

# Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em sementes de maracujá

Lucas Couto Duarte<sup>1</sup>, Lara Caroline Borges Moreira Mota<sup>2</sup>, Nilvanira Donizete Tebaldi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mestrando em Agronomia, Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia, Rua Acre 1720, Bloco 2E-119, Campus Umuarama, CEP 38.405-320, Uberlândia, MG, Brasil. <sup>2</sup>Técnica, Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia, Rua Acre 1720, Bloco 2E-119, Campus Umuarama, CEP 38.405-320, Uberlândia, MG, Brasil. <sup>3</sup>Professora Associada do Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia, Rua Acre 1720, Bloco 2E-119, Campus Umuarama, CEP 38.405-320, Uberlândia, MG, Brasil.

Autor para correspondência: Nilvanira Donizete Tebaldi (nilvanira.tebaldi@ufu.br)

Data da submissão: 02/09/2020 Aceito para publicação em: 23/04/2022

10.1590/0100-5405/243122

## RESUMO

Duarte, L.C.; Mota, L.C.B.M.; Tebaldi, N.D. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em sementes de maracujá. *Summa Phytopathologica*, v.48, n.2, p.78-80, 2022.

A mancha óleo ou mancha bacteriana do maracujazeiro causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* é uma das doenças de maior importância da cultura, levando a danos diretos na produção e na qualidade dos frutos. O uso de sementes livres do patógeno é a principal forma de controle da doença, sendo necessário a detecção da bactéria nas sementes para evitar sua introdução em áreas isentas. O objetivo do trabalho foi detectar a presença de *X. campestris* pv. *passiflorae* em sementes de maracujá em meio de cultura. O extrato de sementes inteiras ou quebradas,

desinfestadas ou não, de dois genótipos de maracujá provenientes de Uberlândia, MG foram cultivadas nos meios de cultura, 523 e NAS, sem e com a adição de cicloheximida. Não houve diferença significativa entre os meios de cultura no crescimento bacteriano. Os meios de cultura 523 e NAS, com adição de cicloheximida e o uso de sementes de maracujá quebradas foram eficientes para a detecção de *X. campestris* pv. *passiflorae*, os quais podem ser utilizados em rotina de laboratório para a detecção da bactéria em sementes.

**Palavras-chave:** Mancha bacteriana; mancha óleo; meio de cultura; *Passiflora edulis*

## ABSTRACT

Duarte, L.C.; Mota, L.C.B.M.; Tebaldi, N.D. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* in passion fruit seeds. *Summa Phytopathologica*, v.48, n.2, p.78-80, 2022.

Oil spot or bacterial spot of passion fruit, caused by the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, is one of the most important diseases affecting this crop, leading to direct damage to fruit production and quality. The use of pathogen-free seeds is the major form of disease control, requiring bacterial detection in the seeds to prevent introduction into exempt areas. The objective of the present study was to detect the presence of *X. campestris* pv. *passiflorae* in passion fruit seeds in culture medium. The extract of whole

or broken seeds, disinfected or not, from two passion fruit genotypes from Uberlândia, Minas Gerais State (MG), Brazil, were cultivated in the culture media 523 and NAS without and with the addition of cycloheximide. There was no significant difference between culture media for bacterial growth. Culture media 523 and NAS with the addition of cycloheximide and the use of broken passion fruit seeds were efficient at detecting *X. campestris* pv. *passiflorae*, which can be used in laboratory routine for detection of this bacterium in seeds.

**Keywords:** Bacterial spot; oil spot; culture medium; *Passiflora edulis*.

A mancha bacteriana, mancha óleo ou morte-precoce (13) do maracujazeiro, causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye, ocasiona grande prejuízo à cultura (3), principalmente em condições de temperatura por volta de 30°C e umidade relativa do ar em torno de 80% (13).

A bactéria sobrevive em restos culturais (3), mudas e sementes, podendo ser disseminada e introduzida em novas áreas de cultivo. Como medida de controle recomenda-se o uso de sementes sadias, identificadas a partir de análises laboratoriais.

Diversos meios de cultura já foram descritos para a detecção de bactérias em sementes, como *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão (10), *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja (14), *Pantoea ananatis* em sementes de milho (5) e *Xanthomonas* spp. em sementes de tomate (7). Os meios de cultura apresentam vantagens em relação a técnicas moleculares e imunológicas (9) por serem de fácil execução, por apresentarem especificidade e sensibilidade (12), além de não requerer equipamentos sofisticados. No

entanto, para a detecção de *X. campestris* pv. *passiflorae* em sementes de maracujá ainda não há uma metodologia descrita na literatura.

