

## Sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em manipueira sob condições ambientais<sup>(1)</sup>

Gustavo de Faria Theodoro<sup>(2)</sup> e Antonio Carlos Maringoni<sup>(3)</sup>

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de um isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*), resistente ao sulfato de estreptomicina, em manipueira incubada em condições ambientais, em três épocas (março, julho e outubro de 2000). Foram utilizados um meio de cultura semi-seletivo para o isolamento de *X. axonopodis* pv. *manihotis* e a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) ou de amplificação biológica (BIO-PCR). Foram determinados o pH e a acidez total da manipueira durante o período de incubação estudado. O isolado sobreviveu por um período inferior a 24 horas, nas três épocas do ano. A técnica de PCR ou BIO-PCR não foi eficaz em monitorar a sobrevivência do isolado em manipueira, pois apresentou resultados contraditórios e não confiáveis. Observou-se queda do pH e aumento da acidez total da manipueira incubada nas condições estudadas, que pode explicar o comportamento da sobrevivência de *Xam* em manipueira.

Termos para indexação: bactéria, incubação, pH, acidez, resíduo.

### Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in “manipueira” under environmental conditions

Abstract – The objective of this work was to evaluate the survival of a *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) strain, resistant to streptomycin sulfate, in “manipueira” (cassava residue) incubated under environmental conditions, in three periods of the year (March, July and October 2000). A semi-selective culture medium and the polymerase chain reaction (PCR) or biological amplification (BIO-PCR) methods were used. The pH and the total acidity of the “manipueira” were determined during the incubation period. The strain survived less than 24 hours in the three periods of the year. The PCR or BIO-PCR method was not effective in monitoring the strain survival in “manipueira”, as it showed contradictory and unreliable results. An increase in total acidity and a decrease in pH of the “manipueira” were observed, explaining the survival behavior of *Xam* strain.

Index terms: bacteria, incubation, pH, acidity, residues.

### Introdução

A mandioca é uma cultura de elevado interesse econômico mundial, por sua ampla utilização na agropecuária, grande adaptação a condições edafoclimáticas, e pela produção de fécula por unidade de área; além disso, tem um importante papel

na subsistência humana (Conceição, 1987). Historicamente, o Brasil é um dos maiores produtores de mandioca do mundo, com um dos melhores rendimentos por unidade de área (Reis, 1987).

Em determinadas condições ambientais e dependendo da suscetibilidade da variedade ou cultivar, algumas doenças podem reduzir drasticamente a produção e afetar a qualidade das raízes, que comprometem seu processamento. Entre elas, destaca-se a bacteriose ou murcha-bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Este patógeno coloniza vascularmente as plantas, e pode atingir as raízes, causando escurecimento de seus vasos condutores. Os prejuízos causados dependem da variedade utilizada, e podem variar de 50 a 100% nas variedades suscetíveis, e de 5 a 7%, nas resistentes, em condições ambientais favoráveis (Lozano

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 11 de dezembro de 2001.

Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada à Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA), da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo.

<sup>(2)</sup> Unesp, FCA, Dep. de Produção Vegetal, Caixa Postal 237, CEP 18603-970 Botucatu, SP. E-mail: theodorogf@uol.com.br

<sup>(3)</sup> Unesp, FCA, Dep. de Produção Vegetal. Bolsista do CNPq. E-mail: maringoni@fca.unesp.br

& Booth, 1974; Daniel & Boher, 1978; Dedal et al., 1980; Elango & Lozano, 1981; Daniel & Boher, 1982; Lozano, 1986).

A sobrevivência de *Xam* é relativamente curta em restos de cultura incorporados ao solo, em partes vegetais infectadas, e quando é diretamente infestada no solo, sendo, respectivamente, de 21, 90 e 11 dias. Neste período pode ocorrer disseminação e, conseqüentemente, infecção secundária em lavouras de mandioca (Cherian & Mathew, 1983). Em condições controladas, Ikotun (1982) constatou a sobrevivência desta bactéria por 28 dias, em solo não estéril, e, por 35 dias, em solo esterilizado, e a sua longevidade decresceu de acordo com o aumento da acidez destes solos.

O processamento de raízes da mandioca para produção de farinha ou fécula gera grande quantidade de casca, água residual ou manipueira, e farelo ou massa (Takahashi, 1987). Para cada tonelada de raiz de mandioca processada são gerados cerca de 250 L de manipueira, destinados, geralmente, a tanques de decantação (Fioretto, 1987).

A manipueira apresenta características químicas e orgânicas que possibilitam sua ampla utilização na agricultura. Vieites & Brinholi (1994) observaram, até 15 dias após a aplicação de manipueira no solo cultivado com mandioca, eficácia no controle de plantas daninhas, principalmente do carrapicho (*Cenchrus echinatus* L.), do picão-preto (*Bidens pilosa* L.), do caruru (*Amaranthus lividus* L.) e da trapoeraba (*Commelina virginica* L.).

