**CARACTERIZAÇÃO DE *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (DOIDGE)
DYE DE PIMENTÃO (*Capsicum annuum* L.) E DE TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ATRAVÉS DE PATOGENICIDADE, SOROLOGIA, HIDROLISE DE AMIDO E SENSIBILIDADE A DROGAS**

ANTONIO CARLOS MARINGONI

●orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1986

À DEUS,
por ter-me concedido
a vida, a saúde e o
dom da inteligência,

OFEREÇO

A meus pais Izaura e Antonio
e a minha avó Angelina,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos:

Ao Professor Dr. Hiroshi Kimati, pela valiosa orientação, estímulo e revisão dos originais;

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pelos ensinamentos;

À FAPESP pela bolsa de estudo concedida;

Ao Professor Dr. Chukichi Kurozawa, da Faculdade de Ciências Agrônômicas UNESP-Botucatu, pelos primeiros ensinamentos e orientação em Fitopatologia;

Aos Drs. Armando Takatsu, Chukichi Kurozawa, Francisco Reifschneider, Júlio Rodrigues Neto e Ossamu Kimura, pelo fornecimento de materiais indispensáveis para a realização do presente trabalho;

À Professora Blancaluz Pinilla Carvajal, da Universidade Estadual de Londrina, pela amizade e revisão dos originais;

À Eng^o Agr^o Ms. Raquel Chini e ao técnico de laboratório Edvaldo A. Ribeiro Rosa, pelo auxílio nos testes sorológico;

Aos Eng^{os} Agr^{os} Ms. Antonio de Góes, Martin Homechin e Rita de Cassia Panizzi, pelas sugestões prestadas;

Ao Eng^o Agr^o Francisco Jorge Cicidanes, pela revisão do summary;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia, pela amizade e constante estímulo;

Aos funcionários Fernanda e Rodolfo Gropo e Pedro da Silva, do Departamento de Fitopatologia da ESALQ, pela colaboração na realização dos trabalhos de laboratório e casa de vegetação;

À Sra. Vera Lucia C. Chagas Francis, pelo exímio serviço datilográfico;

Às pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização do presente trabalho.

Í N D I C E

	Página
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A doença e o patógeno	3
2.2 Sorologia	6
2.3 Características culturais e fisiológicas	8
2.4 Sensibilidade a drogas <u>in vitro</u>	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Local e época da pesquisa	16
3.2 Obtenção e preservação dos isolados	16
3.3 Obtenção das plantas para as inoculações	19
3.4 Produção e padronização do inóculo	20
3.5 Ensaaios realizados	20
3.5.1 Caracterização patogênica dos isolados de Xv	20
3.5.1.1 Inoculação através de pulverização	20
3.5.1.2 Inoculação através de injeção ..	21
3.5.1.3 Cinética de crescimento de Xv no tecido foliar de pimentão e de tomateiro	22
3.5.2 Caracterização sorológica de isolados de Xv	24
3.5.2.1 Preparo do antígeno imunizante .	24
3.5.2.2 Obtenção dos antissoros	24
3.5.2.3 Preparo dos antígenos para reação em dupla difusão em gel-de- <u>a</u> gar	25

	Página
3.5.2.4 Titulação dos antissoros	26
3.5.2.5 Reação sorológica dos isolados de Xv pelo teste de dupla difu são em gel-de-ágar	26
3.5.3 Hidrólise de amido	27
3.5.4 Sensibilidade a drogas <u>in vitro</u>	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Caracterização patogênica de isolados de Xv	31
4.2 Cinética de crescimento de Xv no tecido foliar de pimentão e de tomateiro	44
4.3 Caracterização sorológica de isolados de Xv	52
4.3.1 Titulação dos antissoros	52
4.3.2 Reação sorológica dos isolados de Xv pelo teste de dupla difusão em gel-de-ágar	53
4.4 Hidrólise de amido	56
4.5 Sensibilidade a drogas <u>in vitro</u>	57
5. CONCLUSÕES	65
6. LITERATURA CITADA	66

CARACTERIZAÇÃO DE Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (DOIDGE)
DYE DE PIMENTÃO (Capsicum annuum L.) E DE TOMATEIRO (Lycopersi
con esculentum Mill.) ATRAVÉS DE PATOGENICIDADE, SOROLOGIA,
HIDRÓLISE DE AMIDO E SENSIBILIDADE A DROGAS

Antonio Carlos Maringoni

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

Doze isolados de X. campestris pv. vesicatoria, seis provenientes de pimentão e seis de tomateiro, foram estudados quanto ao comportamento patogênico, sorológico, hidrólise de amido e sensibilidade a drogas in vitro.

Com base na sintomatologia apresentada pelas plantas de pimentão cv. Cascadura Ikeda, linhagem 23-1-7 BK e de tomateiro cv. UC-134, inoculadas através de pulverização e injeção separadamente, pode-se distinguir os isolados de pimentão dos de tomateiro conforme a reação de suscetibilidade das plantas inoculadas.

Isolados de tomateiro foram sorologicamente diferentes dos de pimentão, além de hidrolisarem o amido e serem mais sensíveis, in vitro, à mistura dos fungicidas hidróxido de cobre ou oxiclureto de cobre com maneb ou mancozeb ou zineb e óxido cuproso com zineb, que os isolados de pimentão.

Não foi observada sensibilidade colateral e nem resistência cruzada nos isolados sensíveis ou não ao sulfato de estreptomicina em relação aos antibióticos e fungicidas ensaiados.

CHARACTERIZATION OF Xanthomonas campestris pv. vesicatoria
(DOIDGE) DYE FROM (Capsicum annuum L.) AND TOMATO(Lycopersicon
esculentum Mill.) BY PATHOGENICITY, SEROLOGY, STARCH HYDRO-
LYSIS AND DRUG SENSITIVITY

Antonio Carlos Maringoni

Adviser: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

SUMMARY

Twelve isolates of X. campestris pv. vesicatoria six from pepper and six from tomato, were compared with respect to pathogenicity, serology, starch hidrolisis and drug sensibility.

Isolates of pepper were pathogenically different from those of tomato on pepper (cv. Cascadura Ikeda and line 23-1-7 BK) and on tomato (cv. UC-134), by both leaf spray and leaf infiltration method of inoculation. Pepper isolates were serologically distinct from those of tomato. All isolates of tomato hydrolysed starch, while those of pepper could not do so. Also, all isolates of tomato were more sensible than those of pepper to copper-tiocarbamate fungicide mixtures (copper hydroxide or copper oxychloride plus maneb or mancozeb or zineb and copper oxide plus zineb).

1. INTRODUÇÃO

O pimentão (Capsicum annuum L.) e o tomateiro (Lycopersicon esculentum Mill.) são hortaliças de grande importância econômica para o Brasil, visto pela sua produção, consumo e exportação in natura ou industrializado.

Doenças de etiologia variada têm prejudicado a produção dessas hortaliças. Dentre elas, a pústula bacteriana do pimentão e a mancha bacteriana do tomateiro são consideradas doenças de grande importância para essas culturas, devido as perdas que causam. As duas doenças são incitadas pela bactéria Xanthomonas campestris pv. vesicatoria que, em estudos de patogenicidade, tem mostrado variabilidade, ocorrendo isolado específicos ou não ao pimentão, de acordo com vários trabalhos realizados no Brasil e no exterior.

Além das características patogênicas, outro modo de se diferenciar microrganismos é através de testes sorológicos, sendo um dos objetivos deste estudo relacionar diferenças patogênicas com as antigênicas, exibidas entre isolados provenientes de pimentão e de tomateiro. Determinados tes

tes fisiológicos também podem ou não revelar esta diferença, entre eles o de hidrólise de amido.

As cultivares de pimentão e de tomateiro, atualmente utilizadas no Brasil, com raras exceções não apresentam resistência ao patógeno, sendo o uso de produtos químicos a única forma de controle dessas bacterioses. Entretanto, vêm-se observando pouca eficiência neste tipo de controle seja pela insensibilidade do patógeno aos antibióticos e fungicidas utilizados, pela forma inadequada de aplicação dos produtos ou pelo modo de condução das culturas que favorece o desenvolvimento da doença. Testes in vitro serão realizados para avaliar a sensibilidade dos isolados a diferentes produtos químicos, bem como a existência de diferença na sensibilidade entre isolados de pimentão e de tomateiro aqui em estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A doença e o patógeno

A primeira menção da pústula ou mancha bacteriana na do pimentão foi feita por Heald e Wolf, no ano de 1912, mas somente em 1918, Sherbakoff, na Flórida, realizou uma completa descrição da doença que ocorria em folhas e frutos de pimentão (HIGGINS, 1922).

A mancha bacteriana do tomateiro foi relatada em várias regiões dos Estados Unidos e no Canadá no final da primeira década deste século (GARDNER e KENDRICH, 1921) e, em Pretoria, África do Sul, em 1914 (DOIDGE, 1921).

No Brasil, são encontrados breves relatos da ocorrência da pústula bacteriana, no estado de Pernambuco, causando sérios prejuízos em mudas e em plantações de pimentão (BATISTA, 1947). A mancha bacteriana do tomateiro foi observada pela primeira vez no estado de São Paulo por Kramer, em 1951, e Viegas, no ano de 1956, isolou o organismo incitador da doença (ROBBS, 1959). Os primeiros relatos da doença na literatura nacional datam de 1959, conforme as divulgações de CICCARONE e DOWSON (1959) e KRAMER (1959).

Os sintomas típicos da doença, em plantas de pimentão, são observados nas folhas, caules e frutos (HIGGINS, 1922) enquanto que em tomateiro nas folhas, pecíolos, caule, ráquis florais, sépalas e frutos (DOIDGE, 1921 e DYE et alii 1964).

Estudos referentes à suscetibilidade dos cultivares comerciais de pimentão e de tomateiro, utilizados no Brasil, foram realizados por diferentes pesquisadores. FRENHANI et alii (1972), em condições de casa de vegetação, observaram que os cultivares de pimentão Agrônômico 8-L-17, Agrônômico 8-L-76, Amarelo, Yolo Wonder, Porto Rico Wonder e Casca Grossa apresentavam melhor comportamento em relação aos cultivares Mogi das Cruzes, Moura e Cascadura Ikeda, que se mostraram mais suscetíveis a doença. Quanto ao tomateiro, os cultivares tipo Santa Cruz, de condução tutorada, são altamente suscetíveis (ROBBS, 1959; FRENHANI, 1969; KIMURA et alii, 1972 e CASTILHO e KUROZAWA, 1980) e aqueles de condução não tutorada, rasteiro, apresentam variação quanto a suscetibilidade, sendo que os de fruto tipo quadrado (UC 134, Petomech, etc.) apresentam maior suscetibilidade à doença do que aqueles com frutos tipo pera (Roma, Ronita, Rossol, etc.), segundo observações de BARBOSA e SILVA NETO (1981), em condições de campo.

Certas condições ambientes favorecem a ocorrência e desenvolvimento da doença, tais como alta umidade relativa e temperatura entre 22,5 a 27,5°C (COX et alii, 1965 e MORTON, 1966).

A bactéria incitadora da doença, em ambos hospedeiros tem recebido diferentes denominações, a saber: Bacte

rium exitiorum n. sp. (GARDNER e KENDRICK, 1921), Bacterium vesicatorium n. sp. (DOIDGE, 1921), Phytomonas vesicatoria (BURKHOLDER, e LI, 1941), Xanthomonas vesicatoria (ROBBS, 1959) e recentemente Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (YOUNG et alii, 1978 e DYE et alii, 1980).

Além do pimentão e tomateiro outras plantas tem sido consideradas hospedeiras de X. campestris pv. vesicatoria (Xv); entre elas podem-se mencionar: Physalis minima, Datura stramonium var. tatula (DOIDGE, 1921), Solanum tuberosum (GARDNER e KENDRICK, 1921), Capsicum frutescens, Lycopersicon pimpinellifolium, Lycium halimifolium, L. chinense, Hyoscyamus niger, H. aureus, Nicotiana rustica, Solanum dulcamara, S. rostratum (GARDNER e KENDRICK, 1923), S. melongena (KIMURA et alii, 1976), Nicandra physalodes, Raphanus sativus (DYE et alii, 1964) e Brassica oleracea var. capitata (FRENHANI, 1969).

Inoculações cruzadas dos isolados provenientes de pimentão e de tomateiro, em plantas de tomateiro e de pimentão, não têm demonstrado diferenças nos sintomas, quando comparados com aqueles exibidos pelos hospedeiros originais (GARDNER e KENDRICK, 1921; 1923; HIGGINS, 1922; BURKHOLDER e LI, 1941; DOOLITTLE e CROSSAN, 1959; DYE et alii, 1964; LUCERO, 1967 e FRENHANI, 1969). Porém, é inerente aos isolados a capacidade em promover a doença, em plantas submetidas à inoculações cruzadas, havendo entretanto isolados capazes ou não de promovê-la (BURKHOLDER e LI, 1941; ROBBS, 1959; COOK e STALL, 1969; KIMURA et alii, 1972 e MATHIEW e PATEL, 1977).

COOK e STALL (1969), utilizando a técnica de inoculação através de injeção (KLEMENT, 1963), propuseram a divisão dos isolados de Xv em três grupos e duas raças conforme as reações de suscetibilidade ou hipersensibilidade apresenta das pelas folhas inoculadas de pimentão 'Early Calwonder', '23-1-7BK' e tomateiro 'Grothens Globe'.

No Brasil, KIMURA et alii (1972) sugerem a criação de um quarto grupo motivado pela incapacidade de infecção de isolados de Xv provenientes de pimentão (estirpe Rio) em tomateiro Santa Cruz, uma vez que o comportamento desses isolados não se enquadravam na classificação de COOK e STALL (1969).

REIFSCHNEIDER et alii (1985) enfatizam a dificuldade que muitos pesquisadores têm encontrado em utilizar adequadamente os termos grupos ou raças para designar certas cepas de Xv e propuseram a divisão de Xv em oito grupos, basea dos na reação dos hospedeiros diferenciais propostos por COOK e STALL (1969), e sugeriram a não utilização dos termos 'strains' e raças.

Diferenças de sintomas que os isolados podem provocar, em inoculações cruzadas, não são descritas na literatura e sim, diferenças na quantidade de lesões em folhas das plantas inoculadas (BURKHOLDER e LI, 1941; DOOLITTLE e CROSSAN, 1959; LUCERO, 1967 e FRENHANI, 1969).