Diante disso, o objetivo do trabalho foi detectar a presença de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em sementes do maracujá em meios de cultura.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia Vegetal (LABAC), do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em Uberlândia, Minas Gerais.

O isolado UFU A45 de *X. campestris* pv. *passiflorae* pertencente à coleção de trabalho do LABAC foi cultivado em meio de cultura 523 (4), a 28 °C por 48 horas. A suspensão bacteriana foi preparada em água filtrada esterilizada, ajustada em espectrofotômetro para OD<sub>600</sub> = 0,3 (10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), posteriormente diluída em série (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) e 100 µL cultivado sobre os meios de cultura 523 e NAS (8), sem e com adição de 1 mL de cicloheximida (50 mg mL<sup>-1</sup>) por litro de meio de cultura. As placas foram incubadas a 28 °C por 4 dias e em seguida contadas as

colônias bacterianas, calculando-se o número de UFC mL<sup>-1</sup>. O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 2 x 2 (2 meios de cultura, 2 sem/com fungicida), com 3 repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade em software SISVAR (1).

Para a detecção de *X. campestris* pv. *passiflorae* em sementes de maracujá foram avaliadas sementes de dois genótipos de maracujá, um amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e um roxo (*P. edulis*), provenientes de plantas doentes, com sintomas da bacteriose, da estação experimental do ICIAG/UFU, de Uberlândia – MG, ano 2015.

Para a detecção da bactéria nas sementes foram utilizados 7 g (aproximadamente 270 sementes) de sementes maracujá inteiras ou quebradas (com auxílio de um martelo), sem e com desinfestação com hipoclorito de sódio a 3%, por 2 minutos, para cada tratamento. Em seguida as sementes foram colocadas em Erlenmeyers esterilizados, adicionando 14 mL de água filtrada esterilizada e mantidas por 18 h sob refrigeração a 5 °C. Em seguida, o extrato das sementes foi diluído em série (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-2</sup>) e cultivado nos meios de cultura descritos anteriormente, e as placas incubadas a 28 °C por quatro dias. Posteriormente foram quantificadas as unidades formadoras de colônia (UFC mL<sup>-1</sup>). Para o método das sementes quebradas e desinfestadas, as sementes foram previamente desinfestadas e posteriormente quebradas.

As colônias amarelas suspeitas foram repicadas para o meio 523 e realizados os testes, Gram, YDC, Oxidação/Fermentação, reação de hipersensibilidade, asparagina (8) e inoculação no hospedeiro (2).

O experimento foi conduzido em esquema fatorial (2 genótipos x 2 meios de cultura x 2 sem/com desinfestação x 2 sementes inteiras/quebradas x 2 sem/com fungicida) com três repetições. As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo software SISVAR (1).

A partir da suspensão bacteriana de *X. campestris* pv. *passiflorae* não houve diferença significativa no número de colônias, entre os meios de cultura 523 e NAS, sem ou com adição de cicloheximida, onde as médias variaram de 2,1 a 2,5 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. O uso de cicloheximida não interferiu no crescimento bacteriano e as colônias apresentaram coloração amarela e convexa nos meios de cultura (Figura 1A e B), e no meio NAS pode ser observado a formação de um halo claro ao redor da colônia, devido a hidrólise do amido (Figura 1B). Os meios de cultura 523 e NAS foram eficientes para a detecção da bactéria.

Resultados semelhantes foram obtidos por Mehta et al. (6) na detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodão, onde os meios semi-seletivos avaliados não diferiram estatisticamente no número de colônias, em relação ao meio padrão. Assim como, o uso de meio de cultura semi-seletivo foi eficiente para a detecção de *Xanthomonas* spp. em sementes de tomate e apresentou índice de supressividade satisfatório (7).

Para a detecção da bactéria nas sementes de maracujá o uso de sementes quebradas desinfestadas diferiu significativamente dos demais métodos, para os dois genótipos de maracujá, roxo e amarelo (Tabela 1). A bactéria encontra-se localizada no interior das sementes, e quando quebradas, facilita o fluxo bacteriano para a água, permitindo sua detecção.