A aplicação de manipueira, via irrigação, em lavouras de mandioca, proporcionou aumento no teor de matéria orgânica, P e K no solo, e no controle de plantas daninhas (Fioretto, 1985). Além da aplicação da manipueira em lavouras de mandioca, a sua aplicação pode também ser feita por fertirrigação em lavouras de algodão e milho, com algumas restrições (Fioretto, 1987). A manipueira pode ser eficaz como nematicida, quando aplicada em solos infestados de nematóides, principalmente os do gênero *Meloidogyne* (Ponte et al., 1987; Franco et al., 1990; Ponte, 1992).

Entretanto, é desconhecida a capacidade de sobrevivência de *Xam* em manipueira, e suas implicações na disseminação desse patógeno em campos de produção de mandioca, no solo, ou como epífita em ervas daninhas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de um isolado de *Xam*, resistente ao sulfato de estreptomicina, em manipueira incubada em condições ambientais.

### Material e Métodos

Amostras de manipueira infestadas ou não com o isolado mutante patogênico MAN 2763-D, de *Xam*, foram mantidas à temperatura ambiente, em condições de telado, em três épocas do ano (março, julho e outubro de 2000), em face das diferentes condições de temperatura. Avaliou-se a sobrevivência desta bactéria mediante técnicas de isolamento em meio de cultura semi-seletivo e por meio da técnica de polimerase em cadeia (PCR) ou da amplificação biológica (BIO-PCR), realizados separadamente em três experimentos.

A sobrevivência da bactéria foi monitorada pelo seu isolamento em meio de cultura semi-seletivo. Em cada experimento, foram utilizadas quatro repetições e cada uma delas foi representada por uma garrafa de plástico de 2 L de capacidade, contendo 900 mL de manipueira e 100 mL de suspensão bacteriana ajustada a  $10^9$  ufc/mL. No tratamento controle, também foram empregadas quatro repetições, e cada repetição foi representada por uma garrafa de plástico contendo 900 mL de manipueira e 100 mL de água destilada. A manipueira permaneceu incubada nas condições de telado.

No ensaio onde foi analisada a sobrevivência de *Xam* na manipueira incubada na primeira época (março); realizaram-se amostragens e repicagens em meio de cultura aos 0, 1, 2, 3 e 4 dias após a infestação. Nos ensaios referentes à segunda (julho) e à terceira (outubro) épocas do ano, as amostragens e repicagens em meio de cultura ocorreram aos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14 e 20 dias após a infestação da manipueira.

Em todos os ensaios, foi coletada uma amostra composta de 80 mL de manipueira de cada uma das repetições, totalizando 320 mL. Uma alíquota dessa amostra composta foi diluída em série, em solução salina esterilizada (NaCl a 0,8%), para se obterem as diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . Alíquotas de 100  $\mu$ L das diluições foram repicadas para o meio de cultura semi-seletivo XCP1 modificado, sem KBr (peptona: 10,0 g,  $\text{CaCl}_2$ : 0,25 g, amido solúvel: 10,0 g, ágar: 15 g, solução cristal violeta a 1%: 0,15 mL, Tween 80: 10 mL, água destilada q.s.p.: 1.000 mL, acrescidos, após a autoclavagem, de sulfato de estreptomicina: 500  $\mu$ g/mL, lincomicina: 0,0012 g/L, cicloheximide: 250  $\mu$ g/mL), adaptado, conforme Theodoro (2000).

Foram empregadas cinco placas de Petri em cada diluição, e após sua incubação por 96 horas, a 28°C, realizou-

se a contagem das colônias típicas de *Xam* desenvolvidas nas diluições pertinentes, e foram comparadas com o isolado MAN 2763-D.

No ensaio onde foi analisada a sobrevivência de *Xam* na manipueira incubada em condição ambiente, na primeira época do ano (março/2000) realizou-se a PCR de amostras retiradas diretamente da manipueira infestada ou não, no momento da repicagem para meio de cultura, onde foram coletadas alíquotas de 1,5 mL em tubo eppendorf. Essas amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 g, com a finalidade de se obter o sedimento de bactérias presentes e, posteriormente, realizar os procedimentos de extração do DNA.

Nos demais ensaios, foram utilizadas placas de Petri contendo crescimento bacteriano ou não, no momento da avaliação das colônias de *Xam*, para a detecção desta bactéria pela técnica da BIO-PCR. Adicionaram-se 10 mL de água destilada esterilizada na superfície do meio de cultura, visando obter suspensões de colônias bacterianas, que foram homogeneizadas com o auxílio de uma alça-de-Drigalski. Transferiu-se 1,5 mL dessas suspensões para tubo eppendorf. As suspensões bacterianas foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 g, para a obtenção do sedimento de bactérias.

