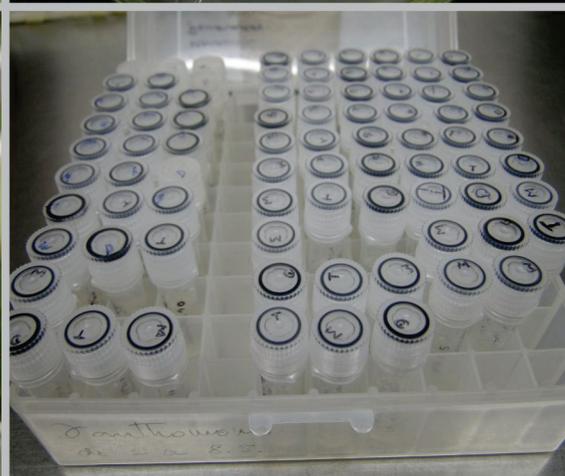
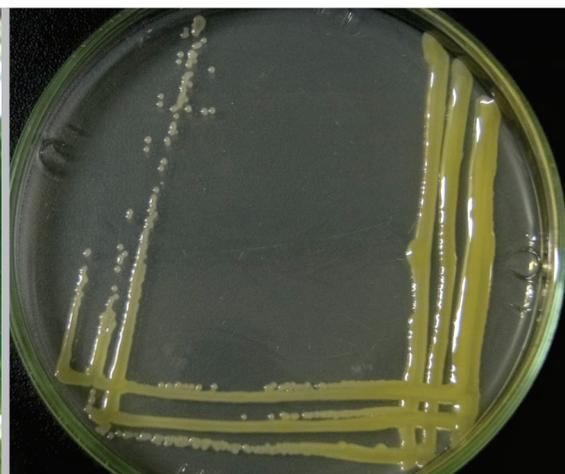


Preservação de Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em Água Destilada Esterilizada



ISSN 1983-0483

Agosto, 2017

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 121

**Preservação de Isolados de
Xanthomonas axonopodis pv.
passiflorae em Água Destilada
Esterilizada**

*Alessandra Keiko Nakasone Ishida
Daniellen Costa Protazio
Luana Cardoso de Oliveira*

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2017

Disponível no endereço eletrônico:

<https://www.embrapa.br/amazonia-oriental/publicacoes>

Embrapa Amazônia Oriental

Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n.

CEP 66095-903 – Belém, PA.

Fone: (91) 3204-1000

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicação

Presidente: *Silvio Brienza Júnior*

Secretário-Executivo: *Moacyr B. Dias-Filho*

Membros: *Antônio Pedro da Silva Souza Filho*

Noemi Vianna Martins Leão

Heloisa Helena da R. Serrufo Morais

Andrea Liliane Pereira da Silva

Narjara de Fátima Galiza da Silva Pastana

Supervisão editorial: *Narjara de Fátima Galiza da Silva Pastana*

Revisão de texto: *Izabel Cristina Drulla Brandão*

Normalização bibliográfica: *Luiza de Marillac P. Braga Gonçalves*

Tratamento de imagens: *Vitor Trindade Lôbo*

Editoração eletrônica: *Euclides Pereira dos Santos Filho*

Foto da capa: *Alessandra Keiko Nakasone Ishida*

1ª edição

Publicação digitalizada (2017)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Amazônia Oriental

Ishida, Alessandra Keiko Nakasone.

Preservação de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em água destilada esterilizada / por Alessandra Keiko Nakasone Ishida, Daniellen Costa Protazio, Luana Cardoso de Oliveira. — Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2017.

18 p.; 15 cm x 21 cm. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0483, 121).

1. Maracujá-amarelo. 2. Mancha-bacteriana. 3. Doença de planta. 4. *Passiflora edulis*. I. Protazio, Daniellen Costa. II. Oliveira, Luana Cardoso de. III. Embrapa Amazônia Oriental. IV. Título. V. Série.

