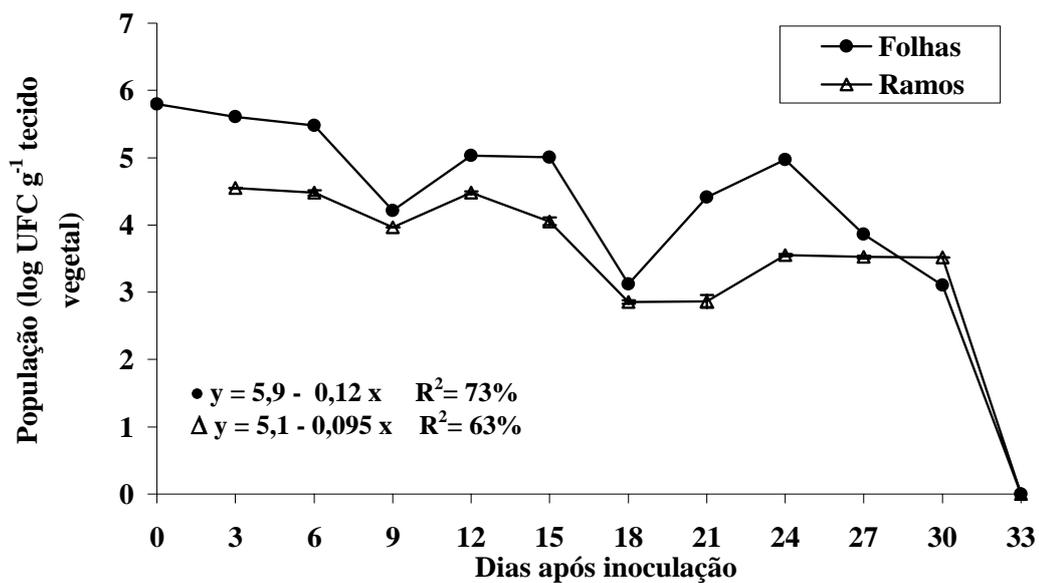
409 Weller DM, Saettler, AW, 1980. Colonization and distribution of *Xanthomonas*
410 *phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field-grown navy beans.
411 *Phytopathology* **70**, 500-6.

412 Yang CH, Crowley DE, Borneman J, Keen NT. 2001. Microbial phyllosphere
413 populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National*
414 *Academy of Sciences* **98**, 3889-94.

415 Young JM, 1974. Development of bacterial populations in vivo in relation to plant
416 pathogenicity. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **17**, 105-13.

417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437

438



439

440

441

442

Par de folhas verdadeiras ou ramo intermediário

443

444 Figura 1 – Colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* resistente a rifampicina

445 (*AacI*^{Rif}) em folhas verdadeiras e ramos intermediários (compreendidos entre dois pares

446 de folhas), a partir da inoculação do primeiro par de folhas verdadeiras, realizada 20

447 dias após o semeio. As observações no primeiro par de folhas verdadeiras foram

448 realizadas no dia zero (2 h após a inoculação) e no terceiro dia. O desvio padrão da

449 média de quatro repetições é representado pelas barras verticais.

450

451

452

453

454

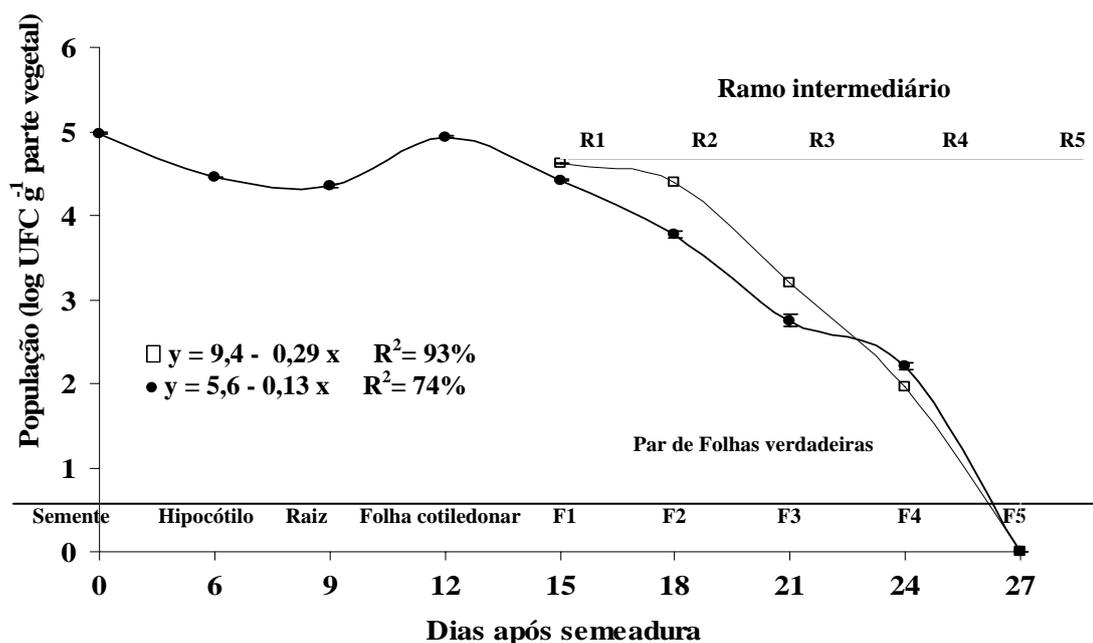
455

456

457

458

459



460
461

462 Figura 2 – Colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* resistente a rifampicina
463 (*AacI*^{Rif}) em hipocótilo, raízes, folhas cotiledonares, folhas verdadeiras e ramos
464 intermediários (compreendidos entre dois pares de folhas), a partir da inoculação nas
465 sementes. A observação na semente foi realizada no dia zero (2 h após a inoculação). O
466 desvio padrão da média de quatro repetições é representado pelas barras verticais.

467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479

Capítulo III

SOBREVIVÊNCIA DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* EM RESTOS DE CULTURA E NO SOLO

Sobrevivência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

em Restos de Cultura e no Solo

Aldenir de Oliveira; André S. Xavier; Ivanise O. Viana; Elineide B. Silveira;

Rosa de L. R. Mariano

A. Oliveira; A. S. Xavier; I. O. Viana; R. L. R. Mariano (✉)

Departamento de Agronomia/Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, 52171-900, Brasil. E-mail: rmariano@truenet.com.br

E. B. Silveira

Departamento de Biologia/Microbiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, 52171-900, Brasil

Resumo A sobrevivência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* $AacI^{Rif}$ foi estudada em restos de meloeiro incorporados ao solo a diferentes profundidades (0, 5, 10 e 15 cm). A influência de diferentes tipos de solo, temperaturas (10, 15, 20, 25, 30 e 35°C) e umidades (50 e 100% da capacidade de campo) na sobrevivência do patógeno foi analisada em solos, na ausência da planta hospedeira. $AacI^{Rif}$ foi detectada em restos de frutos e folhas de meloeiro a 0, 5 e 10 cm durante 21 dias e a 15 cm por 14 dias. As maiores taxas de extinção relativa da população (TERP) ocorreram nos frutos na superfície do solo [0,1464 log (ufc) dia⁻¹] e nas folhas a 10 cm [0,084 log (ufc) dia⁻¹]. $AacI^{Rif}$ sobreviveu nos sete tipos de solo apenas durante três dias e o solo C apresentou a maior TERP [0,9062 log (ufc) dia⁻¹]. Maiores concentrações de Na⁺ e silte bem como maiores populações de actinomicetos e *Trichoderma* estiveram correlacionadas a mais rápida extinção da população de $AacI^{Rif}$ no solo. Para a maioria dos solos, as menores TERP foram atingidas a 10 ou 15°C e as maiores, a 30 ou 35°C. Não houve interação significativa (P=0,05) entre solos e umidade, contudo o teste de T evidenciou diferença significativa (P=0,05) entre as TERP a 100% [0,6685 log (ufc) dia⁻¹] e 50% [0,504591 log (ufc) dia⁻¹] da capacidade de campo. Independente da temperatura e umidade, $AacI^{Rif}$ também sobreviveu nos solos apenas por três dias.