2.2 Sorologia

A utilização de sorologia em bacteriologia vegetal foi

iniciada por Ziffetl em 1912, na Alemanha (LINK e SHARP, 1927 e GOLDSWORTHY, 1928). Esses pesquisadores demonstraram a existência de correlação sorológica entre raças de Rhizobium de ervilha e feijão e, entre trevo e fava. SCHAAD (1979) aponta em sua revisão a possibilidade do uso da sorologia na identificação de bactérias fitopatogênicas, a nível de gênero e espécie, e até cepas dentro da mesma espécie.

Mediante a utilização da técnica de dupla difusão em gel-de-ágar, inúmeros trabalhos revelaram diferenças entre isolados bacterianos da mesma espécie. Deste modo, cepas de Pseudomonas syringae (LOVREKOVICH et alii, 1963 e OTTA e ENGLISH, 1971), P. solanacearum (HARRISON e FREEMAN, 1961; MORTON et alii, 1965 e JENKINGS et alii, 1966), Xanthomonas ampelina (ERASMUS et alii, 1974) e X. cyamopsidis (ORELLANA e WERBER, 1971) puderam ser distinguidas.

NAMEKATA (1971) e BACH et alii (1978) diferenciaram, através de testes sorológicos, X. citri, agente causal do cancro cítrico, de X. citri f. sp. aurantifolia, agente causal da cancriose do limoeiro Galego. Componentes sorológicos comuns foram observados em X. citri com X. carotae (NAMEKATA, 1971) e X. manihotis (NAMEKATA, 1971 e BACH et alii, 1978); e entre X. citri f. sp. aurantifolia com X. carotae, X. manihotis (NAMEKATA, 1971) e X. campestris (BACH et alii, 1978).

A diferenciação sorológica entre isolados de Xv de pimentão e tomateiro é objeto de controvérsia entre muitos pesquisadores. Assim, LOVREKOVICH e KLEMENT (1965) e O'BRIAN et

alii (1967) conseguiram diferenciá-los, entretanto isso não foi conseguido em outros trabalhos (CHARUDATTAN et alii, 1973; SCHAAD, 1976 e SHEKRAWAT e CHAKRAVARTI, 1977; 1979).

2.3 Características culturais e fisiológicas

Espécies bacterianas pertencentes ao gênero Xanthomonas, conforme DYE (1980), apresentam certas características em comum como: gram negativas, bastonetes com um flagelo polar, aeróbicas, com reações de catalase e H_2S positivas, hidrolisam Tween 80, não produzem nitrato e nem indol; muitas espécies produzem secreção extracelular viscosa de polissacarídeos denominada 'Xanthan' em meio de cultura contendo glicose.

Em meios de cultura sólidos, isolados de Xv formam colônias amarelas translúcidas, independente da origem do hospedeiro (GARDNER e KENDRICK, 1921), bem como apresentam reações fisiológicas semelhantes, sendo praticamente impossível distingui-los conforme foi verificado por Jagger, citado por GARDNER e KENDRICK (1921).

Xv hidrolisa gelatina (GARDNER e KENDRICK, 1921; HIGGINS, 1922 e DYE, 1964) e apresenta tolerância variada a concentração de NaCl, como: 1% (GARDNER e KENDRICK, 1921) 3% (DOIDGE, 1921; GARDNER e KENDRICK, 1923; DYE et alii, 1964 e KLINGNER e SOLANES, 1968) e 4% (DYE et alii, 1964).

A produção de ácido de certos produtos orgânicos é uma característica conflitante entre resultados de várias pesquisas. Reações negativas foram observadas por GARDNER e KENDRICK (1921; 1923) em isolados de pimentão e tomatei

ro e por HIGGINS (1922) em isolados de pimentão para os produtos: dextrose, sacarose, maltose, lactose, glicerina e manitol. Entretanto, DOIDGE (1921), com isolado de tomateiro, obteve a formação de ácido em dextrose, e uma produção inferior a da dextrose para a levulose, sacarose, lactose, galactose, glicerina, dextrina e reações negativas para o manitol e maltose.

DYE et alii (1964), com isolados de *Xv* provenientes de tomateiro e *N. physalodes*, obtiveram reações positivas em: arabinose, melibitose, celobiose, glicerol, xilose, glicose, frutose, galactose, mannose, sacarose, maltose, trehalose mas não em: rhamnose, inulina, odonitol, sorbitol, dulcitol, salicina e α -metil-D-glicosídeo.

KLINGNER e SOLANES (1968) verificaram reações positivas, de um isolado proveniente de pimentão, para os produtos: ribose, xilose, arabinose, glicose, galactose, levulose, mannose, sacarose, lactose, maltose, trehalose e glicerina mas não em: rhamnose, inulina, odonitol e sorbitol. MATHIEW e PATEL (1977), com isolados de pimentão, tomateiro e datura, observaram produção de ácido para os isolados em: galactose, celobiose, dextrina e melibitose; embora os isolados de pimentão apresentassem reação fraca, apenas os isolados de tomateiro e de datura produziram ácido de galactose e manitol.

Outras características entre os isolados de *Xv* podem ser observadas, dentre elas a atividade amidolítica, embora para essa característica os resultados encontrados na literatura não sejam concordantes. Estudos conduzidos com isolados de pimentão revelaram que esses hidrolisam o amido (KLINGNER e SOLANES, 1968; FRENHANI, 1969 e MATHIEW e PATEL,

1977) ou não (BURKHOLDER e LI, 1941; ROBBS, 1959; DYE et alii, 1964 e LOVREKOVICH e KLEMENT, 1965) ou ainda, essa capacidade amidolítica variou entre os isolados (CHARUDATAN et alii, 1973 e SCHAAD, 1976).

Para isolados de tomateiro, algumas pesquisas demonstraram a atividade amidolítica (DOIDGE, 1921; BURKHOLDER e LI, 1941; ROBBS, 1959 e MATHIEW e PATEL, 1977), entretanto em alguns casos essa atividade foi variada entre os isolados (DAY et alii, 1964; LOVREKOVICH e KLEMENT, 1965, CHARUDATTAN et alii, 1973 e SCHAAD, 1976).

NAMEKATA (1971) comenta que os testes bioquímicos, baseados no metabolismo das bactérias, têm sido utilizados como principal método de classificação de bactérias, embora muitos pesquisadores duvidem da legitimidade dos mesmos, quando empregados isoladamente. No entanto, SCHAAD (1976) explica que os membros pertencentes ao gênero Xanthomonas formam um grupo uniforme no que diz respeito a suas características fisiológicas e bioquímicas e que a nível de espécie dependem unicamente da especificidade dos hospedeiros.

2.4 Sensibilidade a drogas in vitro

O estudo da ação de drogas in vitro sobre diferentes gêneros e espécies de bactérias fitopatogênicas, constitui um teste de rotina para a determinação da sensibilidade bem como detecção de resistência entre isolados a esses produtos (AZEVEDO, 1961; STALL e THAYER, 1962; AZEVEDO et alii, 1965; LEMOS, 1970 e KUROZAWA, 1980).

THIRUMALACHAR et alii (1956) estudaram o com

portamento de 32 espécies de Xanthomonas, frente a diversos antibióticos, através da impregnação desses produtos em discos-de-papel. Neste estudo verificaram que para um isolado de Xv de pimentão, halos inibitórios se formaram nas concentrações de 60 ppm de aureomicina e de terramicina, 20 ppm de dihidro-estreptomicina e 250 ppm de penicilina G sódica.

Trabalhos conduzidos por MEHTA et alii (1959), com 30 isolados bacterianos de diferentes gêneros e espécies, entre eles 29 exemplares fitopatogênicos, mostraram sensibilidade a vancomicina a uma concentração igual ou inferior a 10 ppm, quando esta foi adicionada ao meio de cultura. Verificaram também, para um isolado de Xv que a concentração mínima inibitória a esse antibiótico foi de 1,5 ppm.

Muitas bactérias fitopatogênicas ou não são sensíveis a estreptomicina como: Xanthomonas manihotis (SOUZA e CRUZ FILHO, 1979), X. oryzae (CHAUHAN e VAISHANAV, 1980) e Rhizobium leguminosarum (KUKRALIA et alii, 1984).

MEADOWS e STALL (1981) verificaram que a concentração de 1 ppm de estreptomicina, em meio nutriente líquido, foi suficiente para inibir o crescimento de um isolado de Xv, proveniente de pimentão. Entretanto, trabalhos conduzidos no Brasil por TAKATSU (1982) e KUROZAWA et alii (1983) demonstraram a tolerância dos isolados de Xv a elevadas concentrações de estreptomicina. KUROZAWA (1980) e TAKATSU (1982) relatam este problema também em Corynebacterium michiganense pv. michiganense.

Resistência de X. campestris a diversos antibióticos foi objeto de estudo de vários pesquisadores. Os re

sultados indicam que mutantes resistentes a estreptomicina, e ritromicina e vancomicina, ocorrem até nas mais altas concentrações dessas drogas, evidenciando a presença de um gem principal responsável pela resistência, sendo do tipo 'um só passo', enquanto que, para os antibióticos: penicilina, aureomicina, cloranfenicol e tilosina, não houve ocorrência de mutantes nas concentrações mais elevadas, exibindo assim o caráter poligênico da resistência, do tipo 'múltiplos passos' (AZEVEDO, 1961 AZEVEDO e NEDER, 1963 AZEVEDO et alii, 1965 e AZEVEDO, 1973).

Isolados de Xv que não foram sensíveis in vitro a estreptomicina também não o foram in vivo (THAYER e STALL, 1961 e STALL e THAYER, 1962). Entretanto, a sensibilidade de isolados de Xv, a esse antibiótico está correlacionada com a concentração de magnésio no meio; assim, WOLTZ e JONES (1979) verificaram que o aumento na concentração de magnésio diminui a ação inibitória da estreptomicina no crescimento de isolados sensíveis ao antibiótico.

ENGLISH e Van HALSEMA (1954) concluíram em seus estudos, com Erwinia amylovora e com Xv, que a combinação de estreptomicina com oxitetraciclina, atrasou a emergência de linhagens resistentes dessas bactérias a estreptomicina.

A combinação dos antibióticos estreptomicina e oxitetraciclina têm demonstrado potencialidade na inibição de isolados de Xv (THAYER e STALL, 1961; SHARMA et alii, 1981 e KUROZAWA et alii, 1983); ou apenas a oxitetraciclina apresenta ação tóxica a Xv (THIRUMALACHAR et alii, 1956 e TAKATSU, 1982) bem com a X. oryzae (BALARAMAN e RAJAGOPALAN, 1978) e a C. michiga

nense pv. michiganense (KUROZAWA, 1980 e TAKATSU, 1982).

Várias fitobactérias apresentam sensibilidade ao cloranfenicol como: C. michiganense pv. michiganense (KUROZAWA, 1980), E. carotovora var. atroseptica (BURTH et alii, 1978), X. campestris pv. beticola (ABRAHAM e MATHEW, 1982), X. campestris pv. manihotis (SOUZA e CRUZ FILHO, 1979). X. campestris pv. phaseoli (BEHNIWAL e PARASHAR, 1981) e, também Xv (MEDOWS e STALL, 1981 e KUROZAWA et alii, 1983). Outro antibiótico, a neomicina possui ação inibitória quando utilizada, na concentração de 2 ppm, sobre X. campestris pv. manihotis (SOUZA e CRUZ FILHO, 1979).

Além dos antibióticos, vários fungicidas, de diferentes grupos químicos, são tóxicos a muitas bactérias fitopatogênicas. Ensaio conduzido com captan revelaram que R. leguminosarum (KAKRALIA et alii, 1984), X. migromaculans f. sp. zinniae (STRIDER, 1979) e Xv (MARINGONI e KUROZAWA, 1984) foram sensíveis a esse fungicida.

O captafol foi tóxico a R. leguminosarum (KAKRALIA et alii, 1984) e a R. trifolii (RUIZ-SAINZ et alii, 1984) mas não a Pseudomonas syringae pv. tomato (CONLIN e McCARTER, 1983).

WU et alii (1980) comentam em seus estudos que o maneb inibiu o crescimento de X. campestris pv. mangiferaeindicarum. Este resultado também foi observado por CONLIN e McCARTER (1983) em P. syringae pv. tomato.

O mancozeb foi tóxico a P. syringae pv. tomato (CONLIN e McCARTER, 1983) e a Xv (MARCO e STALL, 1983), embora

SHARMA et alii (1981) não constatassem inibição em *Xv*. GYNEPAD ZE et alii (1978) verificaram que de 21 fungicidas testados, apenas cinco mostraram alta atividade inibitória a *P. mori*, e entre esses estava incluído o zineb. ADASKAVEG e HINE (1985), também, observaram a ação inibitória de zineb em isolados de *Xv*, entretanto este resultado não foi constatado em *P. syringae pv. tomato* (CONLIN e McCARTER, 1983).

Fungicidas cúpricos de diferentes composições podem ser ou não tóxicos a *Xv*. DOIDGE (1921) constatou a inibição de um isolado de *Xv* de tomateiro, em nutriente líquido contendo sulfato de cobre, na proporção de 1:25, quando exposto por 10 minutos nesse meio. Entretanto, esse autor achou que o isolado em estudo foi altamente insensível ao sulfato de cobre, uma vez que, nas mesmas condições de experimentação o *Bacillus mangiferae* foi inibido na proporção de 1:400 de sulfato de cobre.

KUROZAWA et alii (1983), trabalhando com 55 isolados de *Xv* de tomateiro, observaram inibição variável entre os isolados para oxicloreto de cobre nas concentrações inferiores a 31,25 ppm a 125 ppm.

SHARMA et alii (1981), com isolado de *Xv* de pimentão, não observaram formação de halos inibitórios ao redor de discos-de-papel umedecidos com sulfato de cobre a 50 ppm, depositados sobre o meio de cultura previamente semeado com a bactéria.

Sulfato de cobre, sulfato básico de cobre, carbonato amônio de cobre (ADASKAVEG e HINE, 1985) e hidróxido de cobre (MARCO e STALL, 1983 e ADASKAVEG e HINE, 1985) foram

semelhantes na inibição de isolados de Xv, de pimentão, sensííveis a esses produtos.