A adição do fungicida cicloheximida, aos meios de cultura 523 e NAS não inibiu o crescimento da *X. campestris* pv. *passiflorae* nos meios de cultura avaliados (Tabela 2). O método de sementes quebradas e desinfestadas foi o melhor, nos dois meios de cultura avaliados, demonstrando que a desinfestação com hipoclorito de sódio não afetou o crescimento da bactéria. Os meios de cultura 523 e NAS foram eficientes para a detecção da bactéria nas sementes de maracujá.

A bactéria foi detectada nas sementes de maracujá, nos meios 523 e NAS, onde as colônias apresentaram coloração amarela e convexa. Os isolados foram caracterizados como Gram negativo, colônias amarelas em YDC, aeróbicas, reação de hipersensibilidade em folhas de fumo positiva, asparagina negativa, patogenicidade no hospedeiro positivo, aos 8 dias da inoculação, com sintomas de lesão necrótica no limbo foliar e identificados como *X. campestris* pv. *passiflorae*.

No presente trabalho, a adição de fungicida cicloheximida ao meio de cultura foi importante, pois inibiu o crescimento de microrganismos saprófitos, facilitando a detecção de *X. campestris* pv. *passiflorae* nas sementes de maracujá, o mesmo também foi observado para a detecção de *X. axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja (14). Também neste trabalho, sementes de maracujá provenientes de plantas assintomáticas foram avaliadas, no entanto não houve detecção da bactéria nas sementes (dados não demonstrados).

De acordo com Torres et al. (11) testes laboratoriais foram fundamentais para a detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão, sendo a produção de sementes com alto padrão

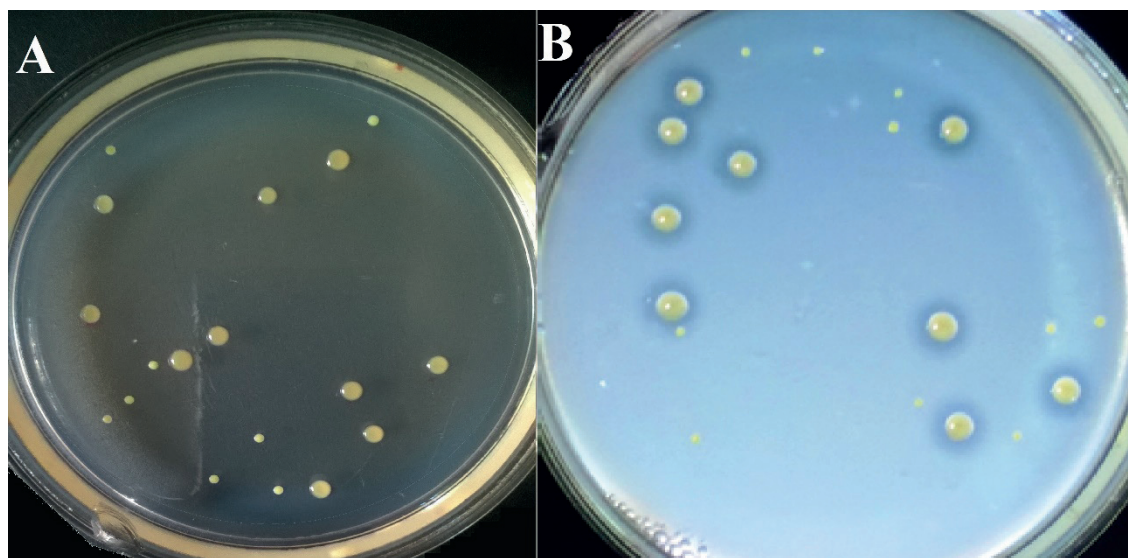


Figura 1. Colônias amarela de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em meio 523(A) e em meio NAS (B), com adição de cicloheximida.

**Tabela 1.** Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em sementes de maracujá, por diferentes métodos de extração e genótipos.

Sementes	Genótipos (UFC g <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )	
	Roxo	Amarelo
Inteiras, desinfestadas	0 bA	0 bA
Inteiras, não desinfestadas	0 bA	0 bA
Quebradas, não desinfestadas	0 bA	0 bA
Quebradas, desinfestadas	2,4 aB	22,6 aA
CV (%)	42,79	

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 0,05.