A extração do DNA genômico de *Xam* e de outros microrganismos encontrados na manipueira foi realizada empregando-se DNazol Reagent (Life Technologies do Brasil, cat# 10503-027). Em seguida, realizou-se a reação de polimerase em cadeia (PCR), conforme Verdier et al. (1998).

As reações de PCR foram feitas empregando-se o "kit Ready to Go" (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), constituídas de uma cápsula do "kit Ready to Go"; 30 ng do "primer" XV (5' - TTC-GGC-AAC-GGC-AGT-GAC-CAC-C - 3'); 30 ng do "primer" XK (5' - TCA-ATC-GGA-GAT-TAC-CTG-AGC-G - 3'); 1 µL de DNA extraído das amostras, e água deionizada esterilizada q.s.p. 20 µL.

Em termociclador, o primeiro passo da reação de PCR foi constituído pela desnaturação inicial do DNA, empregando-se a temperatura de 95°C por 5 minutos. Foram empregados 30 ciclos, obedecendo a seguinte seqüência de temperatura: 95°C por 30 segundos; 61°C por 30 segundos, e 72°C por 1,5 minuto (desnaturação, anelamento e extensão), e uma extensão final de 72°C por cinco minutos.

Foram acrescentados 6 µL de tampão de carregamento (sacarose: 40%; azul de bromofenol: 0,25%; brometo de etídeo: 1%) aos 20 µL do produto da reação de PCR, aplicados em cada orifício do gel de agarose, constituído de 1,0 g de agarose, 100 mL de TBE 1 X (10,8 g de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 40 mL de EDTA a 0,5 M, pH 8,0;

água deionizada q.s.p. 1.000 mL) e 5 µL de brometo de etídeo.

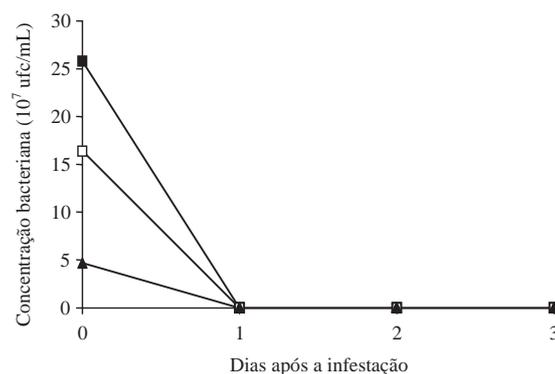
Aplicou-se, em um dos orifícios do gel, uma reação de PCR em que se empregou água deionizada e esterilizada ao invés de DNA, representando o controle negativo, ao passo que o controle positivo foi representado pela reação de PCR com o DNA extraído de *Xam*. Empregaram-se 10 µL do marcador molecular Ladder 1 kb a 50 ng/µL, em alguns dos orifícios, para indicar o tamanho da banda de DNA amplificada.

O gel foi colocado em uma cuba de eletroforese, contendo tampão TBE 1 X, e submetido a 120 V, por 30 minutos. Posteriormente, as bandas formadas foram visualizadas em luz ultra-violeta e fotografadas.

Com a finalidade de compreender as alterações químicas que ocorreram na manipueira com o decorrer de sua incubação e a possível influência destas alterações na sobrevivência de *Xam*, foram realizadas análises de pH e acidez total da manipueira. Na incubação da primeira época do ano, realizaram-se as análises no 1º, 2º e 3º dia de incubação da manipueira, e, nas demais épocas do ano, aos 0, 1, 2, 7 e 20 dias. O método empregado foi o descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

## Resultados e Discussão

Foi possível isolar *Xam* no meio de cultura semi-seletivo da manipueira infestada apenas no momento de instalação dos ensaios (0 dia após a infestação). Após 24 horas de incubação da manipueira, não houve a recuperação dessa bactéria no meio de cultura semi-seletivo (Figura 1).



**Figura 1.** Sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em manipueira sob condições ambientais, em três épocas do ano (março: ■; junho: □; outubro: ▲ de 2000).

Não foi observado crescimento de colônias bacterianas com aspectos culturais semelhantes a *Xam* das amostras de manipueira não-infestada, nas três épocas. Provavelmente, isto ocorreu por causa da presença de sulfato de estreptomicina (500 µg/mL) no meio de cultura semi-seletivo, que inibiu o crescimento de bactérias sensíveis a esse antibiótico, permitindo apenas o desenvolvimento das bactérias insensíveis ou resistentes a esse produto.