31 **Introdução**

32

33 À semelhança de qualquer fitopatógeno, as bactérias possuem seus mecanismos
34 próprios de sobrevivência, associados ou não ao hospedeiro. Sobrevivem no solo, na
35 superfície de plantas como população residente e em órgãos vegetais infectados como
36 fonte primária de inóculo, incluindo sementes [26]. Segundo Schuster e Coyne [30] é
37 importante conhecer a forma como as bactérias sobrevivem em condições de campo
38 para que medidas eficientes de controle sejam estabelecidas.

39 No campo, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, agente causal da mancha-aquosa
40 em meloeiro (*Cucumis melo*), sobrevive em plântulas voluntárias e em hospedeiras
41 alternativas como as cucurbitáceas nativas melão-de-são-caetano (*Momordica*
42 *charantia*), bucha (*Luffa cylindrica*) [28] e melão-pepino (*Cucumis melo* var.
43 *cantalupensis*) [23]. Em folhas de meloeiro, em casa de vegetação e campo, um mutante
44 *AacI*^{Rif} sobreviveu epifiticamente por 54 dias, com população de 10^3 a 10^4 ufc g⁻¹ de
45 folhas, independente da concentração do inóculo inicial, e nas raízes e rizosfera, em
46 casa de vegetação, por 60 dias após a infestação do solo, com níveis de 10^2 a 10^3 ufc g⁻¹
47 de raiz e 10^1 ufc g⁻¹ de solo [31]. Esse patógeno sobreviveu durante seis meses em
48 sementes de melão tipo Amarelo armazenadas em condições de laboratório procedentes
49 de frutos infectados de áreas produtoras [22] e por 12 meses em sementes de melancia
50 [10]. Em bandejas plásticas vazias, utilizadas na produção de mudas de melancia em
51 casa de vegetação, *A. avenae* subsp. *citrulli* sobreviveu por até 63 dias, em resíduos de
52 substrato e raízes [13].

53 Em meloeiro, não foram encontradas informações sobre a sobrevivência de *A.*
54 *avenae* subsp. *citrulli* no solo sem planta hospedeiras ou em restos de cultura deixados
55 no campo, embora segundo Isakeit [11] o patógeno aparentemente sobreviva no solo
56 por poucas semanas durante o verão, na ausência de melancieira. Em restos de cultura, a
57 bactéria foi recuperada de fragmentos de casca de melancia enterrados por 10 meses a
58 uma profundidade de 20 a 30 cm [13].

59 Precisam também ser determinados os fatores do solo que interferem na
60 sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli*, pois sabe-se que a sobrevivência de bactérias
61 neste habitat é influenciada pela temperatura, umidade e características químicas e
62 físicas do solo [7]. Outro fator que pode influir na permanência de bactérias no solo é a
63 microbiota nativa. Assim, foi evidenciado que o rápido declínio na população de

64 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* no solo pode ser devido a presença de
65 organismos autóctones, como bactérias, fungos e actinomicetos [21].

66 A mancha-aquosa é uma doença devastadora para a cultura do meloeiro,
67 podendo causar perdas de até 100% na produção, afetando principalmente os frutos [28,
68 32]. Em regiões produtoras de melão algumas questões são frequentemente levantadas.
69 Folhas e frutos infectados com *A. avenae* subsp. *citrulli* deixados no campo podem
70 servir como fonte de inóculo primário para novos plantios? Na entressafra ou no pousio,
71 a bactéria pode permanecer no solo na ausência de restos culturais? Uma maior
72 compreensão da ecologia de *A. avenae* subsp. *citrulli* trará subsídios para o
73 desenvolvimento de novas estratégias de manejo da mancha-aquosa, uma vez que até o
74 momento não existe controle efetivo para essa doença.

75 Diante da necessidade de esclarecer esses aspectos da ecologia de *A. avenae*
76 subsp. *citrulli*, o presente trabalho teve como objetivo estudar a sobrevivência da
77 bactéria em restos de folhas e frutos incorporados ao solo a diferentes profundidades e
78 em solos na ausência da planta hospedeira, sob a influência de diferentes tipos de solo,
79 temperaturas e umidades.

80

81 **Material e Métodos**

82

83 **Sobrevivência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em Restos de Cultura no Solo**

84

85 A sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* foi estudada a partir de um mutante
86 resistente a 100 ppm de rifampicina (*AacI*^{Rif}), estável e capaz de induzir sintomas de
87 mancha-aquosa em plantas de meloeiro [24]. Para produção de material vegetal com
88 sintomas, plantas de meloeiro Amarelo híbrido AF-646 (Sakata) com 20 dias de idade
89 tiveram as folhas definitivas inoculadas por pulverização até o escorrimento [32] e os
90 frutos inoculados pelo método de injeção subepidérmica [35]. Foi utilizada uma
91 suspensão de *AacI*^{Rif} ajustada em fotocolorímetro (Metronic M3) para uma
92 concentração de $3,4 \times 10^7$ ufc mL⁻¹, adicionando-se Tween 20 (0,05%).

93 Das folhas e frutos com sintomas de mancha-aquosa foram pesadas 10-g de
94 tecido, as quais foram colocadas individualmente em sacolas de malha plástica (2x2
95 mm) [5] e incorporadas ao solo (pH 5,1; P = 6 mg dm⁻³; Na = 0,31 mg dm⁻³; K = 0,03
96 mg dm⁻³; Ca + Mg = 1,45 mg dm⁻³; Ca = 0,9 mg dm⁻³; Al = 0,25 mg dm⁻³; H + Al = 5,2
97 mg dm⁻³; C.O. = 11,52 mg dm⁻³; M.O. = 19,86 mg dm⁻³) às profundidades de 0, 5, 10 e

98 15 cm, em colunas plásticas medindo 20 cm. Semanalmente, as sacolas foram retiradas
99 dos vasos, pesando-se 1-g de material vegetal, colocando-se em 9 mL de água destilada
100 esterilizada (ADE) e submetendo-se a banho de ultra-som (Densply Neytech, USA) por
101 5 minutos, na potência 10. Em condições assépticas, foram realizadas diluições na base
102 10 até 10^{-3} , plaqueando-se 10 μL das suspensões em meio NYDA-Rif (20-g ágar
103 nutritivo; 10-g glicose; 5-g extrato de levedura; 3-g extrato de carne; 5-g peptona de
104 carne; 100 ppm de rifampicina) com 0,2% de fluconazol (p/v), com três repetições. As
105 placas foram incubadas por 36h a 30°C em B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand)
106 (Tecnal, BRA). As avaliações foram realizadas pela contagem do número de colônias
107 determinando-se o número de ufc g^{-1} de solo. As amostras foram processadas até que em
108 duas amostragens consecutivas a bactéria não fosse detectada. Os dados populacionais
109 de *AacI*^{Rif} foram utilizados para o cálculo da taxa de extinção relativa da população
110 (TERP), determinada pela expressão $\text{TERP} = - [(\log Y_f - \log Y_0)/(T_f - T_0)]$, onde Y_0 é a
111 população na primeira avaliação, Y_f a população na última avaliação antes de zerar, T_f o
112 tempo (em dias) da última avaliação antes de zerar e T_0 o tempo da primeira avaliação
113 [12].