**Tabela 2.** Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em sementes de maracujá, por diferentes métodos de extração em diferentes meios de cultura.

Sementes	Meio de cultura (UFC g <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> )			
	523	523 + Cicloheximida	NAS	NAS + Cicloheximida
Inteiras, desinfestadas	0 bA	0 bA	0 bA	0 bA
Inteiras, não desinfestadas	0 bA	0 bA	0 bA	0 bA
Quebradas, não desinfestadas	0 bA	0 bA	0 bA	0 bA
Quebradas, desinfestadas	10,8 aA	14 aA	12,3 aA	13 aA
CV (%)	42,79			

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 0,05.

sanitário, uma das medidas mais eficientes de controle da bactéria.

Para os produtores de maracujá é importante a utilização de sementes livres de bactéria, evitando a produção de mudas doentes e posteriormente a disseminação da patógeno na área de cultivo, assim a qualidade sanitária das sementes de maracujá deve ser avaliada em análises laboratoriais. As sementes de maracujá são duras, quando comparadas com sementes de soja e feijão, por isso é importante que ela seja quebrada, para facilitar o fluxo bacteriano para a água e sua posterior detecção em meio de cultura. Também é importante que as sementes sejam desinfestadas para evitar o crescimento de microrganismos saprófitas e para facilitar a detecção da bactéria nas sementes.

Portanto, os meios de cultura 523 e NAS, com adição de cicloheximida e o uso de sementes de maracujá desinfestadas e quebradas foram eficientes para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, os quais podem ser utilizados em rotina de laboratório para a detecção da bactéria em sementes.

## REFERÊNCIAS

1. Ferreira, D.F. **SISVAR**: Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras, MG: UFLA, 2010.
2. Ferreira, P.S.F.; Tebaldi, N.D. Métodos de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em maracujazeiro e biofertilizantes na inibição do crescimento bacteriano *in vitro*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.45, n.2, p.207-209, 2019. DOI: 10.1590/0100-5405/185793.
3. Fischer, I.H.; Kimati, H.; Rezende, J.A.M. Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A. (ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.467-474.
4. Kado, C.I.; Heskett, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.60, p.969-976, 1970.
5. Mamede, M.C.; Tebaldi, N.D. Detecção de *Pantoea ananatis* em sementes de milho. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.46, n.1, p.36-40, 2020. DOI: 10.1590/0100-5405/198561.
6. Mehta, Y.R.; Bomfeti, C.; Bolognini, V. A semi selective medium to detect the presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in a naturally infected cotton seed. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.30, n.5, p.489-496, 2005. DOI: 10.1590/S0100-41582005000500005
7. Rabalho, A.A. **Xanthomonas spp. causadoras da mancha bacteriana do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**: detecção em sementes e diferenciação. 2007. 92p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba. DOI: 10.11606/T.11.2007.tde-03082007-160427
8. Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Lacy, G.H. Gram – negative bacteria: *Xanthomonas*. In: Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Chun, W. (ed.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: American Phytopathology Society Press, 2001. p.175-200.
9. Tebaldi, N.D.; Peters, J.; Souza, R.M.; Chitarra, L.G.; Zouwen, P.; Berger-voet, J.; Wolf, J. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry applying immunostaining and direct viable counting. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v.35, v.4, p.213-222, 2010. DOI: 10.1590/S1982-56762010000400002
10. Tebaldi, N.D.; Souza, R.M.; Machado, J.C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão em meio de cultura semi-seletivo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.32, n.1, p.56-58, 2007. DOI: 10.1590/S0100-41582007000100008.
11. Torres, J.P.; Silva J.T.A.F.; Maringoni, A.C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, n.2, p.136-139, 2009. DOI: 10.1590/S0100-54052009000200010
12. Toussaint, V.; Morris, C.E.; Carisse, O. A new semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *vitiens*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. **Plant Disease**, Saint Paul, v.85, p.131-136, 2001. DOI: 10.1094/PDIS.2001.85.2.131
13. Viana, F.M.P.; Freire, F.C.O.; Cardoso, J.E.; Vidal, J.C. **Principais doenças do maracujazeiro na Região Nordeste e seu controle**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003. 12p. (Embrapa Agroindústria Tropical Comunicado Técnico, 86).
14. Violatti, M.R.; Tebaldi, N.D. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.42, n.3, p.268-270, 2016. DOI: 10.1590/0100-5405/2127