A não recuperação de células viáveis de *Xam* após a incubação da manipueira infestada por 24 horas, em todas as condições de incubação, deve-se aos processos naturais fermentativos desse resíduo, conforme Leonel & Cereda (1995a), que condicionam a queda de pH, e ao aumento da acidez total (Leonel & Cereda, 1995b). Essas alterações de pH e de acidez total foram observadas na manipueira infestada ou não com *Xam*, incubadas nas diferentes condições, que podem explicar a não sobrevivência de *Xam* nessas condições (Figura 2).

Geralmente, a faixa ótima de pH para o crescimento de bactérias está entre 6,5-7,5 (Pelczar et al., 1980). Malavolta Júnior et al. (1987) constataram que *X. axonopodis* pv. *citri* não foi capaz de sobreviver em sucos concentrados de laranja (pH 3,30), limão (pH 1,78) e tangerina (pH 3,36), incubados em diferentes condições de temperatura (-18°C, 4°C e 27°C). Atribuiu-se este fato ao baixo pH do meio e ao tempo de exposição a suas condições, independentemente da temperatura de incubação. As observações desses autores poderiam explicar o comportamento da sobrevivência do isolado de *X. axonopodis* pv. *manihotis* em manipueira nos diferentes ensaios do presente trabalho.

Conforme Goto (1990), o pH dos solos influi diretamente ou indiretamente na sobrevivência e multiplicação de bactérias fitopatogênicas. Em relação à sobrevivência de *X. campestris* pv. *campestris* em solos, Santirajan et al. (1986) verificaram que o pH ótimo para o desenvolvimento desta bactéria foi o próximo da neutralidade. Sivaswamy & Mahadevan (1986) observaram que a faixa de pH ideal para o desenvolvimento de *X. oryzae* pv. *oryzae* em solo foi de 6,0 a 9,0. Murty & Devadath (1982), também constataram a importância do pH do meio para o desenvolvimento de *X. oryzae* pv. *oryzae*.

A ação antagonista ou competitiva de microrganismos fermentativos sobre *Xam* pode interferir consideravelmente no seu desenvolvimento mediante a produção de compostos químicos prejudiciais à bactéria, ou até mesmo competindo por nutrientes e sais minerais existentes na manipueira. Habte & Alexander (1975) verificaram que a sobrevivência no solo, de mutantes de *X. campestris* pv. *campestris* resistentes a estreptomicina, foi drasticamente reduzida pela ação predatória de protozoários existentes no solo coletado em condições naturais. Este fato não foi observado quando se empregou solo esterilizado. Mas pôde-se constatar declínio na sobrevivência desta bactéria após uma semana da infestação do substrato. Nas placas onde foi realizada a semeadura da manipueira concentrada, pôde ser observado uma vasta flora microbiana, com a presença de bactérias saprófitas, e que poderia estar competindo por nichos de sobrevivência com *Xam* na manipueira infestada.