CDD (21. ed.) 634.425923

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Material e métodos	9
Resultados e discussão	11
Conclusões	15
Agradecimentos	15
Referências	16

Preservação de Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em Água Destilada Esterilizada

*Alessandra Keiko Nakasone Ishida*¹

*Daniellen Costa Protazio*²

*Luana Cardoso de Oliveira*³

Resumo

A mancha-bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, é uma doença que tem comprometido a cultura do maracujá-amarelo no Brasil, principalmente devido ao seu difícil controle. Em vista disso, o conhecimento da diversidade genética do patógeno e da epidemiologia da doença torna-se importante para a obtenção de mecanismos de manejo. A preservação de bactérias fitopatogênicas é essencial para dar continuidade, a qualquer momento, aos estudos sobre o patógeno. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito da preservação em água destilada esterilizada durante 3, 4 e 5 anos sobre a patogenicidade de dois isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Foram utilizados dois isolados com diferentes níveis de virulência (PA 4-3 e PA 4-7), provenientes do município de Castanhal, PA. Folhas de plantas de maracujazeiro foram inoculadas com suspensão bacteriana de cada isolado, por meio do método de corte com tesoura. O tempo de armazenamento não afetou

¹Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

²Graduanda de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA.

³Química-industrial, mestre em Química, doutoranda na Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

a viabilidade e a patogenicidade dos isolados PA 4-3 e PA 4-7. No entanto, os processos de repique, inoculação e isolamento para manter a disponibilidade do patógeno podem reduzir a virulência dos isolados.

Termos para indexação: mancha-bacteriana, maracujazeiro, *Passiflora*, virulência

Preservation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* Isolates in Sterilized Distilled Water

Abstract

The bacterial spot, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, is a disease that has compromised the culture of yellow passion fruit in Brazil, especially due to its difficult control. In view of this, it becomes important to know the genetic diversity of the pathogen and the epidemiology of the disease in order to obtain management mechanisms. The preservation of phytopathogenic bacteria is essential to continue, at any moment, the studies on this pathogen. Thus, the present work aimed at evaluating the effect of preservation in sterilized distilled water during 3, 4 and 5 years over the pathogenicity of two *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* isolates. We used two isolates with different levels of aggressiveness (PA 4-3 and PA 4-7), originated from the municipality of Castanhal, PA, Brazil. Passion fruit plants were inoculated with bacterial suspension of each isolate by means of the cutting method. Storage time did not affect the feasibility and pathogenicity of the isolates PA 4-3 and PA 4-7. However, the cutting, inoculation and isolation processes used to maintain the availability of the pathogen can reduce the virulence of the isolates.

Index terms: bacterial spot, passion fruit, *Passiflora*, virulence

Introdução

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) é a espécie de maracujá mais cultivada no Brasil. O País é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá e, em 2015, produziu cerca de 694.539 t de frutos. O Estado do Pará é o quinto maior produtor brasileiro dessa fruta e, no mesmo ano, produziu 33.154 t (PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL, 2015). No entanto, apesar da sua importância econômica, existem diversos problemas fitossanitários que comprometem a produtividade do maracujazeiro no Brasil (MELETTI, 2011).

A mancha-bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Gonçalves e Rosato, é uma das principais doenças do maracujazeiro e se apresenta como um fator limitante para a cultura em virtude da forma severa com que ocorre sob condições de clima quente e úmido (BRANCAGLIONE et al., 2009). Como sintomas nas folhas, o patógeno induz pequenas lesões encharcadas e translúcidas, as quais necrosam, assumindo tonalidade marrom-avermelhada, podendo também formar um halo clorótico ao redor da mancha (VIANA et al., 2003). Com o desenvolvimento da doença, ocorre seca das folhas e, posteriormente, desfolha (HALDFELD-VIEIRA; NECHET, 2006). Nos frutos, as manchas são grandes, inicialmente esverdeadas e oleosas, que depois se tornam pardacentas. São manchas superficiais, entretanto, em condições favoráveis, o patógeno pode penetrar a polpa, fermentando-a, e alcançar as sementes (VIANA et al., 2003).

O estudo da diversidade genética do patógeno e da epidemiologia da doença é essencial para a obtenção de subsídios para seu controle (ARAÚJO et al., 2008). Assim, a preservação de bactérias fitopatogênicas em coleções de cultura representa grande importância para a pesquisa científica e sua utilização a qualquer momento. Um bom método de preservação de patógenos deve ser simples, de baixo custo e elevado grau de eficiência. Além disso, o organismo preservado

deve ser mantido vivo por um período extenso de tempo por um método que não permita ou minimize possíveis mutações, ou que afete a patogenicidade, virulência e características da cultura (ROMEIRO, 2001).