114 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro
115 tratamentos para folhas ou frutos, representados pelas profundidades de distribuição das
116 sacolas no solo e cinco repetições, sendo cada repetição constituída por uma sacola
117 contendo material vegetal. O experimento foi realizado duas vezes.

118

119 Influência do Tipo de Solo na Sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* sob Condições
120 Controladas

121

122 Sete diferentes tipos de solos (Solo A: textura argila-arenosa, Quixeré – CE; Solo B:
123 textura franca-argila-arenosa, Mossoró – RN; Solo C: textura argila-arenosa, Quixeré –
124 CE; Solo D: textura argila-arenosa, Mossoró – RN; Solo E: textura areia-franca,
125 Baraúna – RN; Solo F: textura areia-franca, Mossoró – RN; Solo G: textura franca-
126 argila-arenosa, Mossoró – RN) de áreas de plantio de meloeiro nos Estados do Rio
127 Grande do Norte e Ceará, todos com relato de incidência da mancha-aquosa, foram
128 coletados durante o mês de outubro de 2007, de cada local foram removidos,
129 aleatoriamente, 2-kg de solo a uma profundidade de 0-20 cm.

130 Para avaliar a sobrevivência de *AacI*^{Rif} os solos foram pesados (200-g) e
131 colocados em caixas Gerbox, adicionando-se 50 mL de suspensão de *AacI*^{Rif} a $3,4 \times 10^9$

132 ufc mL⁻¹ e homogeneizando-se com auxílio de bastão de vidro. As caixas foram
133 incubadas em B.O.D. a temperatura constante de 30°C. Para avaliação dos níveis
134 populacionais do patógeno, amostras de 1-g de solo foram processadas diariamente, de
135 acordo com metodologia descrita no experimento anterior. O delineamento
136 experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições,
137 sendo cada repetição constituída por uma caixa Gerbox.

138 Para as análises microbiológicas, 72h após a coleta, de cada solo foram retiradas
139 10 sub-amostras de 10-g, os quais após homogeneização sofreram diluições em ADE
140 (1:10) e distribuição em diferentes meios de cultura. Utilizou-se meio BDA com adição
141 de 250 ppm de tetraciclina, para o isolamento de fungos totais; NYDA, para o
142 isolamento de bactérias totais; meio B de King, para o isolamento de *Pseudomonas* spp.
143 fluorescentes; meio de amido-caseína-ágar, seletivo para *Actinomicetos* spp.; e meio de
144 Martin, para isolamento seletivo de *Trichoderma* spp.. No isolamento de *Bacillus* spp.
145 as diluições foram submetidas a banho-maria de 80°C por 20 min, com posterior
146 distribuição em meio BDA, sem adição de antibiótico. As placas foram incubadas a
147 25±2°C, sob alternância luminosa (12h claro/12h escuro), em B.O.D. As bactérias foram
148 avaliadas após 48h, enquanto que os actinomicetos e fungos foram avaliados após cinco
149 dias, e cada população resultou do número médio de colônias em três placas, sendo
150 expressas em ufc g⁻¹ de solo.

151 As análises físicas e químicas foram realizadas nos Laboratórios de Física e de
152 Fertilidade dos Solos da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Foram
153 determinadas a granulometria; pH em água; P disponível (mg dm⁻³); Na, K, Ca + Mg,
154 Ca e Al trocáveis (cmolc dm⁻³); acidez potencial (H + Al); C orgânico; e matéria
155 orgânica (g kg⁻¹) [8].

156

157 Influência da Temperatura na Sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* em Solo sob
158 Condições Controladas

159

160 Os solos (200-g) foram colocados em caixas Gerbox adicionando-se 50 mL de
161 suspensão de *AacI*^{Rif} a 3,4x10⁹ ufc mL⁻¹ e homogeneizando-se com auxílio de bastão de
162 vidro. As caixas foram incubadas em B.O.D. as temperaturas constantes de 10, 15, 20,
163 25, 30 e 35°C, e as amostras processadas diariamente conforme já descrito. O
164 delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 7 x 6,

165 representado por sete tipos de solo e seis temperaturas, com quatro repetições, sendo
166 cada repetição constituída por uma caixa Gerbox.

167

168 Influência da Umidade na Sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* sob Condições
169 Controladas

170

171 Os solos (200-g) foram colocados em caixas Gerbox e mantidos na capacidade de
172 campo e a 50% da capacidade de campo, determinadas pelo peso constante. Adicionou-
173 se então a cada solo 50 mL da suspensão de *AacI*^{Rif} a $3,4 \times 10^9$ ufc mL⁻¹,
174 homogeneizando-se com auxílio de bastão de vidro. As caixas foram incubadas em
175 B.O.D. a temperatura constante de 30°C e as amostras processadas diariamente como
176 descrito anteriormente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em
177 arranjo fatorial 7 x 2, representado por sete tipos de solo e duas umidades, com quatro
178 repetições, sendo cada repetição constituída por uma caixa Gerbox.

179

180 Análises Estatísticas

181

182 As TERP obtidas nos experimentos foram submetidas à análise de variância para
183 comparação das médias pelo teste de Duncan ou Teste de T; e/ou análise de correlação
184 de Person, ao nível de 5% de probabilidade, calculando-se também os desvios padrão
185 das médias. Os dados foram analisados pelo SAEG[®] 9.0 (Sistema de Análises
186 Estatísticas e Genéticas, Universidade Federal de Viçosa – MG, 2005).

187

188 **Resultados**

189

190 Sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* em Restos de Cultura no Solo

191

192 Nos dois experimentos em que foi analisada a sobrevivência de *AacI*^{Rif} em restos de
193 cultura incorporados a diferentes profundidades, as condições climáticas na casa de
194 vegetação foram semelhantes, com temperaturas de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de
195 $90 \pm 3\%$. A bactéria sobreviveu nos restos de frutos e folhas de meloeiro às
196 profundidades de 0, 5 e 10 cm durante 21 dias e a 15 cm por 14 dias (Fig. 1a e b).

197

198 Em restos de frutos de melão, aos sete e 14 dias, nas profundidades de 0 e 5
foram encontradas maiores populações de *AacI*^{Rif} do que nas profundidades de 10 e 15

199 cm. Neste tecido, aos 21 dias, as populações a 0, 5 e 10 cm foram semelhantes,
200 respectivamente 3,86; 3,66 e 3,3 log ufc g⁻¹ de tecido, enquanto que a bactéria não foi
201 mais detectada a 15 cm (Fig. 1a).