CONLIN e McCARTER (1983) observaram a sensibiilidade de P. syringae pv. tomato a diferentes fungicidas cúúpricos. Verificaram que acetato de cobre, oxicloreto de coobre e sulfato de cobre foram análogos na toxidez, enquanto que hidróxido de cobre e óxido cuproso apresentaram toxidez quase nula.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local e época da pesquisa

A presente pesquisa foi realizada nos laboratórios e casas-de-vegetação, do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Piracicaba, no período de março de 1984 a abril de 1986.

3.2 Obtenção e preservação dos isolados

Os isolados bacterianos utilizados foram obtidos a partir de isolamento de material vegetal fresco ou herborizado com sintomas típicos da doença, bem como de culturas puras, preservadas em tubos de meio de cultura ou sob liofilização (quadro 1).

Pedaços de tecidos doentes foram recortados entre as regiões necróticas das folhas de pimentão e de tomateiro. Em seguida, foram estes imersos durante 30 segundos em álcool 70% e, posteriormente, em hipoclorito de sódio a 1,3% durante um minuto. Finalmente, foram lavados por duas vezes consecutivas em 5 ml de água destilada esterilizada. Após a lavagem, os tecidos foram macerados, com auxílio de um bastão

de vidro, em cinco ml de água destilada esterilizada.

Placas de Petri contendo BDA (água de cozimento de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 15 g de ágar e água destilada até completar 1000 ml) foram semeadas, com uma alça de platina, pelo método de estrias, com a suspensão obtida na maceração.

Os isolados puros, preservados em meio de cultura ou sob liofilização, foram primeiramente transferidos para tubos contendo 5 ml de meio NL (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona e 1000 ml de água destilada), incubados durante 48 hs a 26 - 27°C e, posteriormente, semeados, pelo método de estrias, em placas de Petri contendo meio YDC (10 g de extrato de levedura, 20 g de dextrose; adicionada após esterilização do meio, 20 g de CaCO_3 , 15 g de ágar e 1000 ml de água destilada), conforme SCHAAD (1980).

Logo após as sementeiras, as placas ficaram incubadas durante 72 - 96 horas em estufa a 26 - 27°C. Após o desenvolvimento das colônias, efetuou-se novo plaqueamento, um para os isolados puros e dois para aqueles obtidos a partir de material vegetal doente, visando a purificação da bactéria.

As colônias puras foram transferidas para tubos inclinados contendo BDA. Após o crescimento as colônias foram armazenadas sob refrigeração a 5°C.

Plantas de pimentão 'Cascadura Ikeda' e de tomateiro 'UC-134' foram inoculadas através de pulverização, com os respectivos isolados bacterianos, e mantidos sob condições

Quadro 1 - Relação dos isolados de Xv de tomateiro e de pimentão

Isolados	Hospedeiro	Instituição fornecedora	Local	Época de coleta/ isolamento
P-1	Pimentão	-	Piracicaba-SP	17.04.84
P-3	Pimentão*	SBF-310/ENA-2844	Rio de Janeiro-RJ	-
P-7	Pimentão*	SBF-415	Elias Fausto-SP	1982
P-12	Pimentão*	ENA-3090	Nova Friburgo-RJ	-
P-13	Pimentão*	CNPH-247	Brasília-DF	-
P-14	Pimentão*	CNPH-413	Brasília-DF	-
T-1	Tomateiro**	FCA	Botucatu-SP	10.03.83
T-5	Tomateiro**	FCA	Botucatu-SP	02.04.84
T-9	Tomateiro**	FCA	Presidente Prudente-SP	07.04.83
T-10	Tomateiro**	FCA	Estrela do Norte-SP	22.01.81
T-14	Tomateiro**	FCA	Monte Castelo-SP	1981
T-15	Tomateiro**	SBF-419	Sta. Bárbara do Oeste-SP	1982

* = Isolado puro preservado em meio de cultura ou liofilização

** = Isolamento a partir de material herborizado

CNPH = Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, Brasília-DF

ENA = Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ

FCA = Faculdade de Ciências Agronômicas-UNESP, "Campus" de Botucatu, Botucatu-SP

SBF = Seção de Bacteriologia Fitopatológica - Instituto Biológico, Campinas-SP

de casa de vegetação. As suspensões bacterianas aproximada de 10^8 ufc/ml foram obtidas a partir do cultivo dos isolados em 50 ml de NL, durante 48 horas. Após as inoculações as plantas permaneceram durante 48 horas em câmara úmida, no interior de sacos de polietileno umedecidos.

Folhas com sintomas da doença foram coletadas 10 dias após as inoculações para reisolamento da bactéria. Os reisolados obtidos foram transferidos para tubos inclinados de BDA e mantidos sob refrigeração.

3.3 Obtenção das plantas para as inoculações

Sementes de pimentão da cv. Cascadura Ikeda e da linhagem 23-1-7 BK foram tratadas com hipoclorito de sódio, conforme recomendação de DEMPSEY e WALQUER (1973) e as de tomateiro cv. UC-134, com ácido clorídrico, conforme KUROZAWA et alii (1984), para a eliminação de talos bacterianos eventualmente aderidos a elas; em seguida foram secas, à sombra, semeando 10 em cada vaso.

Os vasos de alumínio, com diâmetro superior de 14,5 cm, possuíam substrato esterilizado constituído de uma mistura de esterco de curral, areia e solo argiloso na proporção de 1,5: 1,0: 3,0.

Quando as plantas atingiram 12 a 15 dias de idade foram raleadas, deixando-se três em cada vaso. As plantas de pimentão no estágio de lançamento da 7.^a - 8.^a folha, com aproximadamente 30 - 35 dias de idade, e as de tomateiro, no estágio de lançamento 6.^a - 7.^a folha, com aproximadamente 30 dias de idade, foram inoculadas.

3.4 Produção e padronização do inóculo

Placas de Petri contendo BDA foram semeadas com 0,5 ml de nutriente líquido, possuindo talos bacterianos com aproximadamente 24 horas de idade, sendo estes espalhados superficialmente com uma alça de "Drigauski". Placas assim semeadas ficaram incubadas durante 72 horas a 26 - 27°C.

Bactérias desenvolvidas nessas condições foram suspensas em água destilada e padronizadas por colorimetria (50% de transmitância em aparelho Bausch & Lomb Spectronic 20 a 650 nm), a concentração de 10^8 ufc/ml (KIMURA et alii 1972).

3.5 Ensaio realizados

3.5.1 Caracterização patogênica de isolados de Xv

Os ensaios referentes aos testes de patogenicidade foram divididos em dois grupos, referentes a duas metodologias de inoculação, que foram conduzidos em separado.

3.5.1.1 Inoculação através de pulverização

Plantas de pimentão da cv. Cascadura Ikeda e da linhagem 23-1-7 BK e de tomateiro cv. UC-134, foram obtidas conforme descrito no item 3.3, mantidas sob condições de casa de vegetação, com temperatura ambiente entre 20 - 35°C e alta umidade relativa.

As pulverizações das suspensões bacterianas, realizadas com bombas plásticas de "laquê", foram dirigidas à face inferior das folhas até o início de escoamento. Vinte quatro horas antes e quarenta e oito horas após as inocula

cões, as plantas ficaram submetidas à câmara úmida, no interior de sacos de polietileno previamente umedecidos. Para cada isolado bacteriano inocularam-se as plantas de três vasos sendo estes distribuídos em blocos ao acaso no interior da casa de vegetação.

Os isolados utilizados nos ensaios foram P-1, P-3, P-7, P-12, P-13 e P-14, provenientes de pimentão, e T-1, T-5, T-9, T-10, T-14 e T-15 de tomateiro. O tratamento testemunha foi representado por água destilada. As suspensões bacterianas foram preparadas e padronizadas conforme descrito no item 3.4.

As avaliações constaram das observações dos sintomas apresentados pelas 3ª, 4ª e 7ª folhas das plantas de pimentão e 3ª, 4ª e 5ª folhas das de tomateiro, no 5º, 13º e 21º dia após as inoculações.

3.5.1.2 Inoculação através de injeção

Plantas de pimentão da cv. Cascadura Ikeda e da linhagem 23-1-7 BK e de tomateiro UC-134 foram conseguidas conforme descrito no item 3.3, mantidas sob condições de casa de vegetação, com temperatura ambiente entre 20 - 35°C e umidade relativa elevada.

As inoculações consistiram na infiltração das suspensões bacterianas (10^8 ufc/ml) no mesófilo foliar das plantas, de acordo com a técnica descrita por KLEMENT(1963), com agulhas hipodérmicas microfina II 13 x 3,8 e seringas plásticas de 1 ml de capacidade, utilizadas em aplicações de insulina. Para cada isolado bacteriano inocularam-se plantas de 3 vasos,

sendo a 1.^a, 2.^a, 3.^a e 4.^a folha, em cada planta de pimentão, e em cinco folíolos da 3.^a folha de cada planta de tomateiro. O tratamento testemunha foi representado por água destilada. Seguida as inoculações, os vasos foram distribuídos em blocos ao acaso no interior da casa de vegetação.

Os isolados bem como a preparação do inóculo foram os mesmos utilizados no ensaio descrito no item 3.5.1.1.

As avaliações consistiram na leitura dos sintomas exibidos pelas folhas 24, 48, 72 e 144 horas após as inoculações.

3.5.1.3 Cinética de crescimento de Xv no tecido foliar de pimentão e de tomateiro

Plantas de pimentão 'Cascadura Ikeda', '23-1-7 BK' e de tomateiro 'UC-134' foram inoculadas e mantidas nas mesmas condições descritas nos itens 3.5.1.1 e 3.5.1.2.

Dois isolados bacterianos foram usados, P-7 proveniente de pimentão e T-9 de tomateiro, sendo ambos insensíveis à concentração de 1000 ppm de estreptomicina.

Para o método de inoculação através de pulverização foram inoculadas as plantas de três vasos tanto as de pimentão quanto as de tomateiro. Já para o método de inoculação por injeção foram inoculadas plantas de seis vasos, para cada isolado, nas 3.^a e 4.^a folhas das plantas de pimentão, e em cinco folíolos, da 3.^a folha, das plantas de tomateiro.

As amostragens foram feitas no momento da inoculação e repetidas a intervalos de dois dias, totalizando cinco amostragens por isolado. Para o método de inoculação por pulve

rização, a primeira amostragem foi realizada uma hora após a instalação do experimento, nas 3^{as} e 4^{as} folhas ou folíolos das plantas inoculadas, enquanto que, para o método de injeção, imediatamente após a inoculação. Em cada amostragem foram retirados cinco discos de folhas, com auxílio de um vazador de rolo de 0,9 cm de diâmetro, em seguida adotou-se a metodologia descrita por KIRALY et alii (1974), com algumas modificações, para a quantificação da bactéria no tecido foliar.

Após a amostragem, os discos de folha foram lavados por duas vezes consecutivas em 10 ml de água destilada e esterilizada por um minuto, posteriormente secos em papel filtro esterilizado, para eliminação do excesso de água, transferindo-os para placas de Petri esterilizadas, adicionando em seguida 10 ml de solução salina (NaCl, 0,85%) esterilizada juntamente com 1,5 de areia fina estéril (tamisada em peneira de 0,42 mm) e macerando-os. Obteve-se desta forma a suspensão concentrada. A partir desta foram feitas diluições sucessivas em solução salina esterilizada, transferindo-se um ml das diluições 10^{-2} - 10^{-3} a 10^{-3} - 10^{-7} para placas de Petri, vertendo-se a seguir nutriente ágar fundente a 45°C (3g de extrato de carne, 5 g de peptona, 15 g de ágar Difco e 1000 ml) contendo 100 ppm de clorotalonil e 50 ppm de sulfato de estreptomicina (MARINGONI e KUROZAWA, 1984). Para cada diluição foram feitas 5 repetições.

As placas foram incubadas em estufa a 26 - 27°C durante 96 - 120 horas; ao final desse período realizaram-se as contagens das unidades formadoras de colônias (ufc). Para efeito de leitura consideraram-se apenas aquelas diluições que apresentavam entre 30 a 300 colônias. Os dados referentes às concentrações bacterianas foram transformados por cm² de área

foliar amostrada e estes em $\log_{10}$ para a construção dos gráficos.

3.5.2 Caracterização sorológica de isolados de Xv

3.5.2.1 Preparo do antígeno imunizante

O isolado P-7, de Xv, de pimentão, foi cultivado conforme o item 3.4. As colônias bacterianas desenvolvidas nessas condições foram suspensas em solução salina esterilizada. Após a homogeneização da suspensão bacteriana, as bactérias foram lavadas por duas vezes em volumes iguais de solução salina esterilizada, por meio de centrifugação (Centrífuga Sorvall SS-4) a 8000 rpm durante 15 minutos, cada vez.

As bactérias decantadas foram suspensas em solução salina e padronizada por colorimetria (50% de transmitância em aparelho Baush & Lomb Spectronic-20 a 650 nm) a concentração de 10^8 ufc/ml. Aliquotas de 5 ml foram depositadas em frascos de antibióticos esterilizados que, uma vez, tapados, foram conservados em congelador.

3.5.2.2 Obtenção dos antissoros

O antígeno do isolado P-7 foi injetado em um coelho da raça Nova Zelândia, pesando aproximadamente 3 kg, para a obtenção do antissoro. Dois ml do antígeno, conservado no congelador, foram homogeneizados em adjuvante completo de Freund (Difco), sob agitação constante de uma seringa, até a obtenção de uma emulsão. Um ml da emulsão foi injetado por via intramuscular, duas vezes a cada sete dias, durante as três primeiras semanas, e a partir dali, uma injeção espaçada de sete dias,

totalizando 11 aplicações. Antes da primeira imunização foi feita uma sangria para a obtenção do soro normal que serviu de controle.

Sangrias semanais foram realizadas a partir da sexta injeção. O soro foi obtido a partir de sangue coagulado que permaneceu por duas horas a temperatura ambiente e sob refrigeração por uma noite. O plasma sanguíneo foi centrifugado a 7000 rpm durante dez minutos, e guardado em frascos de vidros esterilizados juntamente com a adição de uma gota de merthiolate a 0,1%. Os antissoros obtidos foram identificados e conservados em congelador.

3.5.2.3 Preparo dos antígenos para reação em dupla difusão em gel-de-ágar

Suspensões bacterianas dos isolados provenientes de pimentão (P-1, P-3, P-7, P-12, P-13 e P-14) e de tomateiro (T-1, T-5, T-9, T-10, T-14 e T-15) foram obtidas conforme descrito no item 3.4, em solução salina esterilizada.