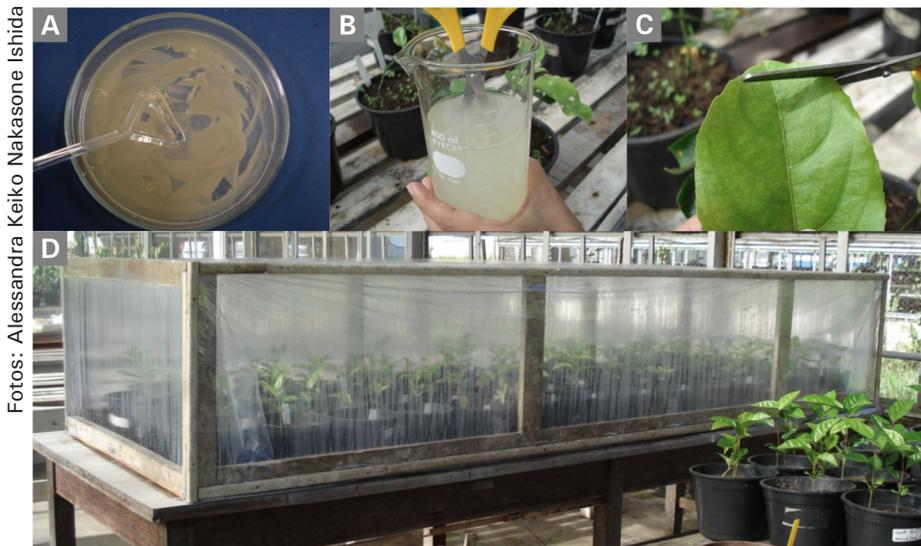
A preservação em água destilada esterilizada (método de Castellani) consiste no armazenamento de microrganismos em água estéril ou solução salina, sendo adequada na preservação de microrganismos sensíveis a baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas (COSTA; FERREIRA, 1991; NEUFELD; OLIVEIRA, 2008; PIMENTEL; FIGUEIREDO, 1989). Apesar da simplicidade, a preservação de bactérias em água não tem sido amplamente adotada em laboratórios de microbiologia, possivelmente devido à falta de dados experimentais de estudos de vários anos que validem a confiabilidade deste método (LIAO; SHOLLENBERGER, 2003). Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da preservação em água destilada esterilizada durante 3, 4 e 5 anos na patogenicidade de dois isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*.

Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação da Embrapa Amazônia Oriental. Avaliaram-se os isolados PA 4-3 e PA 4-7, com diferentes níveis de virulência, sendo que o primeiro apresentava maior virulência (OLIVEIRA et al., 2011). Os dois isolados, provenientes do município de Castanhal, PA, foram coletados em 22 de abril de 2008, identificados e preservados em 21 de maio de 2008.

Para a preservação, os isolados foram cultivados em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 48 horas a 28 °C. Uma alíquota do crescimento bacteriano foi transferida para tubos de criogenia de 2,0 mL contendo 1,0 mL de água destilada esterilizada. No ano de 2009, os dois isolados foram recuperados, em meio de cultura 523, dos tubos preservados em 2008.

Para a inoculação, foram utilizadas plantas de maracujazeiro da cultivar Gigante Amarelo com dois pares de folhas verdadeiras. A suspensão bacteriana de cada isolado foi preparada raspando as colônias com alças de Drigalski em água destilada esterilizada. Após uniformização em agitador magnético, foi medida a absorbância da suspensão bacteriana em espectrofotômetro UV-visível Spectrum Modelo SP-2000UV a 600 nm e ajustada para 0,3 unidades de absorbância.mL⁻¹ (concentração de 10⁸ unidades formadoras de colônias.mL⁻¹). Foram inoculadas quatro folhas por planta, por meio do método de corte com tesoura previamente imersa na suspensão bacteriana. As plantas foram mantidas por 24 horas em câmara úmida, constituída de uma armação retangular de madeira coberta com plástico transparente (Figura 1). Após o aparecimento dos sintomas, os isolados foram reisolados e preservados. Em 2010, os isolados foram repicados em meio de cultura 523 dos tubos preservados em 2009, inoculados por meio do método de corte, reisolados e preservados.