202 Em restos de folha, aos sete e 14 dias as populações foram semelhantes em todas
203 as profundidades; enquanto que aos 21 dias, a população de *AacI*^{Rif} a 10 cm declinou
204 consideravelmente (3,38 log ufc g⁻¹ de tecido) em relação às profundidades 0 e 5 cm
205 (4,27 e 4,16 log ufc g⁻¹ de tecido), não sendo detectada a 15 cm. Aos 28 dias, não foram
206 detectadas populações do patógeno em nenhuma das profundidades.

207 As maiores e menores TERP de *AacI*^{Rif} foram constatadas respectivamente em
208 restos de frutos [0,1464 e 0,1414 log (ufc) dia⁻¹] e de folhas [0,029 e 0,037 log (ufc)
209 dia⁻¹] nas profundidades de 0 e 5 cm. As TERP nos dois tipos de tecidos foram muito
210 semelhantes a 10 e 15 cm (Fig. 2). É importante salientar que a maior TERP para restos
211 de folhas [0,084 log (ufc) dia⁻¹] foi observada a 10 cm (Fig. 1b).

212

213 Influência do Tipo de Solo na Sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* sob Condições
214 Controladas

215

216 Independente do tipo de solo *AacI*^{Rif} sobreviveu nos sete solos de cultivo de meloeiro
217 por apenas três dias, no entanto, as TERP variaram de 0,5061 a 0,9062 log (ufc) dia⁻¹,
218 sendo formados três grupos de solos pelo teste de Duncan (P=0,05). A maior TERP foi
219 observada no solo C e as menores, nos solos E e G (Tab. 1).

220 Na análise dos possíveis indicadores que influenciaram a sobrevivência de
221 *AacI*^{Rif} nos diferentes solos, foram constatadas correlações significativas (P=0,05) entre
222 a TERP e características químicas, físicas e microbiológicas do solo. A TERP se
223 correlacionou positivamente com concentração de Na⁺ (r = 0,86) e silte (r = 0,86), e
224 população de actinomicetos (r = 0,93) e *Trichoderma* (r = 0,82) nos solos. Esses
225 resultados indicam que quanto maior a concentração de sódio (Na⁺) e silte bem como as
226 populações de actinomicetos e *Trichoderma*, mais rapidamente se extingue a população
227 da bactéria no solo (maior TERP) o que pode ser verificado comparando os solos C, E e
228 G (Tab. 1). A eficiência desses fatores do solo na extinção da população da bactéria
229 também foi correlacionada positiva ou negativamente com outras características do
230 solo: Na⁺ com silte (r = 0,82), areia com silte (r = - 0,82), argila com silte (r = 0,71),
231 silte com actinomicetos (r = 0,83), *Pseudomonas* com actinomicetos (r = - 0,79) e
232 actinomicetos com *Trichoderma* (r = 0,082).

233 Influência da Temperatura na Sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* em Solo sob
234 Condições Controladas

235

236 A temperatura não afetou o tempo de sobrevivência de *AacI*^{Rif} nos diferentes solos e,
237 confirmando-se o experimento anterior, o tempo necessário para extinção da população
238 da bactéria foi de três dias. No entanto, a temperatura interferiu na TERP de *AacI*^{Rif},
239 indicando as melhores e piores faixas de temperatura para sobrevivência desse patógeno
240 (Fig. 3).

241 Para a maioria dos solos, as menores TERP foram atingidas a 10 ou 15°C e as
242 maiores, a 30 ou 35°C. A bactéria se comportou de forma semelhante ao experimento
243 anterior, apresentando as maiores TERP no solo C [média de 1,11 log (ufc) dia⁻¹] e as
244 menores nos solos E [média de 0,89 log (ufc) dia⁻¹] e G [média de 0,78 log (ufc) dia⁻¹].
245 No solo C, a TERP aumentou de acordo com a temperatura, ou seja, a maior
246 sobrevivência de *AacI*^{Rif} foi na temperatura de 10°C e menor a 35°C, enquanto que nos
247 solos E e G as TERP caíram a 25°C e 30°C e apresentaram o maior valor a 35°C (Fig.
248 3).

249

250 Influência da Umidade na Sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* sob Condições
251 Controladas

252

253 Na análise de variância não foi constatada interação significativa (P=0,05) entre solos e
254 umidade. Independente da umidade houve diferença significativa nas TERP de *AacI*^{Rif}
255 nos sete solos (dados não apresentados), confirmando os resultados obtidos
256 anteriormente.

257 O teste de T mostrou diferença significativa (P=0,05) entre as TERP nas
258 umidades de 100% [0,6685 log (ufc) dia⁻¹] e 50% [0,504591 log (ufc) dia⁻¹] da
259 capacidade de campo, sendo mais rápida a extinção da população da bactéria quando o
260 solo se encontrava a 100%. Independente da umidade, *AacI*^{Rif} também sobreviveu nos
261 solos apenas por três dias.

262

263 **Discussão**

264

265 No presente estudo foi demonstrado que restos de folhas e frutos são importantes fontes
266 de inóculo de *A. avenae* subsp. *citrulli* para novos plantios, por um período de 21 dias
267 se localizados de 0 a 10 cm e por 14 dias quando a 15 cm.

268 Em restos de frutos, as maiores populações da bactéria foram detectadas a 0 e 5
269 cm (Fig. 1a) e as maiores TERP de *AacI*^{Rif} também foram observadas nessas
270 profundidades (Fig. 2), logicamente por que as populações finais a 0, 5 e 10 cm no
271 vigésimo primeiro dia foram semelhantes. Isto significa que o declínio populacional a 0
272 e 5 cm foi muito mais intenso. No solo existe uma pequena atividade de
273 microrganismos degradadores a 0 e 5 cm [18], o que possibilitou uma maior
274 colonização de *AacI*^{Rif} a essa profundidade do que a 10 e 15 cm até os 14 dias.
275 Entretanto, com o passar do tempo e decomposição da polpa do fruto, restou o tecido da
276 casca desidratado, inóspito à sobrevivência da bactéria, principalmente quando na
277 superfície do solo. Nas outras profundidades, a manutenção do teor de umidade
278 possivelmente favoreceu a atividade saprofítica dos habitantes do solo no decorrer do
279 experimento. Desta forma, ocorreu um decréscimo acentuado da população aos 21 dias
280 em todas as profundidades, até total extinção aos 28 dias (Fig. 1a). Os saprófitas são
281 mais hábeis do que os patógenos para colonizar substratos, produzir antibióticos e
282 tolerar antibióticos produzidos por competidores [27].

283 Em restos de folhas, pode-se atribuir a menor influência da profundidade de
284 incorporação nas populações (Fig. 1b) e TERP de *AacI*^{Rif} (Fig. 2), principalmente aos 7
285 e 14 dias, à maior uniformidade do tecido foliar (limbo e nervuras) em relação ao tecido
286 do fruto (casca e polpa), sendo a polpa mais facilmente degradável, devido ao maior
287 teor de água. O pequeno tempo de sobrevivência de *AacI*^{Rif} em restos de cultura
288 observado no presente trabalho pode variar dependendo da microbiota e do tipo de solo,
289 da cucurbitácea hospedeira e das condições climáticas. Assim, Latin et al. [13]
290 verificaram uma maior sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* em fragmentos de
291 casca de melancia enterrados por 10 meses a uma profundidade de 20 a 30 cm.