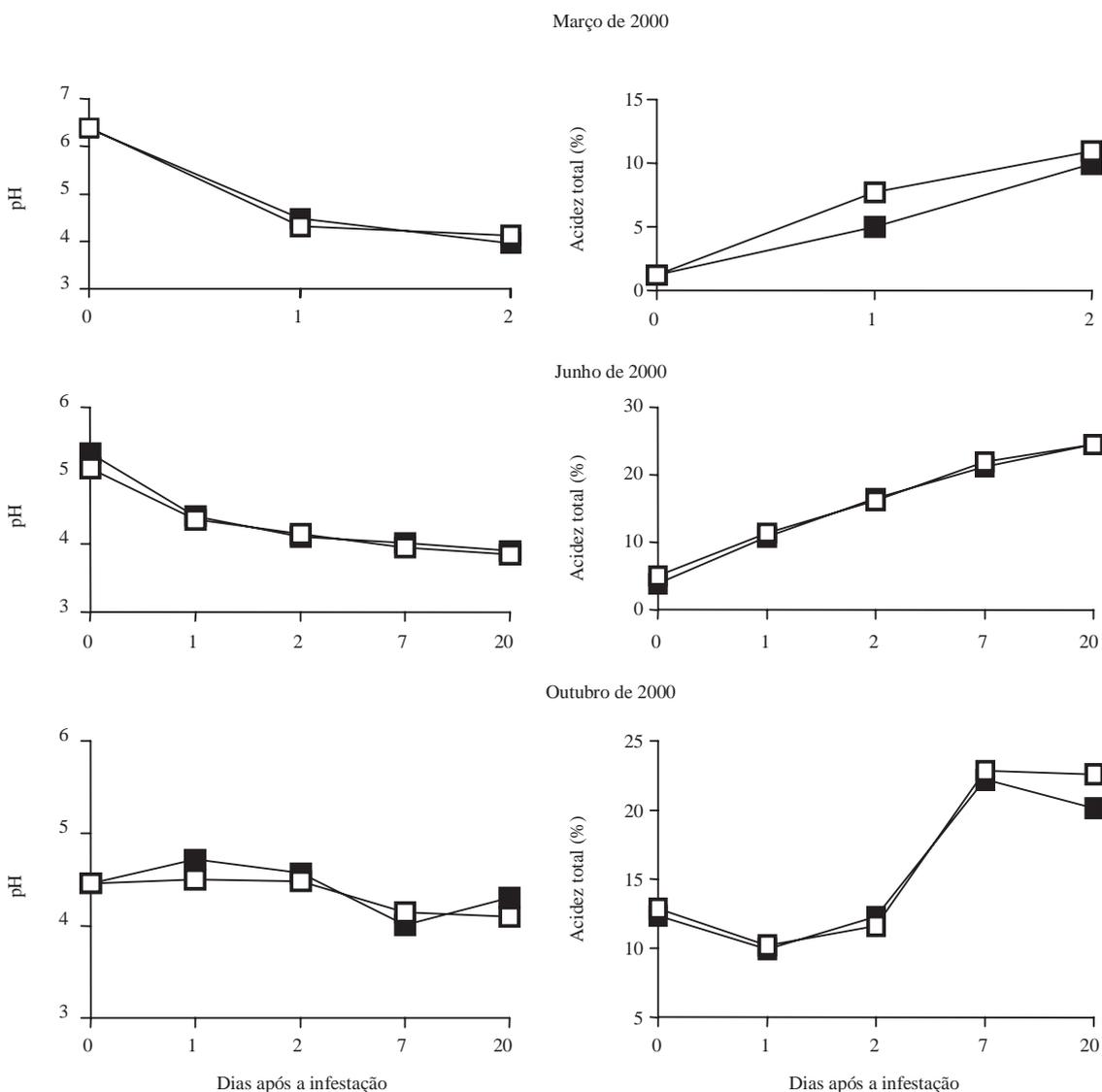
Em relação à técnica de PCR ou de BIO-PCR visando à amplificação de fragmentos de DNA (900 pb) do genoma de *Xam*, através do uso de “primers” específicos, os resultados não se apresentaram confiáveis. Observou-se a amplificação de DNA de todas as amostras de manipueira infestadas ou não com *Xam*, nos diferentes períodos que as amostras de manipueira permaneceram incubadas (Figuras 3, 4 e 5).

A amplificação de fragmentos de DNA de *Xam* nas amostras analisadas no ensaio conduzido na primeira época do ano (Figura 3), quando se empregou a técnica de PCR, tanto de manipueira infestada como de não infestada, foi a presença de DNA extraído de bactérias procedentes da colonização natural das raízes de mandioca. Esperava-se que houvesse a amplificação de DNA apenas nas amostras de manipueira que foram infestadas com o isolado de *Xam*, resistente ao sulfato de estreptomicina. Este resultado pode ser explicado pela inespecificidade dos “primers” empregados, que amplificaram o fragmento de DNA de *Xam*, independentemente de o isolado ser resistente ou não ao sulfato de estreptomicina, e também de as células bacterianas estarem viáveis ou não. Para sanar o problema de amplificação de DNA procedente de células mortas, Schaad et al. (1995) propuseram o emprego da técnica de

BIO-PCR, em que as amostras a serem analisadas são previamente cultivadas em meio de cultura e extrai-se o DNA das bactérias desenvolvidas na superfície desse meio.

Esperava-se que nas amostras de maniveira incubadas em condições ambientais, na segunda e na terceira época do ano (Figuras 4 e 5), houvesse a amplificação do DNA de *Xam* apenas das amostras

onde foram constatadas células bacterianas viáveis que desenvolveram colônias na superfície do meio de cultura semi-seletivo, pois nesses casos foi empregada a técnica de BIO-PCR. Entretanto, os resultados evidenciaram a amplificação de fragmentos de DNA em todas as amostras analisadas, independentemente do crescimento de colônias bacterianas na superfície do meio de cultura nos diferentes perío-



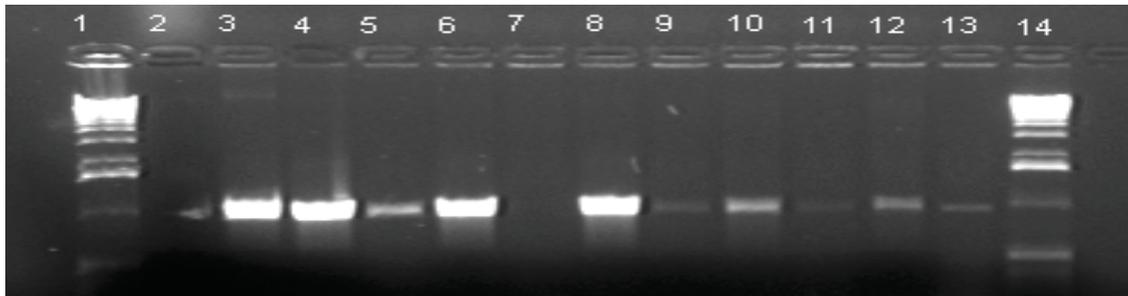
**Figura 2.** Variação do pH e da acidez total de maniveira infestada (■) ou não (□) com um isolado de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, resistente ao sulfato de estreptomicina, sob condições ambientais, em três épocas do ano.

dos de amostragem, tanto de manipueira infestada como de não infestada com o isolado de *Xam*, resistente ao sulfato de estreptomicina.