Fotos: Alessandra Keiko Nakasone Ishida

Figura 1. Inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* pelo método do corte. (A) preparo da suspensão bacteriana; (B, C) inoculação das folhas; (D) câmara úmida das plantas.

Em 2013, foram recuperados, em meio de cultura 523, os dois isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* preservados no ano de 2008 (5 anos), de 2009 (4 anos) e de 2010 (3 anos). Após 48 horas de crescimento a 28 °C, as características das colônias foram avaliadas visualmente. As inoculações em plantas de maracujazeiro foram realizadas por meio do método de corte, como descrito anteriormente. O ensaio foi montado em esquema fatorial 2 x 3, sendo: 2 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (PA 4-3 e PA 4-7) e 3 períodos de preservação (3, 4 e 5 anos). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições. A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 e 18 dias após a inoculação, através da escala elaborada por Miranda (2004). Com os valores obtidos, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPD) proposta por Shaner e Finney (1977). Foi realizada análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

A preservação em água destilada esterilizada por diferentes períodos de armazenamento não interferiu na viabilidade e nas características da colônia dos isolados PA 4-3 e PA 4-7 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em meio de cultura.

Iacobellis e DeVay (1986), ao avaliarem a viabilidade de 75 isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e 30 isolados de *Agrobacterium tumefaciens* preservados em água destilada esterilizada, observaram que, por 24 anos e 20 anos respectivamente, 92% dos isolados de *P. syringae* pv. *syringae* e 90% dos isolados de *A. tumefaciens* ainda estavam vivos.

Liao e Shollenberger (2003), por sua vez, ao investigarem a viabilidade de isolados de *P. viridiflava*, *Erwinia* spp. e *X. campestris* após 12, 14 e 8 anos, respectivamente, armazenados em água destilada

esterilizada, verificaram que todos os isolados permaneceram viáveis e com capacidade de serem recuperados por plaqueamento da cultura preservada em meio de cultura sólido.

Para *X. campestris* pv. *viticola*, Nascimento et al. (2005) verificaram que o método de preservação em água destilada esterilizada propiciou a viabilidade de 100% até os 11 meses; no entanto, aos 12 meses, houve uma redução para 80%. Araújo et al. (2008) analisaram a viabilidade e virulência de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e constataram que, no decorrer das avaliações, os isolados perderam a viabilidade, sendo que os preservados em água esterilizada perderam totalmente a viabilidade aos 180 dias. Já Rodrigues et al. (2009), estudando a sobrevivência de 21 linhagens de *Ralstonia solanacearum* em água destilada e esterilizada, verificaram que 50% dos isolados não perderam a viabilidade.

No ensaio em condições de casa de vegetação, a preservação em água destilada não interferiu na patogenicidade dos isolados (Figura 2). No entanto, plantas inoculadas com o isolado PA 4-3 preservado no período de 5 anos apresentaram maior severidade da doença, enquanto entre os períodos de 3 e 4 anos não houve diferença significativa (Tabela 1). Isto pode ser atribuído ao fato de o isolado PA 4-3 preservado no período de 5 anos ter sofrido menos processos de repique. Para o isolado PA 4-7 a severidade da doença não diferiu entre os períodos de armazenamento. Observou-se que, no período de 5 anos de armazenamento, ambos os isolados apresentaram maior virulência, sendo que, no período de 4 anos, a virulência diminuiu em relação ao período de 5 anos e, no período de 3 anos, a virulência diminuiu em relação ao período de 4 anos. Isto demonstra a importância de preservar bactérias fitopatogênicas em grande quantidade, pois, dessa forma, evita-se a necessidade de repetir os processos de repique, inoculação e isolamento para manter sempre disponível o patógeno, pois tais repetições podem diminuir sua virulência.