292 A maior TERP foi verificada quando o tecido foliar foi incorporado aos 10 cm.
293 Esse efeito, provavelmente, foi devido ao maior contato dos restos culturais com o
294 ambiente do solo, que a partir dos 10 cm apresenta flutuações ambientais menos
295 bruscas, propiciando maior equilíbrio na população e atividade microbiana, refletindo
296 na decomposição mais acelerada dos restos de cultura e na menor sobrevivência do
297 patógeno [25]. Além disso, a incorporação a 10 cm ou mais favorece a perda mais
298 rápida da viabilidade das células por submetê-las a uma maior umidade do solo, que se

299 eleva à medida que aumenta a profundidade. As menores TERP de *AacI*^{Rif} nos restos
300 foliares depositados a 0 e 5 cm, pode ser decorrente da pequena atividade de
301 microrganismos degradadores, que aumenta gradativamente até 10 cm de profundidade
302 [18].

303 Vários outros relatos de bactérias que causam doenças foliares confirmam uma
304 maior sobrevivência na superfície do solo. Phad e Kore [19] constataram que
305 *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* sobreviveu melhor em restos foliares de soja
306 (*Glycine max*) mantidos na superfície (150 dias) do que quando esses órgãos estavam
307 enterrados (33 dias) e permaneciam em contato com a microbiota do solo. Groth e
308 Braun [9] estudando o mesmo patossistema confirmaram que a sobrevivência do
309 patógeno foi maior na superfície do que a 10 cm de profundidade. Os patógenos foliares
310 de crucíferas *X. campestris* pv. *armoraciae* e *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*
311 sobreviveram em restos de cultura de nabo (*Brassica rapa*) e repolho (*B. oleracea*)
312 enterrados por 60 dias, mesmo quando estes foram decompostos, enquanto que os restos
313 mantidos na superfície foram recuperados até 150 dias [37].

314 A profundidade de incorporação dos restos de frutos e folhas de meloeiro
315 infectado influenciou diretamente nas populações e TERP de *AacI*^{Rif}, ilustrando o efeito
316 benéfico ou não da incorporação na redução da capacidade de resíduos infestados
317 suportarem a sobrevivência do patógeno. Apesar das mais altas TERP para restos de
318 frutos e de folhas terem ocorrido respectivamente a 0-5 e 10 cm, é mais importante
319 considerar que apenas a 15 cm populações da bactéria não foram mais detectadas aos 21
320 dias.

321 Enquanto que em restos de cultura no solo *AacI*^{Rif} sobreviveu por 21 dias, na
322 ausência da planta hospedeira, independente do tipo, temperatura e umidade do solo, o
323 patógeno foi detectado apenas por três dias, indicando limitada capacidade de
324 sobrevivência no solo sob condições tropicais. Silva et al. [31] evidenciaram que *A.*
325 *avenae* subsp. *citrulli* sobreviveu melhor nas folhas do que nas raízes e rizosfera de
326 meloeiro em condições de casa de vegetação e campo. Estes resultados permitem
327 sugerir que *A. avenae* subsp. *citrulli* é, provavelmente, um patógeno foliar, enquadrado
328 no grupo A da classificação de Buddenhagen [4] cujas populações são desenvolvidas
329 quase exclusivamente no hospedeiro, sendo a fase no solo de rápido declínio, não
330 contribuindo para a propagação da doença de um estação para outra.

331 De acordo com a TERP de *AacI*^{Rif}, os sete solos estudados foram separados em
332 três grupos (Tab. 1), não sendo, porém pertinente classificá-los em supressivos ou

333 conduzivos uma vez que a bactéria sobreviveu, indistintamente do tipo de solo, apenas
334 durante três dias. No entanto, algumas características químicas, físicas e biológicas dos
335 solos se correlacionaram com a TERP, sendo possivelmente as causas do rápido
336 declínio da população do patógeno no solo C. Estas características foram as elevadas
337 concentrações de sódio (Na^+) e silte e as altas populações de actinomicetos e
338 *Trichoderma*, que merecem ser comentadas.

339 A célula bacteriana mantém seu equilíbrio osmótico pelo bombeamento
340 constante de prótons e outros íons (Na^+) para o exterior, através das proteínas de
341 transporte localizadas na membrana citoplasmática [29]. Assim, uma maior quantidade
342 de Na^+ no solo pode levar ao desequilíbrio no metabolismo celular.

343 Solos com teores muito altos de silte dificultam a infiltração de água em
344 profundidade [20] e conseqüentemente a disponibilidade desta para os microrganismos.
345 No presente estudo, a presença de silte foi correlacionada significativa e positivamente
346 com a quantidade de argila. Sabe-se que o potencial eletromagnético das argilas
347 promove a desnaturação de proteínas, afetando assim a nutrição e fenômenos de
348 superfície (floculação e adsorção) das células microbianas no sistema solo (Tab. 1).
349 Verificou-se também que o solo C apresentou a maior quantidade de argila 47,20% do
350 que os solos E e G [34].

351 A elevada correlação entre TERP e populações microbianas no solo era
352 esperada. Bactérias do grupo dos actinomicetos e diversas espécies de *Trichoderma* são
353 abundantes nos solos tropicais. Populações de actinomicetos atuam por antibiose,
354 parasitismo, indução de autólise, produção de outras substâncias tóxicas ou inibidores
355 voláteis e, ainda, inibidores de atividade enzimática, e *Trichoderma* pela produção de
356 metabólitos voláteis, não voláteis, hiperparasitismo e competição por nutrientes, espaço
357 e oxigênio. Ambos são considerados saprófitas potentes e eficientes por atuarem como
358 antagonistas de alguns fitopatógenos de importância econômica, e também por
359 promoverem o crescimento de plantas [16]. Alvarado et al. [1] verificaram que uma
360 maior taxa de extinção de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc127^{Rif})
361 em diferentes solos estava correlacionada à população de bactérias totais e *Bacillus*
362 spp.. Entretanto, o balanço microbiano e a eficiência de um antagonista são dependentes
363 das características físico-químicas do solo, sendo difícil separar os fatores envolvidos na
364 supressividade [36], o que ficou evidente no presente estudo com a constatação de
365 correlações significativas entre a concentração de silte e actinomicetos ($r = 0,83$),
366 *Pseudomonas* e actinomicetos ($r = - 0,79$), actinomicetos e *Trichoderma* ($r = 0,082$).

367 Uma vez que *AacI*^{Rif} não sobreviveu no solo de cultivo de meloeiro na ausência
368 de planta hospedeira por mais de três dias, o solo não é uma fonte potencial de inóculo
369 primário para infecções na parte aérea das plantas. Em campos de melancia, o
370 patógeno sobrevive no solo por poucas semanas durante o verão na ausência da planta
371 [11]. Acredita-se que a maioria das bactérias patogênicas que incitam enfermidades não-
372 sistêmicas no filoplano, encontram dificuldade de sobreviver no solo sem planta
373 hospedeira, pois a flora microbiana deste exerce, via de regra, considerável antagonismo
374 sobre elas [26].