Foram padronizadas através de colorimetria (5% transmitância - 650 nm) a uma concentração aproximada de 10^9 ufc/ml.

Transferiram-se dez ml de cada suspensão bacteriana para tubos de ensaio, fervendo-os durante um minuto, diretamente na chama de um bico de Bunsen. Em seguida as suspensões foram resfriadas e transferidas para frascos de vidro esterilizados, juntamente com duas gotas de merthiolate a 0,1%.

Os frascos contendo as suspensões bacterianas fervidas foram devidamente identificados e armazenadas a -20°C até o momento de uso nas reações sorológicas.

3.5.2.4 Titulação dos antissoros

A titulação dos antissoros foi realizada através da técnica de microprecipitina em placas, conforme descrita por ROMEIRO e FUKUDA (1983). Pedacos de polietileno quadriculados foram colocados em placas de Petri com o fundo umedecido.

Os antissoros foram diluídos em solução salina tamponada pH 7.2 (NaCl 8,5 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,01 M, e água 1000 ml), por fatores de 2^{-n} , n variando de 0 a 11 (SOUZA, 1980).

Com micro-pipeta de Pasteur os antissoros foram depositados, nos quadriculados, e a seguir colocou-se uma gota de antígeno preparado conforme o item 3.5.2.1. As placas de Petri foram tampadas e deixadas a temperatura ambiente. Foram feitas duas leituras: aos 60 e 120 minutos. A formação de um precipitado, visualizado em microscópio estereoscópico no menor aumento, indica reação positiva; cada diluição teve três repetições.

3.5.2.5 Reação sorológica dos isolados de Xv pelo teste de dupla difusão em gel-de-ágar

O teste empregado foi feito conforme as técnicas utilizadas por KIMATI (1975) e por SOUZA (1980).

Cinco ml de meio gel fundente constituído de: ágar Difco 0,1%, NaCl 0,85%, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,01 M e 0,01% de merthiolate, foram vertidos em lâminas de vidro, limpas e de

sengorduradas, e deixados no interior de placas de Petri para a solidificação.

Posteriormente foram feitos orifícios no gel, com o aparelho 'Furagar' (LEITE e OLIVEIRA, 1975) de 0,25 cm em diâmetro e de distribuição hexagonal.

Depois de abertos com auxílio de uma bomba de vácuo, os orifícios foram preenchidos duas vezes com antígenos, preparados de acordo com o item 3.5.2.3, ou antissoro puro da 5ª coleta.

As lâminas permaneceram no interior das placas de Petri e para se assegurar a umidade, chumaços pequenos de algodão embebidos em água, foram colocados no interior das placas mantidas a temperatura ambiente.

A avaliação do teste sorológico foi feita 24 e 48 horas após o preparo da reação, observando-se as bandas de precipitação formadas.

3.5.3 Hidrólise de amido

Os isolados P-1, P-3, P-7, P-12, P-13, P-14, T-1, T-5, T-9, T-10, T-14 e T-15 foram cultivados em 5 ml de NL por 48 horas a 26 - 27°C, posteriormente semeados através de uma multi-alça (KUROZAWA, 1980) no meio de cultura sólido (FAHY e PERSLEY, 1983), possuindo a seguinte composição por litro: amido solúvel 2 g, extrato de levedura 5 g, extrato de carne 5 g, peptona 5 g e ágar 15 g. Seis placas de Petri contendo o meio foram semeadas.

Para verificar a ocorrência da hidrólise de amido, verteu-se na superfície do meio de cultura uma solução de

lugol (TUIITE, 1969). Nas reações positivas ocorre a formação de um halo descolorido ao redor das colônias e nas reações negativas, o meio de cultura torna-se azulado.

3.5.4 Sensibilidade a drogas in vitro

Para se determinar o nível de sensibilidade a diferentes antibióticos e fungicidas, os isolados de Xv foram previamente cultivados em 5 ml de NL, durante 48 horas a 26 - 27°C, posteriormente transferidos com auxílio de uma multi-alça (KUROZAWA, 1980) para a superfície dos meios de cultura, contendo diferentes concentrações dos produtos químicos.

Os diferentes antibióticos e fungicidas utilizados encontram-se no quadro 2.

O meio de cultura utilizado foi o BDA que no estado fundente (45 - 48°C), após esterilização adicionou-se ali quotas dos diferentes produtos, previamente suspensos em água destilada esterilizada, para se obter as concentrações finais de 0,1, 1,0, 10, 100 e 1000 ppm, de cada um dos produtos testados.

Os fungicidas oxicleto de cobre, óxido cuproso e hidróxido de cobre juntamente com maneb, mancozeb e zineb foram testados em misturas, nas concentrações finais descritas anteriormente, só que cada uma delas correspondeu à somatória da mistura contendo 50% de cada um dos fungicidas.

Para cada concentração dos produtos químicos foram semeadas cinco placas. Após esta operação, as placas ficaram incubadas durante 96 horas em estufa a 26 - 27°C, observando a seguir o crescimento ou a inibição das colônias. Conside

Quadro 2 - Antibióticos e fungicidas utilizados no experimento

Nome Técnico	Nome Comercial	Concentração do ingrediente ativo	Firma
Cloranfenicol	Soluthor	10%	Tortuga S. A.
Oxitetraciclina	Mycoshiel TMQTHC - 20*	20%	Pfizer S. A.
Sulfato de estreptomina	Distriptide - 20	20%	Rhodia S. A.
Sulfato de estreptomina + Oxitetraciclina	Agrimicina	15% + 1,5%	Pfizer S. A.
Sulfato de neomicina	Biomicina	5%	Aminovit Laborat.Ltda.
Captan	Captan 50 PM	50%	Stauffer Prod.Químicos Ltda.
Captafol	Orto Difolatan 480 FW	48%	Hokko do Brasil
Maneb	Manzate	80%	Du Pont do Brasil
Mancozeb	Dithane M-45	80%	Rhom and Haas do Brasil S.A.
Oxicloreto de cobre	Recop	87%	Sandoz S. A.
Óxido cuproso	Cobre Sandoz	56%	Sandoz S. A.
Sulfato de cobre neutralizado	Mildex BR	50%	Ipiranga Sipcam
Zineb	Zineb Sandoz BR	75%	Sandoz S. A.

* = Produto experimental

rou-se como concentração inibitória a menor concentração da droga que não permitiu o crescimento da bactéria.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização patogênica de isolados de Xv

Os sintomas observados nas avaliações das plantas de pimentão cv. Cascadura Ikeda inoculadas através de pulverização encontram-se no quadro 3 e por injeção no quadro 6. A figura 1 ilustra os sintomas 13 dias e 144 horas após as inoculações por pulverização e injeção, respectivamente. Para a linhagem de pimentão 23-1-7BK, os quadros 4 (inoculação através de pulverização) e 7 (inoculação através de injeção) sintetizam os resultados das avaliações e a figura 2 evidencia os sintomas dez dias e 144 horas após as inoculações através de pulverização e injeção, respectivamente.

Nos quadros 5 e 8 são apresentados os sintomas observados em tomateiro cv. UC-134 inoculados através de pulverização e injeção, respectivamente; a figura 3 evidencia os sintomas sete dias (inoculação através de pulverização) e 144 horas (inoculação através de injeção) após as inoculações.

O pimentão cv. Cascadura Ikeda e a linhagem 23-1-7BK, quando inoculados através de pulverização, apresentaram sintomas semelhantes para cada um dos grupos de isolados

de Xv (pimentão e tomateiro). Os isolados de Xv provenientes de tomateiro incitaram sintomas completamente distintos daqueles de pimentão, sendo que cinco dias após as inoculações apenas as folhas mais jovens apresentaram sintomas. Os isolados de pimentão, desde o início das avaliações, incitaram sintomas em todas as folhas avaliadas. Lesões nas hastes do pimentão 'Cascadura Ikeda' e '23-1-7BK', quando inoculados com isolados de Xv de pimentão, mostraram ser semelhantes, com ligeira alteração na coloração; enquanto para os isolados de tomateiro, apenas o Cv. Cascadura Ikeda evidenciou lesões, sendo estas de coloração diferente.

Foi observada queda acentuada de folhas nas plantas inoculadas com isolados de Xv provenientes de pimentão, embora o isolado T-5 de tomateiro, quando inoculado em pimentão 'Cascadura Ikeda', ocasionasse a queda de quatro folhas. Entretanto, observou-se patogenicidade mais acentuada para os isolados de pimentão do que para os de tomateiro, nessas inoculações.

Os sintomas induzidos pelos isolados de Xv, de tomateiro, na face inferior das folhas de ambos cvs. de pimentão, inoculados por aspersão, assemelham-se àqueles descritos por GARDNER e KENDRICK (1921), em folíolos de batata, inoculados com isolados de Xv, provenientes de tomateiro.

Diferenças nos sintomas das folhas de plantas de pimentão 'Cascadura Ikeda' e '23-1-7BK', inoculadas através de injeção, foram evidenciadas quanto ao hospedeiro original dos isolados de Xv. Desta maneira, isolados de Xv provenientes de pimentão induziram sintomas diferentes daqueles provenientes de tomateiro, nas folhas inoculadas. Houve diferença

Quadro 3 - Diferenciação sintomatológica da pústula bacteriana em pimentão cv. Cascadura Ikeda, inoculado através de pulverização, com isolados de Xv de pimentão e to mateiro

Sintomas nas avaliações			
Isolados	5 dias após a inoculação	13 dias após a inoculação	21 dias após a inoculação
			Tipo de lesão N° de folhas caídas
P-1	A	C	E 27
P-3	A	C	E 27
P-7	A	C	E 27
P-12	A	C	E 27
P-13	A	C	E 27
P-14	A	C	E 27
T-1	B	D	D, F 0
T-5	B	D	D, F 4
T-9	B	D	D, F 0
T-10	B	D	D, F 0
T-14	B	D	D, F 0
T-15	B	D	D, F 0
Testemunha Sem sintomas			

- A - Lesões nas 3ªs, 4ªs e 7ªs folhas circulares a irregulares, tamanho variável e encharcadas (face inferior); irregulares escuras com início de necrose quando presentes (face superior)
- B - Lesões apenas nas 7ªs folhas, circulares, pequenas, encharcadas na face inferior; acompanhadas ou não por lesões semelhantes, de coloração marrom na face superior
- C - Lesões na face inferior das 3ªs, 4ªs e 7ªs folhas: circulares, levemente salientes de coloração palha a verde-cinzenta e áreas irregulares de coloração palha; face superior lesões de formato circular a irregular, de coloração palha envoltas ou não por halos cloróticos
- D - Lesões na face inferior das 3ªs, 4ªs e 7ªs folhas: circulares, pequenas de cor negra; face superior lesões circulares, pequenas, necróticas, de coloração marrom; lesões das 7ªs folhas com halos cloróticos
- E - Lesões nas hastes: alongadas de coloração marrom-cinzenta levemente salientes
- F - Lesões nas hastes: alongadas de coloração marrom levemente salientes.

Quadro 4 - Diferenciação sintomatológica da pústula bacteriana em pimentão da linhagem 23-1-7BK, inoculado através de pulverização, com isolados de Xv de pimentão e de tomateiro

Isolados	Sintomas nas avaliações			
	5 dias após a inoculação	13 dias após a inoculação	21 dias após a inoculação	Nº de folhas caídas
			Tipo de lesão	
P-1	A	C	E	27
P-3	A	C	E	27
P-7	A	C	E	27
P-12	A	C	E	27
P-13	A	C	E	27
P-14	A	C	E	27
T-1	B	D	D	0
T-5	B	D	D	0
T-9	B	D	D	0
T-10	B	D	D	0
T-14	B	D	D	0
T-15	B	D	D	0
Testemunha Sem sintomas				

- A - Lesões na face inferior das 3^{as}, 4^{as} e 7^{as} folhas: circulares a irregular, tamanho variável e encharcadas; face superior lesões de formato irregular, encharcadas de coloração escura em início de necrose
- B - Lesões apenas nas 7^{as} folhas: circulares, pequenas, esparsas, de coloração verde escura a cinza, correspondendo ao das face superior de coloração marrom
- C - Lesões na face inferior das 3^{as}, 4^{as} e 7^{as} folhas: circulares, pequenas, levemente salientes, de coloração verde escura, áreas cloróticas e necróticas irregulares; face superior lesões de formato circular a irregular necróticas, de coloração palha, envoltas ou não por halos cloróticos
- D - Lesões na face inferior das 3^{as}, 4^{as} e 7^{as} folhas: circulares, pequenas, de coloração marrom a negra; face superior lesões circulares, pequenas, necróticas, de coloração marrom a negra; lesões das 7^{as} folhas com halos cloróticos.
- E - Lesões nas hastes: alongadas de coloração cinza levemente salientes

Quadro 5 - Diferenciação sintomatológica da mancha bacteriana em tomateiro cv. 'UC 134', inoculado através de pulverização, com isolados de Xv de pimentão e de tomateiro

Isolados	Avaliações				
	5 dias após a inoculação	13 dias após a inoculação	21 dias após a inoculação		
			Tipo de lesão	Nº de folhas com folíolos	
				Parcialmente necrosados	Necrosados
P-1	B	D	F, H	17	0
P-3	B	D	F, H	22	5
P-7	B	D	F, H	20	3
P-12	B	D	F, H	25	1
P-13	B	D	F, H	23	2
P-14	B	D	F, H	21	0
T-1	A	C	E, G	12	15
T-5	A	C	E, G	15	12
T-9	A	C	E, G	12	15
T-10	A	C	E, G	13	14
T-14	A	C	E, G	15	12
T-15	A	C	E, G	13	11
Testemunha	Sem sintomas				

