

AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* VIA SEMENTE-ALGODOEIRO EM CONDIÇÕES DE CAMPO, NO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE

EVALUATION OF *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* TRANSMISSION FROM SEEDS TO COTTON PLANTS IN FIELD CONDITIONS, IN THE CERRADO OF MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL

Gustavo de Faria THEODORO¹; Hectory de Castro CORREIA²; André Augusto CHUMPATI²

1. Professor, Doutor, Laboratório de Fitopatologia, Campus de Chapadão do Sul, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Chapadão do Sul, Brasil. gustavo.theodoro@ufms.br; 2. Acadêmico do curso de Agronomia Campus de Chapadão do Sul, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Chapadão do Sul, Brasil.

RESUMO: Avaliou-se a transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (XAM) via semente-plântula de algodoeiro em condições de campo, no Cerrado sul-mato-grossense, por duas safras agrícolas (2009/10 e 2010/11). Foi empregado o método de inoculação de sementes de algodoeiro, após a validação em condições de laboratório, que consistiu na imersão das sementes em suspensão bacteriana, a 10^8 ufc.mL⁻¹, por três horas. Foram obtidos lotes com 1, 2, 5, 10 e 20 % de sementes infetadas, que foram semeadas e conduzidas até as avaliações. Após 15, 30 e 45 dias da semeadura, avaliou-se a incidência de plantas com sintomas típicos da mancha-angular. Não foram observadas plantas doentes, o que indicou ausência de transmissão de XAM, das sementes para as plantas emergidas, na região em que este trabalho foi desenvolvido.

PALAVRAS-CHAVE: *Gossypium hirsutum*. Bactéria. Disseminação.

INTRODUÇÃO

A cotonicultura é uma atividade econômica consolidada e importante para o desenvolvimento de Mato Grosso do Sul, que tem a agropecuária como a principal atividade econômica. Conforme Melo Filho & Richetti (2003), o cultivo do algodoeiro em Mato Grosso do Sul é caracterizado pela alta tecnologia empregada e por estar se expandido nas áreas de cerrado, anteriormente ocupadas pela cultura da soja.

Entre os fatores que contribuem para a redução do rendimento do algodoeiro no mundo, destacam-se as doenças de etiologia variada, que direcionam os programas de melhoramento genético desta malvácea a buscarem genótipos resistentes (HILLOCKS, 1992; CIA & SALGADO, 2005). A mancha angular, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith) Dye, está entre as doenças mais destrutivas do algodoeiro que são avaliadas em alguns programas de melhoramento genético desenvolvidos no Brasil (CIA et al., 2003).

X. a. pv. malvacearum pode sobreviver associada à sementes de algodoeiro e o controle da mancha angular deve ser feito pelo uso de sementes sadias ou tratadas, além de cultivares resistentes (HILLOCKS, 1992; AGRIOS, 2005; CIA & SALGADO, 2005). No Brasil, foram detectadas sementes de algodoeiro com a presença de *X. a. pv. malvacearum* (DEZORDI et al., 2009) e há indícios

de haver uma taxa de transmissão interna pela semente de 4% (CIA & SALGADO, 2005). Porém, o conhecimento sobre a taxa de transmissão desta bactéria das sementes para plântulas é incipiente ou inexistente em condições de campo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a transmissão via semente-plântula de algodoeiro nas condições do Cerrado sul-mato-grossense, em condições de campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, foi efetuada a validação do método de inoculação de sementes por meio da imersão em suspensão bacteriana, proposto por Mariano & Assis (2000), empregando-se o isolado AL002 de *X. a. pv. malvacearum*, patogênico ao algodoeiro.

As sementes de algodoeiro utilizadas, cv. FMT 701 (moderadamente resistente à mancha-angular) foram consideradas isentas de *X. a. pv. malvacearum* pelo método descrito por Dezordi et al. (2009) e, posteriormente, imersas em uma suspensão bacteriana, a 10^8 ufc.mL⁻¹, por 3 h. Após a imersão, as sementes foram secas a temperatura ambiente, por 48 h, em condições de laboratório e separadas em dois grupos, com 500 g cada. As sementes de apenas um destes grupos foram imersas em uma solução de hipoclorito de sódio, a 1 %, por 5 minutos, com a finalidade de avaliar a existência de colonização interna das sementes pela bactéria.

Foram utilizadas, como testemunha, sementes não contaminadas pelo método descrito acima e comprovadamente sadias.