375 A temperatura é um dos fatores mais importantes do ambiente, pois influencia a
376 absorção de nutrientes, o crescimento e a sobrevivência dos organismos, determinando
377 de modo geral a velocidade das reações metabólicas, por atuar na atividade enzimática
378 [3]. A faixa de temperatura de 30 e 35°C é considerada ótima para o desenvolvimento
379 da mancha-aquosa em frutos de melão [33] e crescimento de *A. avenae* subsp. *citrulli*
380 em meio de cultura [6]. No entanto, verificou-se, de maneira geral, uma maior TERP da
381 bactéria nas temperaturas 30-35°C e uma menor, a 10°C. Temperaturas amenas reduzem
382 a atividade microbiana, enquanto temperaturas elevadas provocam o oposto [2]. Sendo
383 assim, tanto o patógeno quanto os antagonistas presentes no solo teriam uma maior
384 atividade a 30-35°C, contudo, estando os últimos mais adaptados a esse habitat, foram
385 favorecidos em detrimento da sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli*. Este fato
386 provavelmente não aconteceria em frutos de melão ou meio de cultura, onde o patógeno
387 possui todas as condições favoráveis para a infecção do tecido e para o crescimento
388 celular.

389 A menor sobrevivência de *AacI*^{Rif} no solo com 100% da capacidade de campo
390 pode ser atribuída a condição de menor aeração do solo. Os microrganismos aeróbicos
391 requerem O₂ como receptor terminal de elétrons no metabolismo [34] e em solos
392 inundados ocorre acumulação de produtos oriundos de processos fermentativos como
393 compostos orgânicos de cadeia curta e compostos inorgânicos reduzidos que podem se
394 acumular em concentrações tóxicas, causando danos aos microrganismos [18]. Destaca-
395 se também que o solo a apresentar maior TERP foi novamente o solo C, que contém
396 alto teor de silte e argila (Tab. 1) e, conseqüentemente maior capacidade de retenção de
397 água.

398 A umidade do solo regula diretamente as atividades da microbiota do solo, tais
399 como, germinação, viabilidade e agressividade patogênica [17]. Levick et al. [14],
400 estudando a sobrevivência da bactéria *Streptomyces scabies* no solo, verificaram maior

401 incidência da sarna em condição de 50% de potencial mátrico, características do solo
402 úmido com drenagem deficiente. Meikle et al. [15] verificaram que o potencial mátrico
403 (30 – 750 e 1500 kPa) não influenciou na sobrevivência de *Pseudomonas fluorescens* no
404 solo, num período de incubação de 3 meses, apesar de se conhecer os efeitos do estresse
405 mátrico na fisiologia das células e difusão de nutrientes. Entretanto, quando a
406 quantidade de água no solo aumentou, a sobrevivência foi relativamente menor.

407 O solo não deve ser considerado como fonte de inóculo primário deste patógeno
408 uma vez que a sobrevivência de *A. avenae* subsp. *citrulli* foi verificada por apenas três
409 dias na ausência da planta hospedeira. Recomenda-se que o manejo da mancha-aquosa
410 em meloeiro passe a incluir a incorporação dos restos culturais por gradagem e
411 manutenção de um intervalo mínimo de 28 dias entre cultivos.

412

413 **Agradecimentos** Os autores agradecem ao CNPq (PQ-304313/2005-0) pela concessão
414 de bolsa e a FACEPE (APQ-0350-5.01/06) pelo auxílio financeiro.

415

416 **Referências Bibliográficas**

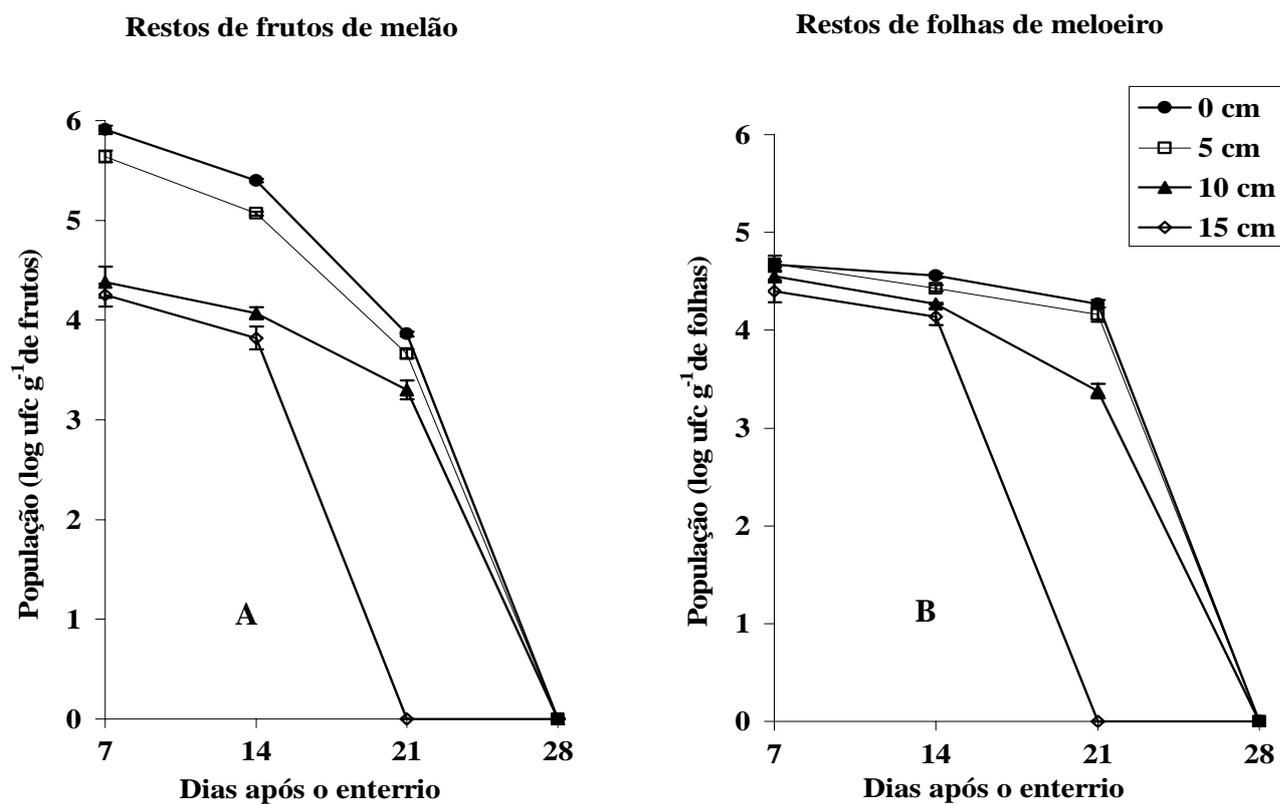
417

- 418 1. Alvarado ICM, Michereff SJ, Mariano RLR, Silva AMF, Nascimento CWA
419 (2007) Caracterização de solos de Pernambuco quanto à supressividade a
420 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Fitopatol Bras 32:222-228
- 421 2. Baird RE, Phillips DV, Mullinix BG, Alt PJ (1999) Relative longevity of
422 *Leptosphaeria maculans* and associated mycobiota on canola debris.
423 Phytoprotection 80:1-11
- 424 3. Barbosa HR, Torres BB (1998) Nutrição. In: Barbosa HR, Torres BB (Eds.)
425 Microbiologia básica, Atheneu, São Paulo, pp 89-101
- 426 4. Buddenhagen IW (1965) The relation of plant- pathogenic bacteria to the soil. In:
427 Baker KF, Snyder WC (Eds.) Ecology of soil-borne plant pathogens, University
428 of California Press, Berkeley, pp 269-84
- 429 5. Casa RT, Reis EM, Zambolim L (2003) Decomposição dos restos culturais do
430 milho e sobrevivência saprofítica de *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*.
431 Fitopatol Bras 4:355-361
- 432 6. Cavalcanti MT, Silveira EB, Mariano RLR, Viana IO (2005) Crescimento de
433 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* sob diferentes temperaturas, pH, concentrações
434 de cloreto de sódio e fontes de carbono. Cienc Rural 35:1313-1318