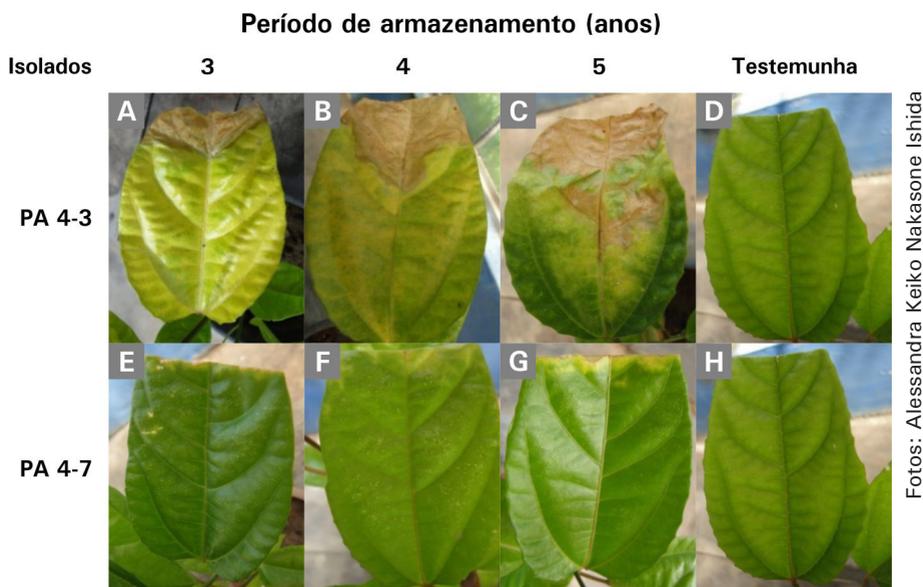


Figura 2. Efeito da preservação em água destilada esterilizada durante 3 anos (A e E), 4 anos (B e F) e 5 anos (C e G) na patogenicidade dos isolados PA 4-3 (A, B e C) e PA 4-7 (E, F e G) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujazeiro (Testemunha D, H).

Tabela 1. Efeito da preservação em água destilada esterilizada dos isolados PA 4-3 e PA 4-7 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em diferentes tempos de armazenamento na área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha-bacteriana (AACPD) do maracujazeiro.

Tempo de armazenamento (anos)	Isolados			
	PA 4-3		PA 4-7	
3	231,79 ⁽¹⁾	aA ⁽²⁾	31,90	aB
4	344,78	aA	61,06	aB
5	427,05	bA	67,34	aB

CV = 27,81%

⁽¹⁾ AACPD = Área abaixo da curva de progresso da doença.

⁽²⁾ Médias seguidas por letras diferentes (minúsculas na coluna e maiúsculas na linha) diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No decorrer das avaliações, houve um crescimento da severidade da mancha-bacteriana de ambos os isolados (Figura 3). Para o isolado PA 4-3, a severidade mostrou-se em crescimento contínuo em todos os tempos de armazenamento. Para o isolado PA 4-7, entretanto, o crescimento da severidade da doença foi lento e descontínuo, apresentando em alguns dias de avaliação o mesmo valor de severidade que a avaliação anterior.

Avaliando-se o efeito da preservação sobre a severidade da doença entre os isolados, observou-se que, em todos os tempos de armazenamento, o isolado PA 4-3 apresentou maior virulência que o isolado PA 4-7. Dentre 29 isolados de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* de diferentes regiões do Estado do Pará, os isolados PA 4-3 e PA 4-7, avaliados por Oliveira et al. (2011), apresentaram maior e menor virulência, respectivamente, demonstrando que a preservação em água destilada manteve as características dos isolados preservadas.