Procedeu-se à detecção da bactéria aos 01, 05, 08, 12 e 20 dias após a imersão das sementes, que permaneceram em caixas 'Gerbox' sem tampa, em condições de laboratório, até as avaliações. Considerou-se, como tratamento, cada momento de detecção do patógeno. Utilizaram-se amostras de 100 g, que foram maceradas em 300 mL de água destilada esterilizada, a 5 °C, por 18 h e as suspensões obtidas por meio da maceração das sementes foram repicadas, com o auxílio de uma alça de platina, na superfície do meio de cultura semi-seletivo, descrito por Dezordi et al. (2009), denominado MSSXAN (extrato de carne - 3 g; peptona - 5 g; amido solúvel - 10 g; sacarose - 5g; Tween 80 - 10 mL; cloreto de cálcio - 0,25 g; solução de cristal violeta a 1 % - 150 µL; cefalexina - 50 mg; clorothalonil - 10 mg; tiofanato metílico - 10 mg; água destilada esterilizada - 1.000 mL). As placas permaneceram incubadas a 28 °C e, após 48 h, foi avaliada a presença de crescimento bacteriano e a verificação da formação do halo de hidrólise do amido e lipólise de Tween 80. Foram empregadas cinco placas de Petri por tratamento e riscou-se o fundo de cada placa, com caneta hidrográfica, de maneira que proporcionasse duas seções por placa. Cada seção foi considerada como uma repetição, proporcionando 10 repetições por tratamento. A amostra foi considerada positiva, ou seja, com sementes infetadas, se em pelo menos um campo semeado com o macerado de sementes, houve a formação de uma colônia da bactéria *X. a. pv. malvacearum* e Gram negativa, pelos testes de coloração e hidróxido de potássio (MARINGONI, 2010).

Para a avaliação da transmissão de *X. a. pv. malvacearum* via semente-plântula, foram empregadas as sementes do mesmo lote utilizado no experimento anterior durante as safras 2009/10 e 2010/11. Na última safra, foi conduzido um experimento, concomitantemente, com sementes do genótipo NC 53345, suscetível à mancha-angular e sem a presença do patógeno, comprovado pelo mesmo método usado anteriormente (DEZORDI et al., 2009).

Os tratamentos foram representados por amostras com 1, 2, 5, 10 e 20 % de sementes contaminadas com *X. a. pv. malvacearum*, por meio do método da imersão de sementes em suspensão bacteriana supracitado. Foram semeadas 100 sementes por repetição, de cada amostra, na área experimental do Campus de Chapadão do Sul, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em

Chapadão do Sul, MS (Latitude: 18°48'00" S; Longitude: 52°36'30" W; Altitude: 820 m; solo Latossolo Vermelho Distrófico com textura argilosa), com o objetivo de avaliar o índice de transmissão da bactéria via semente-plântula de algodoeiro. Cada parcela experimental foi representada por três linhas com três metros de comprimento, espaçadas de 0,9 m, com 10 a 12 sementes por metro linear, distribuídas manualmente.

O tratamento testemunha foi representado por sementes comprovadamente sadias, empregadas na mistura para a obtenção dos lotes com diferentes proporções de sementes infectadas.

As avaliações consistiram na observação de sintomas típicos da mancha-angular em todas as plântulas emergidas, aos 15, 30 e 45 dias após semeadura. Foram empregadas cinco repetições, em um delineamento experimental de blocos ao acaso e as médias de incidência da doença foram comparadas por meio do teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A adubação de base e em cobertura ocorreu conforme recomendação de adubação para a cultura, feita mediante análise de solo, as plantas invasoras foram controladas por meio de capinas e os insetos-praga pelo uso de inseticidas recomendados para este fim.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o método de inoculação das sementes foi eficiente para assegurar que células de *X. a. pv. malvacearum* fossem detectadas até os 20 dias após a imersão das sementes na suspensão bacteriana, mesmo após desinfestação com hipoclorito de sódio (Tabela 01). Essa constatação pode ser considerada como uma validação do método de inoculação empregado e indicou que a bactéria, provavelmente, colonizou internamente as sementes (NEEGAARD, 1977) e permaneceu viável até a última avaliação.

A redução da incidência de *X. a. pv. malvacearum* foi notada apenas nas sementes desinfestadas. Porém, embora as avaliações não tenham sido quantitativas, notou-se redução do número de colônias bacterianas com o decorrer do tempo. O meio de cultura empregado proporcionou identificação do patógeno nas avaliações, pois foram notadas colônias bacterianas Gram negativas, com as mesmas características morfológicas indicadas por Schaad et al. (2001), além da típica hidrólise de amido e lipólise de Tween 80. Dezordi et al. (2009) detectaram *X. a. pv. malvacearum* em sementes naturalmente infectadas por meio da mesma metodologia e constataram elevada

sensibilidade do meio de cultura semi-seletivo MSSXAN.