- 435 7. De Boer SH (1982) Survival of phytopathogenic bacteria. In: Mount MS, Lacy
436 GH (Eds.) Phytopathogenic prokaryotes, Academic Press, New York, pp 285-306
- 437 8. Embrapa (1997) Manual de Métodos de Análises de Solo 2
- 438 9. Groth DE, Braun EJ (1989) Survival, seed transmission, and epiphytic
439 development of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in the north-central United
440 States. Plant Dis 73:328-330
- 441 10. Hopkins DL, Cucuzza JD, Waterwon JC (1996) Wet seed treatments for the
442 control of bacterial fruit blotch of watermelon. Plant Dis 80:529-532
- 443 11. Isakeit T (1999) Bacterial fruit blotch in watermelon. Texas: The Agricultural
444 Extension Service-USA (Publication L-5222)
- 445 12. Kocks CG (1998) Survival and extinction of *Xanthomonas campestris* pv.
446 *campestris* in soil. Eur J Plant Pathol 104:911-923
- 447 13. Latin RX, Tikhonova I, Rane K (1995) Factors affecting the survival and spread
448 of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon transplant production
449 facilities. Phytopathology 85:1413-1417
- 450 14. Levick DR, Evans TA, Stephens CT, Lacy ML (1985) Etiology of radish scab and
451 its control through irrigation. Phytopathology 49:323-456
- 452 15. Meikle A, Amin-Hanjani S, Glover LA, Killham K, Prosser JI (1995) Matric
453 potential and the survival and activity of *Pseudomonas fluorescens* inoculum in
454 soil. Soil Biol Biochem 27:881-891
- 455 16. Melo AMT, Nagai H, Trani PE (1998) Melão: *Cucumis melo*. In: Fahl JI, De
456 Camargo MBP, Pizzinato MA, Betti JA, Melo AMT, DeMaria IC, Furlani AMC
457 (Eds.). Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas, (IAC Boletim
458 200), 6 ed, Instituto Agronômico, Campinas, pp 219-221
- 459 17. Mondal SN, Kageyama K, Hyakumachi M (1995) Influence of soil matric
460 potential on the debilitation of oospores of *Pythium aphanidermatum*. Soil Biol
461 Biochem 27:1319-1324
- 462 18. Moreira FMS, Siqueira JO (2005) Microbiologia e bioquímica do solo, UFPA,
463 Lavras
- 464 19. Phad HB, Kore SS (1989) Host range and sources of survival for *Xanthomonas*
465 *campestris* pv. *glycines* under Marathawada. Indian J Plant Pathol 7:121-122
- 466 20. Prado H (2005) Ambientes de produção de cana-de-açúcar na região Centro-sul
467 do Brasil, Encarte do Informações Agronômicas 110:12-17

- 468 21. Pérombelon MCM, Kelman A (1980) Ecology of the soft rot erwinias, *Annu Rev*
469 *Phytopathol* 18:361-387
- 470 22. Oliveira IS, Sales Júnior R, Mariano RLR (2001) *Acidovorax avenae* subsp.
471 *citrulli*: método de isolamento e transmissão por sementes. *Fitopatol Bras* 26:302
- 472 23. Oliveira IS, Sales Júnior R, Mariano RLR (2003) Ocorrência da mancha-aquosa
473 por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em melão-pepino no Brasil. *Fitopatol Bras*
474 28:682
- 475 24. Oliveira A (2008). Colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro
476 e sobrevivência em restos de cultura e no solo. Pernambuco, Brasil: Universidade
477 Federal Rural de Pernambuco, Mestre dissertação.
- 478 25. Reis EM (1984) Efeito da incorporação e do tipo de restos culturais de trigo na
479 multiplicação de *Helminthosporium sativum*, no solo. *Fitopatol Bras* 9:537-541
- 480 26. Romeiro RS (2005) Bactérias Fitopatogênicas. Universitária UFV, Viçosa
- 481 27. Rotem J (1994) The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity.
482 APS, St. Paul
- 483 28. Santos AA, Viana FM (2000) Mancha-aquosa do melão. Embrapa, Fortaleza
- 484 29. Schlegel HG (1993) General microbiology. Cambridge University Press, pp 282-
485 289
- 486 30. Schuster ML, Coyne DP (1974) Survival mechanisms of phytopathogenic
487 bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 12:199-221
- 488 31. Silva VAV, Silveira EB, Mariano RLR (2006) Sobrevivência de *Acidovorax*
489 *avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro. *Fitopatol Bras* 31:381-386
- 490 32. Silveira EB, Michereff SJ, Mariano RLR (2003) Severidade da mancha-aquosa
491 em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de
492 inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Fitopatol Bras* 28:171-175
- 493 33. Silveira EB, Mariano RLR, Michereff SJ, Oliveira SMA (2004) Influência da
494 temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp.
495 *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão.
496 *Fitopatol Bras* 29:34-38
- 497 34. Siqueira JO, Franco AA (1988) Biotecnologia do solo – fundamentos e
498 perspectivas. Ministério da Educação – ABEAS, ESALQ/FAEPE, Brasília
- 499 35. Somodi GC, Jones JB, Hopkins DL, Stall RE, Kucharek TA, Hodge NC,
500 Watterson JC (1991) Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida.
501 *Plant Dis* 75:1053-1056

- 502 36. Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BBM, Thomashow LS (2002) Microbial
503 populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu*
504 *Rev Phytopathol* 40:309-348
- 505 37. Zhao Y, Damicone JP, Bender CL (2002) Detection, survival, and sources of
506 inoculum for bacterial diseases of leafy crucifers in Oklahoma. *Plant Dis* 86:883-
507 888
- 508
- 509
- 510



530 **Figura 1** Sobrevivência *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em restos de frutos (A) e
 531 folhas (B) de meloeiro infectados, incorporados ao solo em diferentes profundidades,
 532 avaliada pela população bacteriana (log ufc g⁻¹). O desvio padrão da média é
 533 representado pelas barras verticais.