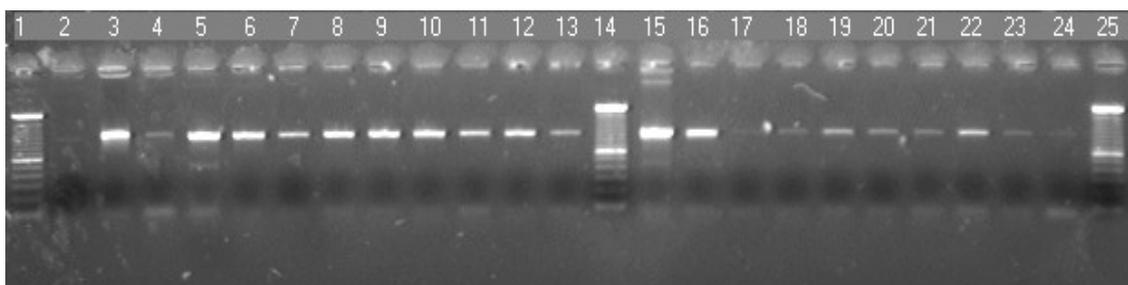
Acredita-se que, mesmo empregando-se a técnica de BIO-PCR, no momento da obtenção da suspensão bacteriana na superfície do meio de cultura há a presença de células bacterianas vivas e mortas ou não cultiváveis, procedentes da manipueira e que fazem parte dessa suspensão, e o DNA extraído da amostra é um somatório de todas as células bacterianas ali presentes.

Alguns estudos têm demonstrado a amplificação de fragmento de DNA procedente de amostras onde não há o cultivo de células bacterianas em meio de

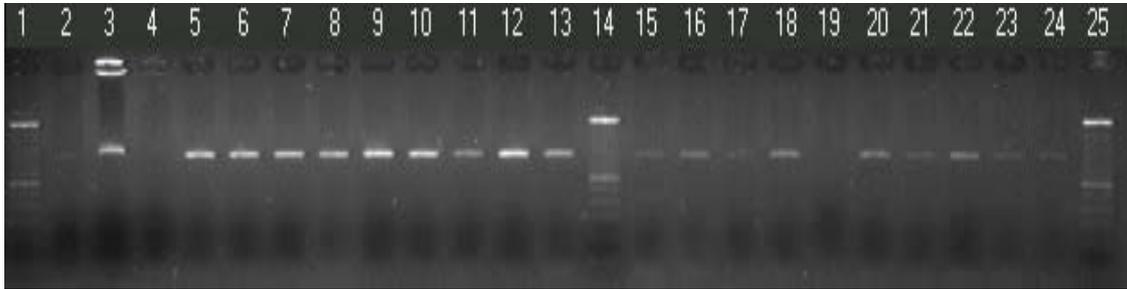
cultura. Deere et al. (1996) estudaram a sobrevivência e a persistência do DNA da bactéria *Aeromonas salmonicida*, patogênica a peixes, em ambiente aquático. Empregaram-se um meio de cultura semi-seletivo a bactéria e “primers” específicos para avaliar a sobrevivência e a existência do DNA da bactéria, e foram retiradas diretamente amostras do meio para este fim. Houve persistência do DNA de *A. salmonicida* por, aproximadamente, sete semanas, após verificar a inexistência de células bacterianas no ambiente. Morgan et al. (1993), analisando a sobrevivência de *A. salmonicida* em água doce, também verificaram a presença de células não cultiváveis em meio de cultura, mas detectáveis através da



**Figura 3.** Produtos da amplificação de fragmentos de DNA (900 pb) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, presentes em manipueira, infestada (MI), ou não (MNI), com um isolado de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, resistente ao sulfato de estreptomicina, sob condições ambientais, na primeira época do ano (março de 2000). 1 e 14: marcador de peso molecular (1 kb); 2: controle negativo; 3: controle positivo; 4: 0 dias após a infestação (DAI)/MI; 5: 0 DAI/MNI; 6: 1 DAI/MI; 7: 1 DAI/MNI; 8: 2 DAI/MI; 9: 2 DAI/MNI; 10: 3 DAI/MI; 11: 3 DAI/MNI; 12: 4 DAI/MI; 13: 4 DAI/MNI.