- A - Lesões na face inferior dos folíolos das 3^{as}, 4^{as} e 5^{as} folhas: encharcadas e brilhantes; face superior lesões circulares, de coloração marrom, apresentando ou não halos cloróticos difusos
- B - Lesões na face inferior dos folíolos das 3^{as}, 4^{as} e 5^{as} folhas: puntiformes, de coloração escura, com halos esbranquiçados, levemente salientes, presença ou não de áreas irregulares de coloração bronzeada, face superior lesões circulares, necróticas, de coloração marrom com halos cloróticos e áreas cloróticas irregulares.
- C - Lesões na face inferior dos folíolos das 3^{as}, 4^{as} e 5^{as} folhas: circulares a irregulares necróticas; face superior circulares a irregulares necróticas, de coloração escura, circundadas por áreas irregulares cloróticas
- D - Lesões na face inferior dos folíolos das 3^{as}, 4^{as} e 5^{as} folhas: circulares, levemente salientes, áreas irregulares de coloração castanha, com ou sem áreas irregulares necróticas, face superior circulares, necróticas de coloração marrom, envoltas ou não por halos cloróticos
- E - Lesões na face inferior dos folíolos das 3^{as}, 4^{as} e 5^{as} folhas: circulares a irregulares, necróticas de coloração escura; face superior lesões circulares a irregulares necróticas, de coloração escura entremeadas por áreas cloróticas
- F - Lesões na face inferior dos folíolos das 3^{as}, 4^{as} e 5^{as} folhas: circulares a irregulares, necróticas, de coloração castanha; face superior lesões circulares a irregulares necróticas, de coloração marrom, entremeadas por áreas cloróticas
- G - Lesões nos pecíolos das 3^{as}, 4^{as} e 5^{as} folhas e nas hastes das plantas: alongadas levemente salientes de coloração cinza-escura
- H - Lesões nos pecíolos das 3^{as}, 4^{as} e 5^{as} folhas e nas hastes das plantas: alongadas, levemente salientes de coloração castanha

Quadro 6 - Diferenciação sintomatológica da pústula bacteriana em pimentão cv. cascadura Ikeda, inoculado através de injeção, com isolados de Xv de pimentão e tomateiro

Isolados	Sintomas* nas avaliações			
	24 horas após a inoculação	48 horas após a inoculação	72 horas após a inoculação	144 horas após a inoculação
P-1	A	A	D	F
P-3	A	A	D	F
P-7	A	A	D	F
P-12	A	A	D	F
P-13	A	A	D	F
P-14	A	A	D	F
T-1	B	C	E	G
T-5	B	C	E	G
T-9	B	C	E	G
T-10	B	C	E	G
T-14	B	C	E	G
T-15	B	C	E	G
Testemunha Sem sintomas				

*Áreas inoculadas das 1.ª, 2.ª, 3.ª e 4.ª folhas

- A - Face inferior das folhas encharcadas, de coloração verde-escura e com aspecto brilhante
- B - Face inferior das folhas: encharcadas, de coloração verde-prata e com aspecto brilhante
- C - Face inferior das folhas: levemente escurecida, de coloração variável verde-castanha a verde prateada e com aspecto brilhante
- D - Face inferior das folhas: encharcadas, de coloração verde-escura; face superior translúcida em início de necrose de coloração palha
- E - Face inferior das folhas: coloração verde-castanha a verde-amarelada; face superior clorótica com manchas necróticas de coloração marrom
- F - Face inferior e superior das folhas: necróticas de coloração palha
- G - Face inferior e superior das folhas: necróticas de coloração marrom com ou sem manchas cloróticas

Quadro 7 - Diferenciação sintomatológica da pústula bacteriana em pimentão da linhagem 23-1-7BK, inoculado através de injeção, com isolados de Xv de pimentão e de tomateiro

Isolados	Sintomas* nas avaliações			
	24 horas após a inoculação	48 horas após a inoculação	72 horas após a inoculação	144 horas após a inoculação
				Tipo de lesão Nº de folhas caídas
P-1	A	A	D	F 14
P-3	A	A	D	F 15
P-7	A	A	D	F 19
P-12	A	A	D	F 17
P-13	A	A	D	F 12
P-14	A	A	D	F 16
T-1	B	C	E	G 20
T-5	B	C	E	G 16
T-9	B	C	E	G 25
T-10	B	C	E	G 16
T-14	B	C	E	G 26
T-15	B	C	E	G 23
Testemunha				

*Áreas inoculadas das 1ªs, 2ªs, 3ªs e 4ªs folhas

A - Face inferior das folhas: encharcadas, de coloração verde-escura e com aspectos brilhante

B - Face inferior das folhas: tênue encharcamento de coloração verde

C - Face inferior das folhas: encharcada, de coloração verde-prata; face superior clorose incipiente ou verde e o restante do limbo foliar levemente clorótico

D - Face inferior das folhas: encharcada, de coloração verde-escura; face superior translúcida em início de necrose de coloração palha

E - Face inferior das folhas: encharcada, de coloração verde-prata a verde escuro; face superior com clorose incipiente ou clorótica com áreas irregulares escuras ou verde e o restante do limbo foliar clorótico

F - Face inferior e superior das folhas: necróticas de coloração palha

G - Face inferior e superior das folhas: necróticas de coloração marrom-cinza apresentando ou não clorose difusa no restante do limbo foliar da face superior

Quadro 8 - Diferenciação sintomatológica da mancha bacteriana em tomateiro cv. 'UC-134' inoculado através de injeção, com isolados de Xv de pimentão e de tomateiro

Isolados	Sintomas* nas avaliações			
	24 horas após a inoculação	48 horas após a inoculação	72 horas após a inoculação	144 horas após a inoculação
P-1	A	C	E	F
P-3	A	C	E	F
P-7	A	C	E	F
P-12	A	C	E	F
P-13	A	C	E	F
P-14	A	C	E	F
T-1	A	B	D	F
T-5	A	B	D	F
T-9	A	B	D	F
T-10	A	B	D	F
T-14	A	B	D	F
T-15	A	B	D	F
Testemunha Sem sintomas				

*Áreas inoculadas dos folíolos das 3^{as} folhas

- A - Face inferior dos folíolos: ligeiramente encharcada de aspecto brilhante
 B - Face inferior dos folíolos: levemente encharcada de coloração verde escura
 C - Face inferior dos folíolos: levemente brilhante; face superior clorose incipiente
 D - Face inferior dos folíolos: encharcada, de coloração verde escura e aspecto brilhante; face superior clorose incipiente
 E - Face inferior dos folíolos: encharcadas, de coloração verde-prata; face superior clorótica em início de necrose de coloração marrom-cinza
 F - Face inferior e superior dos folíolos: necróticas de coloração cinza

Fig. 1 - Sintomas de pústula bacteriana em pimentão 'Cascadura Ikeda', inoculado através de pulverização (A e B) e injeção (C e D) com isolados de Xv de tomateiro (A e C) e de pimentão (B e D).

Fig. 2 - Sintomas de pústula bacteriana em pimentão '23-1-7 BK', inoculado através de pulverização (A e B) e injeção (C e D), com isolados de Xv de tomateiro (A e C) e de pimentão (B e D).

Fig. 3 - Sintomas de mancha bacteriana em tomateiro 'UC-134', inoculado através de pulverização (A e B) e injeção (C e D), com isolados de Xv de tomateiro (A e C) e pimentão (B e D).

no comportamento de cada cv. de pimentão, principalmente em relação aos isolados de Xv, provenientes de tomateiro. Apenas a linhagem '23-1-7BK' apresentou queda de folhas.

O tomateiro UC-134, quando inoculado através de pulverização, desde a primeira avaliação, mostrou diferenças nos sintomas entre os isolados de Xv, de pimentão e de tomateiro (quadro 5). Além de diferença na sintomatologia das folhas, houve diferença quanto a coloração das lesões formadas nos pecíolos e hastes das plantas inoculadas. Independentemente da origem dos isolados ocorreu necrose parcial na maioria dos folíolos das folhas avaliadas, entretanto observou-se maior quantidade de folhas com folíolos totalmente necrosados nas plantas inoculadas com os isolados provenientes de tomateiro.

Folíolos de tomateiro inoculados através de injeção, evidenciaram diferenças, entre os isolados de pimentão e de tomateiro, a partir de 48 horas da inoculação, sendo que a lesão necrótica formada, na área infiltrada, foi igual para todos os isolados de Xv.

Diferenças nos sintomas em plantas de pimentão e de tomateiro, quando submetidos a inoculações cruzadas, com isolados de Xv de pimentão e de tomateiro, não foram evidenciados conforme diversas publicações (GARDNER e KENDIRCK, 1921; 1923; HIGGINS, 1922; BURKHOLDER e LI, 1941; DOOLITTLE e CROSSAN, 1959; DYE et alii, 1964; LUCERO, 1967 e FRENHANI, 1969). Porém, várias diferenças na sintomatologia, nas plantas de pimentão "Cascadura Ikeda" e "23-1-7BK" e de tomateiro "UC-134" foram observados nos ensaios aqui conduzidos.

STALL e COOK (1966) inoculando folhas de pimentão 'XV12-7R' e 'Yolo Imperial' através de injeção com um isolado de Xv de pimentão, observaram que o pimentão 'XV 12-7R' apresentou resistência hipersensitiva à bactéria, evidenciada em 24 horas, onde os tecidos inoculados passaram de verde a verde brilhante e deste último a branco, e o 'Yolo Imperial' a reação de suscetibilidade, onde as áreas infiltradas passaram de verde a amarelada e em seguida tornaram-se marrons. Porém, os sintomas observados nos experimentos de inoculação aqui conduzidos, através de injeção, com os diferentes isolados de Xv, em pimentão 'Cascadura Ikeda' e '23-1-7 BK' não concordam com os de STALL e COOK (1966), uma vez que a reação de suscetibilidade foi completamente diferente daquela exibida pelo pimentão 'Yolo Imperial'.

Na reação de hipersensibilidade, observa-se a perda máxima de eletrólitos nas células dentro de 12 horas (COOK e STALL, 1968), tornando-as sem turgor resultando um colapso irregular, necrótico e escuro na área inoculada, conforme mostrado pelo pimentão '23-1-7 BK' e 'Yolo Y' (COOK e STALL, 1973).

Tanto o pimentão 'Cascadura Ikeda' e '23-1-7 BK' como o tomateiro 'UC-134', quando inoculados através de injeção, não apresentaram reação de hipersensibilidade, dentro de 24 horas, embora o tipo de lesão formada, principalmente em pimentão, tenha diferido substancialmente entre os isolados de pimentão e os de tomateiro.

A inoculação através de pulverização, por ser um método menos drástico, parece ser o mais apropriado para a caracterização patogênica entre isolados de Xv de pimentão e de

tomateiro, em inoculações cruzadas. Entretanto, a maioria dos trabalhos referentes a este tipo de estudo utilizaram do método de injeção (COOK e STALL, 1969; KIMURA et alii, 1972 e DHALBECK e STALL, 1979). BONGIOLO NETO (1986) comenta da praticidade do método de inoculação através de injeção, sendo este utilizado para a seleção de plantas de pimentão resistentes à Xv.

Inoculações com diferentes espécies de bactérias fitopatogênicas pertencentes ao gênero Xanthomonas, em feijoeiro, foram realizadas por DYE (1958), onde este autor concluiu que a especificidade de hospedeiro para bactérias pertencentes a esse gênero não foi um caráter estável. HSU e DICKEY (1972), inoculando folíolos de feijoeiro, através de injeção, com um isolado de Xv de tomateiro, verificaram sintomas semelhantes àqueles induzidos por X. phaseoli nesse hospedeiro.

Talvez a inespecificidade de certos isolados de Xv possa ser explicada pela ocorrência de mutação. Isto foi verificado por DAHBECK e STALL (1979), in vitro, que obtiveram uma taxa de 4×10^{-4} mutantes em cada divisão celular, na conversão de isolado de tomate raça 1 a isolado de pimentão raça 2 e isolado pimentão raça 2 a isolado de tomate raça 1, conforme a classificação de COOK e STALL (1969).

4.2 Cinética de crescimento de Xv no tecido foliar de pimentão e tomateiro

Os resultados médios referentes ao número de ufc de Xv (isolados de pimentão e de tomateiro) por cm² de área foliar amostrada em pimentão 'Cascadura Ikeda', linhagem '23-1-7 BK' e tomateiro 'UC-134', inoculados através de pulverização e injeção separadamente, são apresentados nos quadros 9,

Quadro 9 - Desenvolvimento de Xv no tecido foliar de pimentão 'Cascadura Ikeda', inoculado através dos métodos de pulverização e injeção, separadamente, com dois isolados bacterianos

Número de ufc*/cm ² de área foliar				
Amostragem dias após a inoculação	Método de inoculação			
	Pulverização		Injeção	
	P-7	T-9	P-7	T-9
Inoculação	7,67.10 ⁵ **	1,44.10 ⁵	1,04.10 ⁷	5.29.10 ⁶
2	1,30.10 ⁵	2,45.10 ⁵	5,49.10 ⁸	3.80.10 ⁷
4	4,55.10 ⁶	7,45.10 ⁴	3,59.10 ⁸	2,70.10 ⁸
6	1,34.10 ⁸	3,13.10 ⁵	4,66.10 ⁸	7,72.10 ⁷
8	2,07.10 ⁸	5,76.10 ⁵	2,94.10 ⁸	2,34.10 ⁷

* = Unidades formadoras de colônias

** = Média de cinco repetições

Observa-se menor desenvolvimento das bactérias provenientes do isolado T-9 quando comparado com as do P-7, no tecido foliar amostrado e este efeito foi mais acentuado para o método de inoculação através de pulverização do que o de injeção.

Fig. 4 - Desenvolvimento de *X. campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão (P-7) e tomateiro (T-9) em tecido foliar de pimentão "Cascadura Ikeda", inoculado através de pulverização e injeção, separadamente.

Quadro 10 - Desenvolvimento de Xv no tecido foliar de pimentão '23-1-7BK', inoculado através dos métodos de pulverização e de injeção, separadamente, com dois isolados bacterianos

Amostragem dias após a inoculação	Número de ufc*/cm ² de área foliar			
	Método de inoculação		Injeção	
	Pulverização			
	P-7	T-9	P-7	T-9
Inoculação				
2	3,00.10 ^{5**}	2,24.10 ⁴	1,13.10 ⁶	1,84.10 ⁶
4	5,31.10 ⁶	4,42.10 ⁵	3,33.10 ⁸	1,41.10 ⁶
6	4,06.10 ⁷	9,94.10 ⁵	-	4,15.10 ⁸
8	7,68.10 ⁸	9,69.10 ⁵	1,42.10 ⁸	4,00.10 ⁸
	1,92.10 ⁸	4,86.10 ⁶	3,07.10 ⁶	3,25.10 ⁸

* = Unidade formadora de colônia

** = Média de cinco repetições

- = Leitura perdida devido à contaminação das placas

As bactérias do isolado T-9 multiplicaram menos que as do P-7, no método de inoculação através de pulverização. Isto também foi evidenciado nas duas primeiras amostragens, para o método de injeção, sendo que nas leituras subsequentes os valores foram contrários.