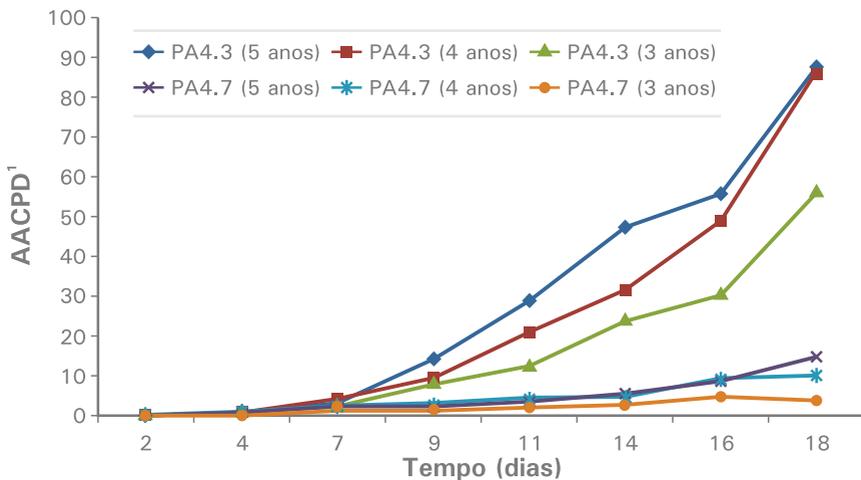


Figura 3. Efeito da preservação em água destilada esterilizada dos isolados PA 4-3 e PA 4-7 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* em diferentes tempos de armazenamento na área abaixo da curva de progresso da severidade da mancha-bacteriana (AACPD) do maracujazeiro aos dias avaliados após a inoculação.

¹AACPD = Área abaixo da curva de progresso da doença.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a preservação em água destilada esterilizada durante 3, 4 e 5 anos não interferiu na viabilidade e patogenicidade dos isolados PA 4-3 e PA 4-7 de *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Conclui-se também que os processos de repique, inoculação e isolamento para manter a disponibilidade do patógeno podem reduzir a virulência dos isolados.

Agradecimentos

À Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (Fapespa), pelo financiamento do projeto de pesquisa “Resistência induzida e resistência de cultivares no manejo e epidemiologia da mancha-bacteriana do maracujazeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*) no Estado do Pará” (Termo de Outorga Nº 058/2008).

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), pelo financiamento do projeto “Variabilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* e resistência genética no manejo da mancha-bacteriana do maracujazeiro no Estado do Pará” (03.08.06.034.00.00).

A Clenilda Tolentino Bento da Silva, pela colaboração na execução do trabalho.

Referências

- ARAÚJO, D. V. de; MARIANO, R. de L. R.; SILVEIRA, E.B. da; MICHEREFF, S. J. Preservação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 2, p.178-180, 2008.
- BRANCAGLIONE, P.; SAMPAIO, A. C.; FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A. M. de; FUMIS, T. de F. Eficiência de argila silicatada no controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, in vitro e em mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 718-724, 2009.
- COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, v.22, n.3, p.263-268, 1991.
- HALFELD-VIEIRA, B. de A.; NECHET, K. de L. **Mancha-bacteriana do Maracujá: sintomas, danos e medidas de controle**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2006. 4 p. (Embrapa Roraima. Comunicado técnico, 3).
- IACOBELLIS, N. S.; DEVAY, J. E. Long-term storage of plantpathogenic bacteria in sterile distilled water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 2, p.388–389, 1986.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, n. 6, p.969-976, 1970.

LIAO, C. H.; SHOLLENBERGER, L. M. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 1, p.45-50, 2003.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p.83-91, 2011. Número especial.

MIRANDA, J. F. **Reação de variedades de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) a bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae***. 2004. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

NEUFELD, P. M.; OLIVEIRA, P. C. de. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, v. 40, n. 3, p.167-169, 2008.

OLIVEIRA, L. C.; ISHIDA, A. K. N.; DAMASCENO FILHO, A. S.; COSTA, R. C.; SILVA, C. T. B.; PIEDEDE, A. M. Variabilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* no Estado do Pará. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 537, 2011. Suplemento. Edição do XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Bento Gonçalves, ago. 2011.

PIMENTEL, C. P. V.; FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos em meio de cultura. **Biológico**, v. 55, n. 1/2, p. 27-33, 1989.

PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL, Rio de Janeiro, v. 42, p.1-57, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2015_v42_br.pdf> . Acesso em: 22 ago. 2017.

RODRIGUES, L. M. R.; RODRIGUES NETO, J.; MARINGONI, A. C. Preservação de *Ralstonia solanacearum* em água destilada durante 30 anos em ampolas seladas. **Summa Phytopathologica**, v. 35, 2009. Ref. 001. Suplemento, Edição dos Resumos do XXXII Congresso Paulista de Fitopatologia; IV Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos, 2009, São Pedro.

ROMEIRO, R. da S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 279 p.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox Wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

VIANA, F. M. P.; FREIRE, F. das C. O.; CARDOSO, J. E.; VIDAL, J. C. **Principais doenças do maracujazeiro na Região Nordeste e seu controle**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 12 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado técnico, 86).

Embrapa

Amazônia Oriental

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**



CGPE 13817