**Figura 4.** Produtos da amplificação por BIO-PCR de fragmentos de DNA (900 pb) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Manipueira, infestada (MI), ou não (MNI), com um isolado de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, resistente ao sulfato de estreptomicina, sob condições ambientais, na segunda época do ano (junho de 2000). 1, 14 e 25: marcador de peso molecular (1 kb); 2: controle negativo; 3: controle positivo; 4: 0 dias após a infestação (DAI)/MI; 5: 1 DAI/MI; 6: 2 DAI/MI; 7: 3 DAI/MI; 8: 4 DAI/MI; 9: 5 DAI/MI; 10: 7 DAI/MI; 11: 10 DAI/MI; 12: 14 DAI/MI; 13: 20 DAI/MI; 15: 0 DAI/MNI; 16: 1 DAI/MNI; 17: 2 DAI/MNI; 18: 3 DAI/MNI; 19: 4 DAI/MNI; 20: 5 DAI/MNI; 21: 7 DAI/MNI; 22: 10 DAI/MNI; 23: 14 DAI/MNI; 24: 20 DAI/MNI.



**Figura 5.** Produtos da amplificação por BIO-PCR de fragmentos de DNA (900 pb) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Manipueira, infestada (MI), ou não (MNI), com um isolado de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, resistente ao sulfato de estreptomicina, sob condições ambientais, na terceira época do ano (outubro de 2000). 1, 14 e 25: marcador de peso molecular (1 kb); 2: controle negativo; 3: controle positivo; 4: 0 dias após a infestação (DAI/MI); 5: 1 DAI/MI; 6: 2 DAI/MI; 7: 3 DAI/MI; 8: 4 DAI/MI; 9: 5 DAI/MI; 10: 7 DAI/MI; 11: 10 DAI/MI; 12: 14 DAI/MI; 13: 20 DAI/MI; 15: 0 DAI/MNI; 16: 1 DAI/MNI; 17: 2 DAI/MNI; 18: 3 DAI/MNI; 19: 4 DAI/MNI; 20: 5 DAI/MNI; 21: 7 DAI/MNI; 22: 10 DAI/MNI; 23: 14 DAI/MNI; 24: 20 DAI/MNI.

técnica de PCR. Smalla et al. (1993), apesar de observarem a presença de DNA de *Pseudomonas fluorescens* em solo, após cinco meses da infestação, não conseguiram recuperar células cultiváveis em meio, o que demonstra a presença no meio de células bacterianas não cultiváveis e de DNA intacto e passível de detecção. Estas evidências demonstram a necessidade do emprego de um conjunto de métodos convencionais de isolamento com a detecção através de técnicas moleculares. Neste caso, somente a PCR pode gerar resultados não-confiáveis, pois pode detectar o DNA de células mortas.

Quanto à sobrevivência de *Xam* na manipueira e a utilização deste resíduo na agricultura, especialmente na cultura da mandioca, pelos resultados obtidos no presente trabalho, observa-se que a manipueira não serviu como fonte de inóculo de *Xam*, após sofrer o processo de fermentação por um período de 24 horas. Uma forma prática e segura seria esperar pelo menos um período de 72 a 96 horas após a extração da manipueira, para que ela fosse utilizada para os diferentes fins, sem ser considerada um veículo de disseminação de *Xam*. Essa medida deveria ser tomada principalmente em áreas de cultivo que sofreram rotações de culturas, pois a manipueira não serviria como fonte de inóculo inicial de *Xam*, para a reinfestação da área, uma vez que essa bactéria pode sobreviver no solo (Ikotun, 1982) ou epifitamente em ervas daninhas (Dedal et al., 1980).

### Conclusões

1. O isolado de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, resistente ao sulfato de estreptomicina, sobrevive por um período inferior a 24 horas.
2. Há aumento da acidez total e queda do pH da manipueira durante o período de incubação.
3. A técnica do PCR ou BIO-PCR não é eficaz na monitoração da sobrevivência do isolado de *X. axonopodis* pv. *manihotis*, resistente ao sulfato de estreptomicina, em manipueira.

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pela bolsa de estudo concedida.

### Referências

- CHERIAN, M. T.; MATHEW, J. Survival studies on the cassava bacterial blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 36, p. 291-293, 1983.
- CONCEIÇÃO, A. J. **A mandioca**. São Paulo: Nobel, 1987. 382 p.
- DANIEL, J. F.; BOHER, B. Contamination of cassava flowers, fruits and seeds by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 5., 1982. Cali.