534

535

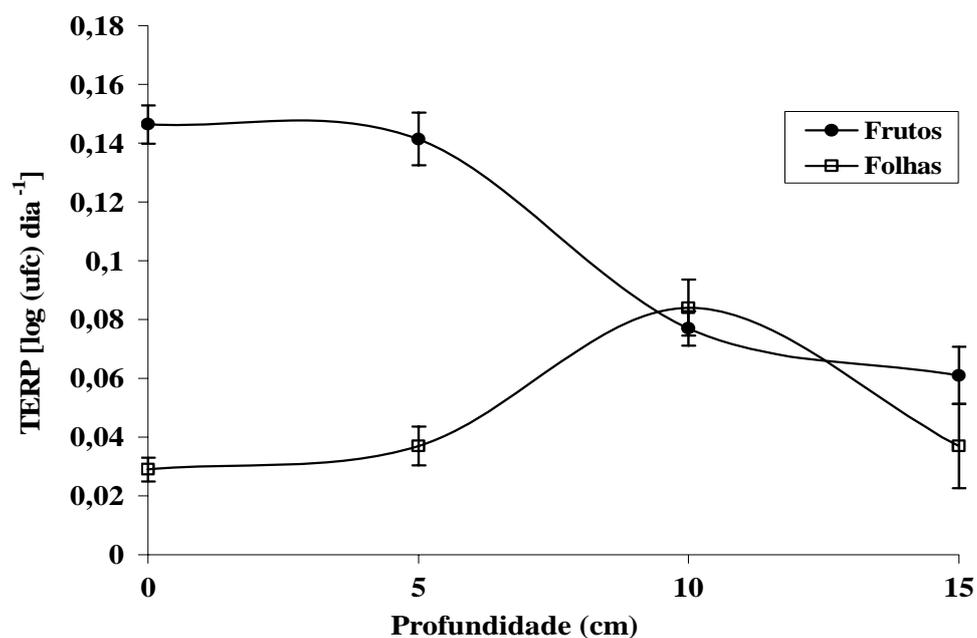
536

537

538

539

540



541
542 **Figura 2** Sobrevivência *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em restos de frutos e folhas
543 infectados incorporados ao solo em diferentes profundidades, avaliada pela taxa de
544 extinção relativa da população (TERP). O desvio padrão da média é representado pelas
545 barras verticais.

546

547

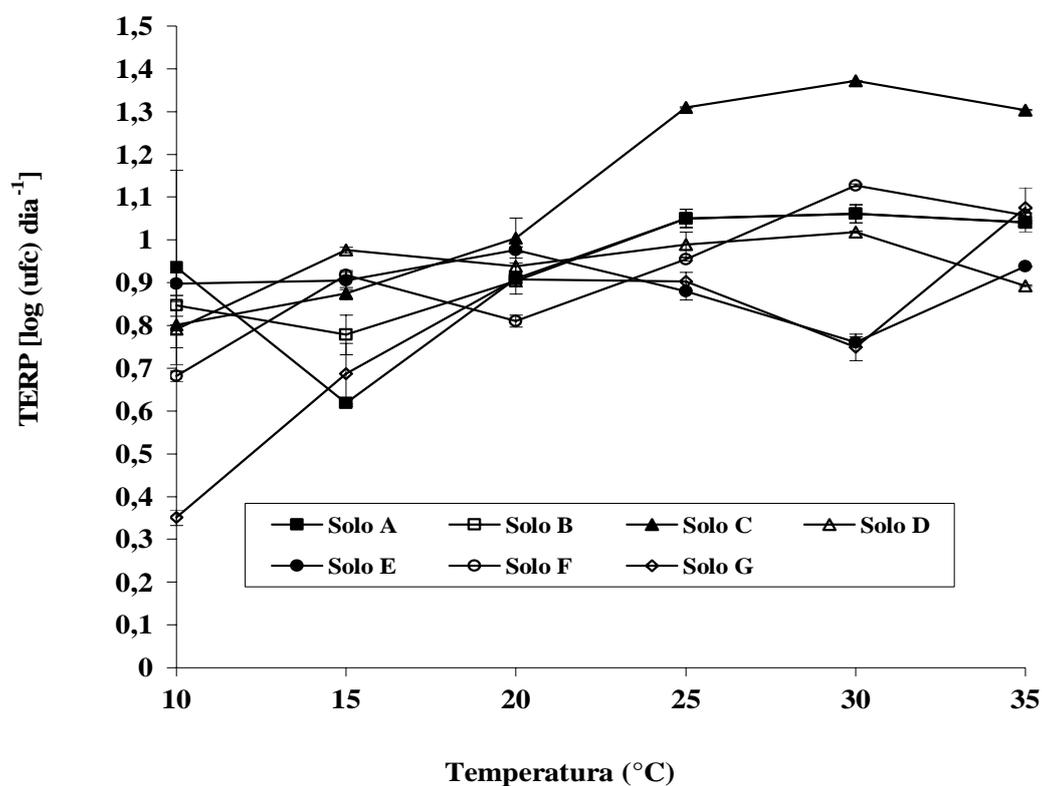
548

549

550

551

552



553
 554 **Figura 3** Sobrevivência de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em sete solos de cultivo
 555 de meloeiro no Nordeste do Brasil submetidos a diferentes temperaturas, avaliada pela
 556 taxa de extinção relativa da população (TERP). O desvio padrão da média é
 557 representado pelas barras verticais.

558

559

560

561

562

563 **Tabela 1** Taxa de extinção relativa da população (TERP) de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e características químicas, físicas e
 564 microbiológicas de sete solos de cultivo de meloeiro no Nordeste do Brasil.

SOLO	TERP	QUÍMICA										FÍSICA			MICROBIOLÓGICA					
		pH (água – 1:2,5)	P (mg dm ⁻³)	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺² +Mg ⁺² ------(cmol _c dm ⁻³)-----	Ca ⁺²	Al ⁺³	H + Al	C.O. ------(g kg ⁻¹)-----	M.O.	ARE ------(%)-----	ARG	SIL	FUNG	BACT	PSEU	ACT	TRIC	BAC -----ufc g ⁻¹ solo-----
A	0,6582 b ¹	8,3	39	0,71	0,77	16	13	0	1,79	12,6	21,72	47,5	47,2	5,28	80,67	39,67	19,33	37,33	19,67	159
B	0,6205 b	6,9	19	0,51	0,38	3,25	1,4	0	1,9	5,43	9,37	75,52	21,2	3,28	104	78,67	33	46,67	18,67	174,67
C	0,9062 a	7	12	0,82	0,35	16,75	12,8	0	2,14	13,25	22,85	51,52	37,2	11,28	59,67	74,67	26,33	121,67	30	210
D	0,6700 b	7,1	111	0,75	0,12	3,1	1,8	0	1,69	3,82	6,59	47,52	43,2	9,28	59,67	53,33	104	42	3	102,33
E	0,5061 c	7,6	1	0,42	0,87	12,95	10,3	0	2,28	10,93	18,84	88,76	10,1	1,14	25,33	26,67	54,67	18,67	0,67	78
F	0,6550 b	6,3	15	0,69	0,26	2,25	1,4	0,5	1,79	2,93	5,04	85,12	13,24	1,64	37	154,33	97,67	22	8	283
G	0,5235 c	6,8	35	0,4	0,2	3	2	0,5	1,9	4,48	7,72	69,22	29,5	1,28	16	144,33	121,67	20,67	1,33	173

565 ¹ Médias de quatro repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan (P=0,05).

566

567

568

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- 1- A partir da inoculação no primeiro par de folhas verdadeiras *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* colonizou folhas e ramos; e das sementes, colonizou hipocótilo, raízes, folhas cotiledonares, folhas verdadeiras e ramos.
- 2- Estigmas e estiletos de flores hermafroditas de meloeiro não foram colonizados pelo patógeno;
- 3- A técnica de impressão das folhas de meloeiro em meio de cultura pode ser utilizada com eficiência para confirmar a presença da bactéria colonizando epifiticamente folhas da planta à distância do ponto de inoculação;
- 4- O manejo da mancha-aquosa em meloeiro deve incluir a incorporação dos restos culturais por gradagem e manutenção de um intervalo mínimo de 28 dias entre cultivos;
- 5- O solo não deve ser considerado como fonte de inóculo primário de *A. avenae* subsp. *citrulli*;
- 6- Solos com maiores concentrações de Na⁺ e silte, e populações de actinomicetos e *Trichoderma*, favorecem a extinção da população de *A. avenae* subsp. *citrulli*.