Fig. 5 - Desenvolvimento de *X. campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão (P-7) e tomateiro (T-9) em tecido foliar de pimentão "23-1-7BK", inoculado através de pulverização e injeção, separadamente.

Quadro 11 - Desenvolvimento de Xv no tecido foliar de tomateiro 'UC-134', inoculado a través dos métodos de pulverização e de injeção, separadamente, com dois isolados bacterianos

		Número de ufc*/cm ² de área foliar		
Amostragem dias após a inoculação	Método de inoculação		Injeção	
	Pulverização			
	P-7	T-9	P-7	T-9
Inoculação				
2	5,86.10 ^{5**}	3,60.10 ⁵	2,16.10 ⁶	7,27.10 ⁵
4	2,50.10 ⁶	2,91.10 ⁶	1,56.10 ⁸	4,35.10 ⁷
6	2,50.10 ⁷	2,35.10 ⁷	3,43.10 ⁸	6,63.10 ⁸
8	3,54.10 ⁷	1,00.10 ⁸	4,18.10 ⁸	7,98.10 ⁸
	4,91.10 ⁷	1,81.10 ⁸	-	-

* = Unidade formadora de colônia

** = Média de cinco repetições

- = Leituras perdidas devido à contaminação das placas

Independente do método de inoculação observa-se certa similaridade no desenvolvimento das bactérias dos isolados P-7 e T-9, nos folíolos de tomateiro amostrados, embora o isolado P-7 multiplicou-se numa velocidade pouco inferior ao do T-9

Fig. 6 - Desenvolvimento de *X. campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão (P-7) e tomateiro (T-9) em tecido foliar de tomate "UC 134", inoculado através de pulverização e injeção separadamente

10 e 11 respectivamente. E esses resultados transformados em log 10 nas figuras 4, 5 e 6.

A capacidade de multiplicação de bactérias fitopatogênicas em hospedeiros não congeniais, sem ocorrer a manifestação dos sintomas da doença, foi verificado por ALLINGTON e CHAMBERLAIN (1949), em folhas de plantas de feijoeiro e soja quando inoculadas com P. glycinea e X. phaseoli, respectivamente. Embora, em alguns casos, possa ocorrer aumento da população bacteriana, na superfície do hospedeiro congênial, sem ocorrer a manifestação dos sintomas da doença, onde esta população é considerada residente, conforme verificado por LEBEN (1962; 1963), com Xv em folhas de tomateiro.

Interações incompatíveis entre hospedeiro não congênial e bactérias fitopatogênicas provocam em muitos casos a reação de hipersensibilidade, no hospedeiro, onde ocorre a formação de sintomas atípicos da doença, bem como a redução ou paralização no crescimento do patógeno no tecido infectado (KLEMENT et alii, 1964; KLEMENT e GOODMAN, 1967 e LOZANO e SEQUEIRA, 1970). Entretanto, os resultados obtidos nos ensaios mostraram um menor nível de crescimento das bactérias dos isolados em estudo quando inoculados nos hospedeiros não originais. Ambos pimentões 'Cascadura Ikeda' e '23-1-7 BK' evidenciaram semelhanças nos resultados, principalmente quando as plantas foram inoculadas através de pulverização (figuras 4 e 5). Já para o tomateiro, o desenvolvimento das bactérias, dos isolados P-7 e T-9, foram semelhantes em ambos tipos de inoculação (pulverização e injeção), figura 6.

Decréscimo na concentração bacteriana, em folhas de pimentão 'XV 12-7R' inoculadas através de injeção (STALL e

COOK, 1966), em Capsicum chacoense e em pimentão 'Flórida 23-1' (COOK e GUEVARA, 1984), demonstraram reação de hipersensibilidade, quando inoculadas com isolados específicos de Xv provenientes de pimentão.

HSU e DICKEY (1972), inoculando folíolos de tomateiro por infiltração, caracterizaram as reações de hipersensibilidade e de suscetibilidade, provocadas respectivamente por X. phaseoli e Xv. Na hipersensibilidade ocorreu, logo após a inoculação, um declínio repentino na concentração bacteriana que se manteve, então, em um nível baixo constante; na suscetibilidade a população bacteriana aumentou rapidamente, após a inoculação e, posteriormente, diminuiu gradualmente.

Reação de suscetibilidade de pimentão à Xv foi acompanhada pelo aumento da população bacteriana no tecido infectado, enquanto que na de hipersensibilidade ocorreu um decréscimo progressivo na população (COOK e STALL, 1968; COOK, 1973 e STALL e COOK, 1966).

Uma vez que, nas inoculações realizadas no presente trabalho não houve redução nas concentrações bacterianas isto demonstrou a não existência da resposta hipersensitiva das plantas a esses isolados, mas sim outro tipo de reação a qual provavelmente dificultou a colonização ou a multiplicação da bactéria no tecido foliar, sendo assim uma reação de suscetibilidade das plantas aqui testadas.

4.3 Caracterização sorológica de isolados de Xv

4.3.1 Titulação dos antissoros

No quadro 11 encontram-se os resultados das rea

ções sorológicas, com antígeno homólogo, realizado através da técnica de microprecipitina em placas. Todos os antissoros obtidos possuíam título elevado (1:2048), independente da época de coleta.

Quadro 11 - Título de antissoros Xv P-7 contra antígeno homólogo, pelo método de microprecipitina em placas

Antissoros		Diluição final com reação positiva*
Codificação	Dias após a 1ª imunização	
Soro Normal	*	-
Xv P-7/1	25	1:2048
Xv P-7/2	32	1:2048
Xv P-7/3	39	1:2048
Xv P-7/4	46	1:2048
Xv P-7/5	53	1:2048

* = Avaliação feita 60 e 120 minutos após a instalação do ensaio

- = Reação negativa

4.3.2 Reação sorológica dos isolados de Xv pelo teste de dupla difusão em gel-de-ágar

A figura 7 ilustra a reação sorológica entre os isolados de Xv de pimentão com antissoro XV P-7/5 e entre os isolados de tomateiro com o mesmo antissoro. Entre os isolados de pimentão, o isolado P-14 foi sorologicamente distinto dos outros isolados, não formando uma banda de precipitação, além de que os isolados vizinhos formaram esporão na banda de precipi

Fig. 7 - Reações sorológicas em dupla difusão em gel-de-ágar entre antígenos de Xv de pimentão(P) e tomateiro (T), separadamente, com antissoro Xv P-7/5 (X).

Fig. 8 - Reações sorológicas em dupla difusão em gel-de-ágar entre antígenos de Xv de pimentão(P) e tomateiro (T) em disposição alternada, com antissoro Xv P-7/5 (X).

pitação comum entre eles, próxima ao orifício central do gel-de-ágar.

Não houve diferença sorológica entre os isolados de tomateiro, mas estes o foram quando comparados com os de pimentão, conforme evidenciado na figura 8. Os isolados de pimentão e de tomateiro mostraram certos componentes antigênicos comuns, mas apresentaram diferenças sorológicas nítidas, permitindo separá-los.

Os resultados aqui obtidos concordam com os de LOVREKOVICH e KLEMENT (1965) e O'BRIAN et alii (1967), os quais conseguiram separar, através de testes sorológicos em dupla diusão em gel-de-ágar, isolados de Xv de pimentão e de tomateiro. Entretanto, essa separação não foi obtida em outras experimentações (CHARUDATAN et alii, 1973; SCHAAD, 1976 e SHEKHAWAT e CHAKRAVARTI, 1977; 1979).

Nas publicações de LOVREKOVICH e KLEMENT (1965), CHARUDATTAN et alii (1973) e SCHAAD (1976) aparecem a metodolo-gia empregada no preparo dos antígenos imunizantes, enquanto que os trabalhos de O'BRIAN et alii (1967) e SHEKHAWAT e CHAKRAVARTI (1977; 1979) não a especificam. A metodologia do preparo do antígeno imunizante, no trabalho aqui conduzido, assemelha-se àquela de LOVREKOVICH e KLEMENT (1965), onde foram utilizadas células bacterianas lavadas intactas, enquanto que CHARUDATTAN et alii (1973) usaram bactérias lavadas rompidas por ultra-som e SCHAAD (1976) ribossomos.

Uma vez que os resultados aqui obtidos comprovaram aqueles de LOVREKOVICH e KLEMENT (1965), mas não os de CHARUDATTAN et alii (1973) e SCHAAD (1976), presume-se então

que os determinantes antigênicos, que acusam diferenças sorológicas entre isolados bacterianos de Xv de pimentão e de tomateiro, estejam presentes no flagelo, cápsula ou parede celular mas não ao nível de organelas intracelulares.

4.4 Hidrólise de amido

A hidrólise de amido foi uma característica comum aos isolados de Xv de tomateiro, enquanto que os de pimentão não apresentaram esta habilidade, conforme evidencia o quadro 12.

Quadro 12 - Hidrólise de amido em Xv

Isolados	Reação
P-1	-
P-3	-
P-7	-
P-12	-
P-13	-
P-14	-
T-1	+
T-5	+
T-9	+
T-10	+
T-14	+
T-15	+

- = Reação negativa

+ = Reação positiva

Os resultados aqui obtidos para os isolados de tomateiro concordam com aqueles encontrados por DOIDGE (1921), BURKHOLDER e LI (1941), ROBBS (1959) e MATHIEW e PATEL (1977) e os resultados para os isolados de pimentão com os dos trabalhos de BURKHOLDER e LI (1941), ROBBS (1959), DYE et alii (1964) e LOVREKOVICH e KLEMENT (1965).

4.5 Sensibilidade a drogas in vitro

Os resultados referentes às avaliações das concentrações mínimas inibitórias dos antibióticos e dos fungicidas encontram-se nos quadros 13, 14 e 15.

Conforme os resultados apresentados no quadro 13, verifica-se que a maioria dos isolados de Xv, independente da origem do hospedeiro foram insensíveis a concentração de 1000 ppm de sulfato de estreptomicina. Esse resultado concorda com aqueles obtidos por KUROZAWA et alii (1983) e por TAKATSU (1982), embora o último autor não tenha apresentado as concentrações toleradas pelos isolados bacterianos a esse antibiótico. Apenas os isolados P-1 e P-3 foram sensíveis a concentração de 10 ppm e o T-14 a 100 ppm de sulfato de estreptomicina.

Trabalhos desenvolvidos in vitro por THIRUMALA CHAR et alii (1956) e TAKATSU (1982), revelaram a sensibilidade da bactéria à oxitetraciclina. Também a mistura de sulfato de estreptomicina com oxitetraciclina demonstrou potencialidade na inibição dos isolados em estudo. Estes resultados coincidem com aqueles obtidos por THAYER e STALL (1961), SHARMA et alii (1981) e KUROZAWA et alii (1983), nas mesmas condições.

●Quadro 13 - Concentração mínima inibitória, em ppm, de antibióticos, para isolados de Xv, provenientes de pimentão e de tomateiro

Isolados	Antibióticos			
	Cloranfenicol	Oxitetraciclina	Sulfato de es- treptomina	Sulfato de es- treptomina + oxitetraciclina (*)
P-1	100	1	10	10
P-3	100	1	10	10
P-7	100	1	> 1000	10
P-12	100	1	> 1000	10
P-13	100	1	> 1000	100
P-14	100	1	> 1000	100
T-1	100	1	> 1000	100
T-5	100	1	> 1000	10
T-9	100	1	> 1000	10
T-10	100	1	> 1000	10
T-14	100	1	100	10
T-15	100	1	> 1000	10

* = Produto comercial Agrimicina possuindo a concentração de 16,5% da mistura dos antibióticos.

Quadro 14 - Concentração mínima inibitória, em ppm, de diferentes fungicidas, para isolados de Xv, provenientes de pimentão e de tomateiro

Isolados	Fungicidas						
	Captan	Captafol	Maneb	Mancozeb	Zineb	Hidroxi do de cobre	Oxiclore to de cobre
P-1	10	1000	10	10	100	100	100
P-3	10	10	10	10	100	100	100
P-7	10	10	10	10	100	100	100
P-12	10	1000	10	10	100	100	100
P-13	10	1000	10	10	100	100	100
P-14	10	10	10	10	100	100	100
T-1	10	1000	10	10	100	100	100
T-5	10	1000	10	10	100	100	100
T-9	10	1000	10	10	100	100	100
T-10	10	1000	10	10	100	100	100
T-14	10	1000	10	10	100	100	100
T-15	10	1000	10	10	100	100	100

Quadro 15 - Concentração mínima inibitória, em ppm, da mistura de fungicidas cúpricos com dithiocarbamatos, para isolado de Xv, provenientes de pimentão e de tomateiro

Isolados	Fungicidas* associados								
	Hidróxido de cobre			Oxicloreto de cobre			Óxido cuproso		
	Maneb	Mancozeb	Zineb	Maneb	Mancozeb	Zineb	Maneb	Mancozeb	Zineb
P-1	10	10	10	10	10	10	1	1	10
P-3	10	10	10	10	10	10	1	1	10
P-7	10	10	10	10	10	10	1	1	10
P-12	10	10	10	10	10	10	1	1	10
P-13	10	10	10	10	10	10	1	1	10
P-14	10	10	10	10	10	10	1	1	10
T-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T-9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T-10	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T-14	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T-15	1	1	1	1	1	1	1	1	1

* Mistura contendo 50% de cada um dos produtos

A concentração mínima inibitória da mistura de sulfato de estreptomicina com oxitetraciclina, para os isolados em estudo, foi de 10 ppm, independente da sensibilidade dos mesmos ao sulfato de estreptomicina. Provavelmente a inibição dos isolados não sensíveis ao sulfato de estreptomicina seja devido à oxitetraciclina existente na mistura, uma vez que estes foram sensíveis a concentração de 1 ppm desse antibiótico. Esse resultado também foi observado em C. michiganense por KUROZAWA (1980).

Foi necessária uma concentração relativamente elevada de cloranfenicol para inibir os isolados (100 ppm), aproximando-se daquela obtida por AZEVEDO et alii (1965), com um isolado de X. campestris, sendo esta de 128 ppm. Porém, isolados de Xv mais sensíveis ao cloranfenicol, in vitro, foram encontrados por MEADOWS e STALL (1981) e por KUROZAWA et alii (1983).