- Proceedings...** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1981. p. 614-617.
- DANIEL, J. F.; BOHER, B. Ecology of cassava bacterial blight: epiphytic survival of *Xanthomonas manihotis* on aerial parts of the cassava plant. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. **Proceedings...** Angers: Institut National de la Recherche Agronomique, 1978. p. 763-771.
- DEDAL, O. I.; PALOMAR, M. K.; NAPIERE, C. M. Host range of *Xanthomonas manihotis* Starr. **Annals of Tropical Research**, Baybay, v. 2, p. 149-155, 1980.
- DEERE, D.; PORTER, J.; PICKUP, R. W.; EDWARDS, C. Survival of cells and DNA of *Aeromonas salmonicida* released into aquatic microcosms. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 81, p. 309-318, 1996.
- ELANGO, F.; LOZANO, J. C. Pathogenic variability of *Xanthomonas manihotis*, the causal agent of cassava bacterial blight. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 57-65, 1981.
- FIORETTO, R. A. **Efeito da manipueira aplicada em solo cultivado com mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 1985. 122 f. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- FIORETTO, R. A. Manipueira na fertirrigação: efeito sobre a germinação e produção de algodão (*Gossypium hirsutum* var. *hirsutum*, L.) e milho (*Zea mays*, L.). **Semina**, Londrina, v. 8, n. 1, p. 17-20, 1987.
- FRANCO, A.; PONTE, J. J.; SILVA, R. S.; SANTOS, F. A. M. Dosagem de manipueira para tratamento de solo infestado por *Meloidogyne* II: segundo experimento. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 14, p. 25-32, 1990.
- GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. San Diego: Academic, 1990. 342 p.
- HABTE, M.; ALEXANDER, M. Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil. **Applied Microbiology**, Washington, v. 29, n. 2, p. 159-164, 1975.
- IKOTUN, T. The survival of *Xanthomonas manihotis* (Arthaud-Berther) Starr in the soil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, p. 29-36, 1982.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo, SP). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3. ed. São Paulo, 1985. v. 1.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Biossíntese de ácido cítrico em água residual de processamento de mandioca. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 15, n. 1/2, p. 39-46, 1995a.
- LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Viabilidade de uso da manipueira como substrato de processo biológico. I: Caracterização do substrato armazenado à temperatura ambiente. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 15, n. 1/2, p. 7-14, 1995b.
- LOZANO, J. C. Cassava bacterial blight: a manageable disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 70, p. 1089-1093, 1986.
- LOZANO, J. C.; BOOTH, R. H. Diseases of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Pans**, London, v. 20, p. 30-54, 1974.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; RODRIGUES NETO, J.; CARVALHO, M. V. L. Estudos sobre a sobrevivência da bactéria agente causal do cancro cítrico. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 1, n. 8, p. 125-132, 1987.
- MORGAN, J. A. W.; RODEES, G.; PICKUP, R. W. Survival of nonculturable *Aeromonas salmonicida* in lake water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 874-880, 1993.
- MURTY, V. S. T.; DEVADATH, S. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in different soils. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 35, n. 1, p. 32-38, 1982.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw Hill do Brasil, 1980. v. 1.
- PONTE, J. J. Histórico das pesquisas sobre a utilização da manipueira (extrato líquido das raízes de mandioca) como defensivo agrícola. **Fitopatologia Venezuelana**, Maracay, v. 5, n. 1, p. 2-5, 1992.
- PONTE, J. J.; FRANCO, A.; PONTES, A. E. L. Estudo sobre a utilização da manipueira, como nematicida, em condições de campo. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 11, p. 43-47, 1987.
- REIS, A. J. Aspectos econômicos da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 3-8, 1987.
- SANTIRANJAN, B.; CHATTOPADHYAY, S. B.; BANDYOPADHYAY, S. Survival of *Xanthomonas*

- campestris* pv. *campestris* in soil. **Indian Journal of Mycological Research**, Calcutta, v. 24, n. 2, p. 97-111, 1986.
- SCHAAD, N. W.; CHEONG, S. S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N. J. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 2, p. 243-248, 1995.
- SIVASWAMY, S. N.; MAHADEVAN, A. Effect of stable bleaching powder on growth of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 39, n. 1, p. 32-36, 1986.
- SMALLA, K.; CRESSWELL, N.; MENDONCA-HAGLAR, L. C.; WOLTERS, A.; ELSAS, J. D. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 74, p. 78-85, 1993.
- TAKAHASHI, M. Aproveitamento da manipueira e de resíduos do processamento da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 83-87, 1987.
- THEODORO, G. F. **Sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em manipueira**. 2000. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- VERDIER, V.; MOSQUERA, G.; ASSIGBÉTSÉ, K. Detection of the cassava bacterial blight pathogen, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, by polymerase chain reaction. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, p. 79-83, 1998.
- VIEITES, R. L.; BRINHOLI, O. Efeito da manipueira, em condições de campo, na emergência de brotos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e no controle de plantas daninhas. **Energia na Agricultura**, Energia e Agricultura, v. 9, n. 4, p. 29-33, 1994.