Os isolados variaram quanto à sensibilidade ao sulfato de neomicina, alguns foram sensíveis a concentração de 10 ppm e outros a 100 ppm. Entretanto essas concentrações foram elevadas, quando comparadas com aquela necessária para inibir X. campestris pv. manihotis, que foi de 2 ppm (SOUZA e CRUZ FILHO, 1979).

Os fungicidas captan, maneb e mancozeb apresentaram concentração inibitória igual, para todos os isolados bacterianos, que foi de 10 ppm. O resultado obtido com o captan assemelha-se àquele publicado por MARINGONI e KUROZAWA (1984), onde esses autores obtiveram, a inibição de isolados de Xv, provenientes de tomateiro, na concentração de 12,5 ppm, desse fungicida.

cida. O maneb foi tóxico a Xv, sendo que esse resultado concorda com os de WU et alii (1980) em X. campestris pv. mangiferae, e com os de CONLIN e McCARTER (1983), em P. syringae pv. tomato. O mancozeb também foi tóxico a Xv, sendo que esse resultado coincide com o de MARCO e STALL (1983) e não com o de SHARMA et alii (1981).

A maioria dos isolados bacterianos foram poucos sensíveis ao captafol, necessitando a concentração de 1000 ppm para inibi-los, embora os isolados P-3, P-7 e P-14, fossem sensíveis a concentração de 10 ppm desse fungicida. CONLIN e McCARTER (1983), em seus estudos, comentam que o captafol não foi tóxico a P. syringae pv. tomato.

Zineb, hidróxido de cobre, oxicloreto de cobre e sultato de cobre neutralizado apresentaram a mesma concentração inibitória para os isolados (100 ppm). Para o óxido cuproso, os isolados de Xv de pimentão foram mais sensíveis que os de tomateiro, necessitando 10 e 100 ppm, respectivamente, para inibi-los, embora o isolado T-14, de tomateiro, fosse sensível a concentração de 10 ppm desse fungicida. ADASKAVEG e HINE (1985) observaram que o zineb foi tóxico, in vitro, a diversos isolados de Xv de pimentão, e fungicidas cúpricos foram ou não tóxicos a isolados de Xv, dependendo da sensibilidade deles (SHARMA et alii, 1981; MARCO e STALL, 1983 e ADASKAVEG e HINE, 1985).

KUROZAWA et alii (1983) verificaram in vitro concentrações inibitórias variáveis para oxicloreto de cobre entre isolados de Xv de tomateiro, onde essas concentrações foram inferiores a 31,25 ppm ou a 125 ppm; entretanto os resultados aqui obtidos, evidenciem que a concentração de 100 ppm desse fungicida seja suficiente para inibir os isolados.

A associação dos fungicidas hidróxido de cobre ou oxicloreto de cobre ou óxido cuproso com maneb, mancozeb ou zineb apresentou efeito sinérgico, sendo mais tóxicos juntos do que separados, conforme verificado no quadro 15. Os isolados de pimentão foram menos sensíveis que os de tomateiro a essas misturas, excetuando-se a associação de óxido cuproso com maneb ou mancozeb, onde todos isolados foram sensíveis a concentração de 1 ppm.

COX (1982), cita Evans e Sasser, onde esses pesquisadores observaram a formação de um produto cupro-carbamato resultante da mistura de maneb com fungicidas cúpricos, sendo que essa mistura era relativamente eficiente quando aplicada em pulverização, visando o controle da mancha bacteriana do tomateiro. MARCO e STALL (1983) explicaram que o efeito sinérgico entre hidróxido de cobre e mancozeb foi devido a maior solubilização do cobre, existente no fungicida cúprico, sendo este liberado em solução, devido ao abaixamento do pH no meio.

Em muitos casos, a insensibilidade de *Xv* a determinados antibióticos e fungicidas é explicada por diferentes pesquisas. Deste modo, LAI et alii (1977) comentam que a resistência de isolados de *Xv*, de tomateiro, à carbeniciclina, neomicina, kanamicina e tetraciclina era devida a plasmídios e, à estreptomicina, devido a mutação a nível de cromossomo. Para fungicidas cúpricos STALL et alii (1984) evidenciaram a presença de plasmídio, o qual conferiu a insensibilidade ao cobre, a *Xv* de pimentão.

LAI et alii (1977) mostraram a estabilidade desses plasmídios em bactéria associada ao tecido vegetal doente,

e se a bactéria era mantida por algum tempo em meio de cultura tais plasmídios desapareciam; mas se a mutação ocorresse a nível de cromossomo, esta se mantinha mesmo quando o isolado fosse cultivado in vitro.

Ressalvas deverão ser feitas para os resultados de sensibilidade à crogas in vitro, uma vez que, segundo as informações de LAI et alii (1972), plasmídios que conferem resistência à Xv, de tomateiro, a determinados antibióticos são perdidos com o cultivo in vitro, assim o mesmo poderá ser sensível a determinados produtos in vitro, mas não in vivo, quando os plasmídios estiverem presentes nas bactérias associadas ao tecido doente, bem como nas residentes (LEBEN, 1962; 1963), em tecidos sadios.

Não foi observado resistência cruzada e nem sensibilidade colateral nos isolados testados, sensíveis ou não à estreptomicina, frente a outros antibióticos e fungicidas aqui ensaiados.

5. CONCLUSÕES

- . Isolados de Xv, provenientes de pimentão e de tomateiro, induziram sintomas distintos de doença, em inoculações cruzadas, em plantas de pimentão 'Cascadura Ikeda', '23-1-7BK' e de tomateiro 'UC-134', sendo a reação dessas plantas de suscetibilidade.
- . Isolados de Xv, de tomateiro e de pimentão, foram sorologicamente distintos, embora ocorresse diferença sorológica entre isolados de pimentão.
- . Isolados de Xv de tomateiro hidrolisaram amido e os de pimentão não; isolados de tomateiro foram mais sensíveis à mistura de certos fungicidas cúpricos com dithiocarbamatos do que isolados de pimentão.
- . Isolados de Xv sensíveis ou não ao sulfato de estreptomicina não apresentaram resistência cruzada e nem sensibilidade colateral a outros antibióticos e fungicidas aqui ensaiados.

6. LITERATURA CITADA

- ABRAHAM, K. e J. MATHEW, 1982. Control of bacterial leaf spot of betel vine. Agricultural Research Journal of Kerala, **20**:37-40. Apud Review of Plant Pathology, **64**(10): 446, 1985 (abstr.).
- ADASKAVEG, J.E. e R.B. HINE, 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria, causal agent of bacterial spot of pepper. Plant Disease, St. Paul, **69**:993-996.
- ALLINGTON, W.B. e D.W. CHAMBERLAIN, 1949. Trends in the population of pathogenic bacteria within leaf tissue of susceptible and immune plant species. Phytopathology, St. Paul, **39**:659-660.
- AZEVEDO, J.L., 1961. Resistência e mutação de Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson, em relação a alguns antibióticos. Piracicaba, ESALQ/USP, 48 p. (Tese de Doutorado).
- AZEVEDO, J.L., 1973. Resistência aos antibióticos em bactérias fitopatogênicas. Ciência e Cultura, São Paulo, **25**:326-329.

- AZEVEDO, J.L. e R.N. NEDER, 1963. Comparação entre o crescimento de linhagens mutantes resistentes a antibióticos, e linhagens não mutantes de Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, **22**:62-79.
- AZEVEDO, J.L.; R.N. NEDER e T.J.B. MENEZES, 1965. Comportamento in vitro de uma bactéria fitopatogênica frente a diversos antibióticos. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, **22**:61-71
- BACH, E.E.; A.P.C. ALBA; A.L.G. PEREIRA; A.G. ZAGATTO e V. ROSSETTI, 1978. Serological studies of Xanthomonas citri (Hasse) Dowson. Arg. Inst. Biológico, São Paulo, **45**:229-236.
- BALARAMAN, K. e C.K.S. RAJAGOPALAN, 1978. Control of bacterial blight of rice - assay of chemicals. Madras Agricultural Journal, **65**:463-469. Apud Review of Plant Pathology **59**(12):566, 1980 (abstr.)
- BARBOSA, V. e J.M. SILVA NETO, 1981. Incidência da mancha bacteriana (Xanthomonas vesicatoria) em tomateiro industrial no estado de São Paulo. Anais do XXI Congresso Brasileiro de Olericultura, Campinas, p. 115 (resumo).
- BATISTA, A.C., 1947. Principais doenças das plantas, em 0 Nordeste. Bol. Secr. Agr. Ind. Com. Pernambuco, Recife, **14**:5-46.
- BEHNIWAL, M.S. e R.D. PARASHAR, 1981. Evaluation of antibiotics and fungicides for the control of bacterial leaf spot of mung. Haryana Agricultural University Journal of

- Research, **11**:36-39. Apud Review of Plant Pathology, **60** (12):621, 1981 (abstr.).
- BONGIOLO NETO, A., 1986. Estudo da bactéria Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (Doidge) Dye e fontes de resistência em Capsicum L. Brasília, UnB, 110 p. (Dissertação de Mestrado).
- BURKHOLDER, W.H. e C.C. LI, 1941. Variation in Phytomonas vesicatoria. Phytopathology, St. Paul, **31**:753-755.
- BURTH, V.; M. JAHN; B. PETT; J. GÖTZE G. BRAZDA, 1978. Possibilities for the development of the resistant pathogens during chemical treatment of potatoes and its significance in the procedure. Nachv. für den Pflanz, in der DDR, **32**:216. Apud Review of Plant Pathology, **58**(5):196, 1979 (abstr.).
- CASTILHO, M.L.C. e C. KUROZAWA, 1980. Comportamento de cultivares e espécies selvagens de tomateiro (Lycopersicon spp) à mancha bacteriana (Xanthomonas vesicatoria (Doidge) Dowson). Summa Phytopathologica, Piracicaba, **6**:5-6 (resumo)
- CHARUDATTAN, R.; R.E. STALL e D.L. BATCHELOR, 1973. Serotypes of Xanthomonas vesicatoria unrelated to its pathotypes. Phytopathology, St. Paul, **63**:1260-1265.
- CHAUHAN, H.L. e M.U. VAISHANAV, 1980. Control of bacterial blight of rice caused by X. oryzae. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, **10**:77-79.
- CICCARONE, A. e W.J. DOWSON, 1959. Notas sobre algumas bacterioses do tomateiro em São Paulo. O Biológico, São Paulo, **25**:131-133.

- CONLIN, K.C. e S.M. McCARTER. 1983. Effectiveness on selected chemicals in inhibiting Pseudomonas syringae pv. tomato in vitro and in controlling bacterial speck. Plant Disease, St. Paul, **67**:639-644.
- COOK, A.A. 1973. Characterization of hypersensitive in Capsicum annuum induced by the tomato strain of Xanthomonas vesicatoria. Phytopathology, St. Paul, **63**:915-918.
- COOK, A.A. e R.E. STALL, 1968. Effect of Xanthomonas vesicatoria on loss of electrolytes from leaves of Capsicum annuum. Phytopathology, St. Paul, **58**:617-619.
- COOK, A.A. e R.E. STALL, 1969. Differentiation of pathotypes among isolates of Xanthomonas vesicatoria. Plant Disease Reporter, St. Paul, **53**:617-619.
- COOK, A.A. e Y.G. GUEVARA, 1984. Hypersensitive in Capsicum chacoense to race 1 of bacterial spot pathogen of pepper. Plant Disease, St. Paul, **68**:329-330.
- COX, R.S. 1982. Control of bacterial spot of tomato in southern Florida. Plant Disease, St. Paul, **66**:870.
- COX, R.S.; R.A. CONOVER e G. SOWELL, 1956. Symptomatology of bacterial spot of pepper and tomato in southern Florida. Phytopathology, St. Paul, **46**:582-584.
- DEMPSEY, A.H. e J.T. WALQUER, 1973. Efficacy of calcium and sodium hypochlorite for seed treatment of pepper. Hortscience St. Joseph, **8**:328-329.
- DHALBECK, D. e R.E. STALL, 1979. Mutation for change of race in cultures of Xanthomonas vesicatoria. Phytopathology, St. Paul, **69**:634-636

- DOIDGE, E.M., 1921. A tomato canker. Ann. Appl. Biol., Warwick, **7**:407-430
- DOOLITTLE, S.P. e D.F. CROSSAN, 1959. Strains of Xanthomonas vesicatoria (Doidge) Dowson differing in virulence on tomato and pepper. Plant Disease Reporter, St. Paul, **43**:1153.
- DYE, D.M., 1958. Host specifity in Xanthomonas. Nature, London, **182**:1813-1814.
- DYE, D.M., 1980. Xanthomonas. In: SCHAAD, N.W. (ed). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria The American Phytopathological Society, p. 45-49.
- DYE, D.W.; J.F. BRADBURY; M. GOTO; A.C. HAYWARD; R.A. LELLIOT e M.N. SCHROTH, 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. Review of Plant Pathology **59**:153-168.
- DYE, D.W.; M.P. STARR e H. STOLP, 1964. Taxonomic clarification of Xanthomonas vesicatoria based upon host specifity, bacteriophage sensibility, and cultural characteristics. Phytopath. Zeitschr., Berlim, **51**:394-407
- ENGLISH, A.R. e G. VanHALSEMA, 1954. A note on the delay in the emergence of resistant Xanthomonas and Erwinia strains by use of streptomycin plus terramycin combination. Plant Disease Reporter, St. Paul, **38**:429-431.
- ERASMUS, H.O.; F.N. MATHEE e H.A. LOUW, 1974. A comparision between plant pathogenic species of Pseudomonas, Xanthomonas and Erwinia with special reference for bacterial blight of wines. Phytophylactica, **6**:11-18.

- FAHY, P.C. e G.L. PERSLEY, 1983. Plant bacterial diseases a diagnostic guide. Academic Press. Sydney. 393 p.
- FRENHANI, A.A. 1969. Caracterização de uma cepa de Xanthomonas vesicatoria (Doidge) Dowson isolada de uma cultura comercial de pimentão (Capsicum annuum L.), localizada em Campinas, S.P. O Biológico, São Paulo, **35**:36-40.
- FRENHANI, A.A.; J.R. BERNARDINI; B.P.P. CRUZ e S.G.P. SILVEIRA 1972. Comportamento de variedades de pimentão (Capsicum annuum) e páprika (Capsicum sp.) com relação à pústula bacteriana (Xanthomonas vesicatoria (Doidge) Dowson). Arq. Inst. Biológico, São Paulo, **39**:35-41.
- GARDNER, M.W. e J.B. KENDRICK, 1921. Bacterial spot of tomato. Journal of Agricultural Research, Washington, D.C. **21**:123-156.
- GARDNER, M.W. e J.B. KENDRICK, 1923. Bacterial spot of tomato and pepper. Phytopathology, St. Paul, **23**:307-315.
- GOLDSWORTHY, M.G. 1928. The production of agglutinins by phytopathogenic bacteria. Phytopathology, St. Paul, **18**: 277-288.
- GYNEPADZE, M.S.; B.N. KHURTSIA; N.H. KHUTSISHVILI e A.R. TUKHARELI, 1978. Comparative toxicity of new fungicides towards the causal agent of bacterial disease of mulberry, Pseudomonas mori (Boyer & Lambert) Stens. Soob Akad. Mank. Gruz. SSR, 92:713-716. Apud Review of Plant Pathology, **59** (1):38, 1980.

- HARRISON, D.E. e H. FREEMAN, 1961. Bacterial wilt of potato. II Serological relationship of two strains of Pseudomonas solanacearum and a culture of Corynebacterium sepedonicum. Aust. J. Agric. Res., Victoria, **12**:872-877.
- HIGGINS, B.B. 1922. The bacterial spot of pepper. Phytopathology, St. Paul, **12**:501-516.
- HSU, S.T. e R.S. DICKEY, 1972. Comparative growth of Xanthomonas phaseoli and Xanthomonas vesicatoria of symptoms in bean and tomato leaves. Phytopathology, St. Paul, **62**:329-332.
- JENKINS, S.F.; D.J. MORTON e P.D. DUKES, 1966. Distinguishing Pseudomonas solanacearum infections from other peanut wilt diseases by use of serological techniques. Plant Disease Reporter, St. Paul, **50**:836-838.
- KAKRALIA, O.P.; J.P. YADAU e R.S. MEHROTRA, 1984. Effect (in vitro) of some fungicides and antibiotic on Rhizobium leguminosarum. Pesticides, 19:52-53. Apud Review of Plant Pathology, **64**(9):472, 1985 (abstr.)
- KIMATI, H. 1975. Taxonomia, esporulação e patogenicidade de Colletotrichum graminicola (Ces.) Wils. (sensu Arx, 1957), Piracicaba, ESALQ/USP. 103 p. (Tese de livre-Docência).
- KIMURA, O.; C.F. ROBBS; F. AKIBA e J. TERANISHI, 1976. Identificação de um novo grupo de Xanthomonas vesicatoria (Doidge) Dowson infectando a berinjela (Solanum melongena). Rev. Soc. de Fitopatologia, Brasília, **9**:3 (resumo).

- KIMURA, O.; C.F. ROBBS; R.L.D. RIBEIRO; F. AKIBA e S. SUDO, 1972. Identificação de patótipos de Xanthomonas vesicatoria (Doidge) Dowson, ocorrendo na região centro-sul do Brasil. Arq. Inst. Biológico, São Paulo, **39**:43-49.
- KIRÁLY, Z.; Z. KLEMENT; F. SOLYMOSY e J. VOROS, 1974. Methods in Plant Pathology. Budapest, Elsevier Scientific Publishing Company. 509 p.
- KLEMENT, Z., 1963. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. Nature, London, **199**:299-300
- KLEMENT, Z.; G.L. FARKAS e L. LOVREKOVICH, 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf. Phytopathology, St. Paul, **54**:474-477.
- KLEMENT, Z. e R.N. GOODMAN, 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, California, **5**:17-44.
- KLINGNER A.E. e R.E. SOLANES, 1968. La mancha bacteriana del pimiento en la Argentina. Revista de la Facultad de Ciencias Agrária, Cuyo, **14**:127-141.
- KRAMER, M. 1959. Consultas: "Mancha bacteriana" do tomateiro. O Biológico, São Paulo, **25**:149.
- KUROZAWA, C. 1980. Caracterização de Corynebacterium michiganense (Smith) Jensen através de serologia e sensibilidade a bacteriófagos, a drogas e bacteriocinas. Botucatu, FCA/UNESP, 61 p. (Tese de Livre-Docência).
- KUROZAWA, C.; A.C. MARINGONI; V. BARBOSA e J.M. SILVA NETO, 1983. Sensibilidade in vitro de Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (Doidge) Dye do tomateiro a drogas. Anais do

XXII Congresso Brasileiro de Olericultura, Rio de Janeiro p. 70 (resumos).

- KUROZAWA, C.; A.C. MARINGONI; V. BARBOSA e J.M. SILVA NETO, 1984. Tratamento químico de sementes de tomateiro inoculadas artificialmente com Xanthomonas campestris (Pammel) pv. vesicatoria (Doidge) Dye. Anais do XXIV Congresso Brasileiro e I Reunião Latino Amerciana de Olericultura, Jaboticabal, p. 177 (resumo).
- LAI, M.; S. SHAFFER e N.J. PANOPOULOS, 1977. Stability of plasmid-borne antibiotics resistance in Xanthomonas vesicatoria in infected tomato leaves, Phytopathology, St. Paul, **67**:1527-1530.
- LEBEN, C., 1962. Xanthomonas vesicatoria a resident on tomato seedlings. Phytopathology, St. Paulo, 52:17-18. (abstr.)
- LEBEN, C.; 1963. Multiplication of Xanthomonas vesicatoria on tomato seedlings. Phytopathology, St. Paul, **53**:778-781.
- LEITE, A. F. e A.R. OLIVEIRA, 1975. Furagar. Summa Phytopathologica, Piracicaba, **1**:143-146.
- LEMONS, M.A., 1970. Comportamento de mutantes de Xanthomonas campestris (Pam.) Dowson resistentes à aureomicina e à estreptomomicina em relação ao tratamento de sementes de repolho (Brassica oleracea var. capitata L.) com esses antibióticos. Piracicaba, ESALQ/USP, 60 p. (Dissertação de Mestrado).
- LINK, G.K.K. e C.G. SHARP, 1927. Correlation of host and serological specificity of Bacterium campestre, Bacterium flaccumfaciens, Bacterium phaseoli and Bacterium phaseoli sojense. Bot. Gaz., **83**:145-160.

- LOVREKOVICH, L. e Z. KLEMENT, 1965. Serological and bacteriophage sensitivity studies on Xanthomonas vesicatoria strains isolated from tomato and pepper. Phytopathol. Z. Berlim, **52**:222-228.
- LOVREKOVICH, L.; KLEMENT e W. J. DOWSON, 1963 Serological investigation of Pseudomonas syringae and Pseudomonas mors prunorum. Phytopathol. Z., Berlim, **47**:19-24.
- LOZANO, J.C. e L. SEQUEIRA, 1970. Differentiation of races of Pseudomonas solanacearum by leaf infiltration technique. Phytopathology, St. Paul, **60**:833-838.
- LUCERO, H. 1967. Mancha bacteriana del tomato (Xanthomonas vesicatoria) em Mendoza. Idia, Buenos Aires, (**240**):42-46.
- MARCO, G.M. e R.E. STALL, 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria that differ in sensitivity to copper. Plant Disease, St. Paul, **67**:779-781.
- MARINGONI, A.C. e C. KUROZAWA, 1984. Efeito de captan, chloro thalonil, ciclohexamida e thiram no isolamento de Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (Dowson) Dye. Summa Phytopathologica, Piracicaba, **10**:64-66 (resumo).
- MATHIEW, J. e P.N. PATEL, 1977. Variability in Xanthomonas vesicatoria (Doidge) Dowson from tomato, chilli and datura. Current Science, Bagalaore, **46**:72.

- MEADOWS, M.E. e R.E. STALL, 1981. Different induction for hypersensitivity in pepper to Xanthomonas vesicatoria determined with antimicrobial agents. Phytopathology, St. Paul, **71**:1024-1027.
- MEHTA, P.P.; D. GOTTLIEB e D. POWELL, 1959. Vancomycin, a potential agent for plant disease prevention. Phytopathology, St. Paul, **49**:177-183.
- MORTON, D.J., 1966. Bacterial spot development in excised pepper and tomato leaves at several temperatures. Phytopathology, St. Paul, **56**:1194-1195.
- MORTON, D.J.; P.D. DUKES e S.F. JENKINS, 1965. Serological identification of Pseudomonas solanacearum in four solanaceous hosts. Phytopathology, St. Paul, **55**:1191-1193.
- NAMEKATA, T., 1971. Estudos comparativos entre Xanthomonas citri (Hasse) Dow., agente causal do "cancro cítrico" e Xanthomonas citri (Hasse) Dow. N.F.S.P. aurantifolia, agente causal da "cancrose do limoeiro galego". Piracicaba, ESALQ/USP. 65 p. (Tese de doutoramento).
- O'BRIEN, L.M.; D.L. MORTON; W.J. MANNING e R.W. SCHEETZ, 1967. Serological differences between apparently typical pepper and tomato isolates of Xanthomonas vesicatoria. Nature, London, **215**:532-533.

- ORELLANA, R.G. e D.F. WEBER, 1971. Immunodiffusion analysis of isolates of Xanthomonas cyamopsidis. Appl. Microbiol. **22**:622-624.
- OTTA, J.D. e H. ENGLISH, 1971. Serology and pathogenicity of Pseudomonas syringae. Phytopathology, St. Paul, **67**: 22-26.
- REIFSCHNEIDER, R.J.B.; N.A. BONGIOLO e A. TAKATSU, 1985. Reappraisal of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria strains-theirs terminology and distribution. Fitopatologia Brasileira, Brasilia, **10**:201-204.
- ROBBS, C.F., 1959. Contribuição ao estudo da mancha bacteriana do tomateiro, causada por Xanthomonas vesicatoria. Instituto de Economia Rural - Série de Divulgação de Pesquisas, Rio de Janeiro, (2):31-34.
- ROMEIRO, R.S. e C. FUKUDA, 1983. Método simples de título de aglutinação e/ou precipitação do antissoro ou do antígeno. Fitopatologia Brasileira, Brasilia, **8**:93-95.
- RUIZ-SAINZ, J.E.; J.E. BERINGER e A.M. GUTIERREZ-NAVARRO, 1984. Effect of the fungicide captafol on the survival and symbiotic properties of Rhizobium trifolii. J. Appl. Bacteriol. **57**:361-367.
- SCHAAD, N.W., 1976. Immunological comparison and characterization of ribossomes of Xanthomonas vesicatoria. Phytopathology, St. Paul, **66**:770-776.
- SCHAAD, N.W., 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. Ann. Rev. Phytopath., Palo Alto, **17**:123-147.

- SCHAAD, N.W., 1980. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. St. Paul. The American Phytopathological Society, 72 p.
- SHARMA, R.R.; B.S. THIND e N. SINGH, 1981. In vitro and in vivo evaluation of chemicals against Xanthomonas vesicatoria, the causal agent of bacterial leaf spot of chillies. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 11:178-182.
- SHEKRAWAT, P.S. e B.P. CHAKRAVARTI, 1977. Serological tests to find out antigenic differences among isolates of Xanthomonas vesicatoria (Doidge) Dowson and some others phytopathogenic bacteria. Current Science, 46:46-47.
- SHEKRAWAT, P.S. e B.P. CHAKRAVARTI, 1979. Serological differentiation among Xanthomonas vesicatoria isolates from chilli, tomato and dhatura. Indian Phytopathology, 32:413-416.
- SOUZA, N.L., 1980. Reações de linhagens e cultivares de milho (Zea mays L.) a Pseudomonas alboprecipitans Rosen. Piracicaba, ESALQ/USP. 65 p. (Dissertação de Mestrado).
- SOUZA, P.E. e J. CRUZ FILHO, 1979. Determinação in vitro da sensibilidade de Xanthomonas manihotis à antibióticos. Fitopatologia Brasileira, 4:154 (resumo)
- STALL, R.E. e A.A. COOK, 1966. Multiplication of Xanthomonas vesicatoria and lesion development in resistant and susceptible pepper. Phytopathology, St. Paul. 56:1152-1154.
- STALL, R.E.; D.E. LOSCHKE e R.W. RICE, 1984. Conjugation transfer of copper resistance and avirulence to pepper within strain of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria. Phytopathology, 74:797 (abstr.).

- STALL, R.E. e P.L. THAYER, 1962. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and lesion development in resistance and susceptible pepper. Phytopathology, St. Paul, **52**:1152-1154.
- STRIDER, D.L., 1979. Erradication of Xanthomonas nigromaculans f. sp. zinniae in zinnia seed with sodium hypochlorite. Plant Disease Reporter, St. Paul, **34**:127-128.
- TAKATSU, A., 1982. Sensibilidade de Corynebacterium michiganense e Xanthomonas campestris pv. vesicatoria à estreptomicina e a tetraciclina. Anais do XV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Paulo, p. 100 (resumo).
- THAYER, P.L. e R.E. STALL, 1961. Effect of variation in the bacterial spot pathogen of pepper and tomato on control with streptomycin. Phytopathology, St. Paul, **51**:568-571.
- THIRUMALACHAR, M.J.; M.K. PATEL; N.B. KULKARNI e G.W. DHANDE, 1956. Effects in vitro of some antibiotics on thirty-two Xanthomonas species occurring in India. Phytopathology, St. Paul, **46**:486-488.
- TUITE, J., 1969. Plant Pathological Methods Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Company. Minneapolis, 239 p.
- WOLTZ, S.S. e J.P. JONES, 1979. Effects of magnesium on bacterial spot of pepper and tomato and on the in vitro inhibition of Xanthomonas vesicatoria by streptomycin. Plant Disease Reporter, St. Paul, **63**:182-184.
- WU, W.C.; R.N.Y. CHEN; J.C. WU; L. SU; C.F. WANG e S.H. VENG, 1980. Xanthomonas campestris pv. mangiferaeindica, its phages and its sensitivity to chemicals. Plant Prot. Bull.

Taiwan, 22:287-298, Apud Review of Plant Pathology, 61
(3):108, 1982.

YOUNG, J.M.; D.W. DYE; J.F. BRADBURY; P.C. PANAGOPOULOS e C.
F. ROBBS, 1978. A proposed nomenclature and classifica
tion for plant pathogenic bacteria. Journal Agricultural
Research, Washington D.C., 21:155-177.