Tabela 01. Eficiência da inoculação de sementes de algodoeiro, cv. FMT 701, com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (XAM), por meio do método de imersão em suspensão bacteriana.

Tratamentos	Incidência de XAM no meio de cultura MSSXAN (%)*	
	Não desinfestada	Desinfestada**
Testemunha	0	0
01 DAI***	100	100
05 DAI	100	100
08 DAI	100	100
12 DAI	100	100
20 DAI	90	20

* Avaliação de 10 repetições, em cinco placas de Petri com o meio de cultura MSSXAN; **Desinfestação com hipoclorito de sódio, a 1%, por cinco minutos; *** Dia(s) após a imersão, por cinco minutos, das sementes na suspensão bacteriana (10^8 ufc.mL⁻¹)

Em ambas as safras, não foi possível detectar a transmissão de *X. a. pv. malvacearum* via semente-plântula. A maioria das plântulas emergiu com menos de 20 dias e pode ser que as células bacterianas estiveram viáveis e presentes nas sementes até esse momento. De acordo com as constatações feitas na validação do método de inoculação, o isolado bacteriano permaneceu associado às sementes de algodoeiro até a última avaliação. Entretanto, diversos fatores influenciam as taxas de transmissão de patógenos via semente-planta, entre eles, destacam-se os fatores físicos e biológicos (NEERGAARD, 1977; MACHADO, 2000).

A concentração da suspensão bacteriana empregada na inoculação das sementes, nos experimentos, foi próxima ou semelhante àquelas encontradas em trabalhos que estudaram a transmissão semente-plântula de outras espécies de *Xanthomonas* fitopatogênicas (TEBALDI et al., 2007; OKECHUKWU et al., 2010). Por esta razão, este fato provavelmente não influenciou a ausência de transmissão semente-plântula de algodoeiro observada.

Como a área em que o experimento foi conduzido permaneceu por muitos anos em constante e ininterrupto processo de rotação de espécies agrícolas e plantio direto, acredita-se que a população microbiana existente nos agregados de solo pode ter influenciado na redução da população de *X. a. pv. malvacearum* nas sementes de algodoeiro. Conforme Pereira et al. (2007), foram detectados valores superiores do C da biomassa microbiana e de diversidade genética da comunidade bacteriana total do solo e inferiores de quociente metabólico microbiano em sistema de semeadura direta e com a rotação de culturas, em

comparação com o plantio convencional e a sucessão de culturas, respectivamente. Além disso, populações de *Pseudomonas* fluorescentes no solo colaboram com a estratégia de utilização da microbiota do solo para induzir o crescimento de plantas e controlar doenças de plantas (BOTELHO; MENDONÇA-HAGLER, 2006). Desta forma, acredita-se que houve interferência da microbiota antagonica do solo ao patógeno presente nas sementes inoculadas, embora esta não tenha sido quantificada. Apesar disso, é pouco provável que os microrganismos do solo tenham eliminado toda a população bacteriana das sementes do algodoeiro e impedido a instalação da doença ao campo.

A resistência genética das plantas não foi relevante para garantir a transmissão semente-plântula, tendo-se em vista que foram conduzidos experimentos com dois genótipos, com reações distintas à *X. a. pv. malvacearum*, e não foi verificada nenhuma planta com sintomas de mancha-angular.

Por outro lado, aventa-se a hipótese de que os fatores ambientais que ocorreram durante a condução dos experimentos, em ambas as safras, não permitiram que *X. a. pv. malvacearum* causasse doença nas plântulas de algodoeiro. As temperaturas médias, observadas durante o período de condução dos experimentos, foram de 24,4 °C (safra 2009/10) e 23,10 °C (safra 2010/11). As médias das maiores temperaturas, constatadas no mesmo período foram de 29,50 °C (safra 2009/10) e 28,86 °C (safra 2010/11). Já as médias das menores temperaturas ocorridas foram de 21,67 °C (safra 2009/10) e 19,28 °C (safra 2010/11). Estas informações são importantes indicadores da ausência de condições climáticas favoráveis à mancha-angular verificadas, uma vez que, conforme Hillocks (1992), esta doença

ocorre em condições de temperatura de 32 a 38° C durante o dia e, à noite, ao redor de 17 a 20 °C.

Silva et al. (2010), por meio da avaliação da ocorrência de doenças em 7.540 algodoeiros cultivados na região de Chapadão do Sul, que corresponde aos municípios de Chapadão do Sul, MS, Costa Rica, MS, e Chapadão do Céu, GO, durante as safras 2007/08 e 2008/09, não encontraram plantas com sintomas de mancha-angular. Estes autores atribuíram o fato, principalmente, aos fatores climáticos desfavoráveis à doença na região, especialmente concernente à temperatura. Correia et al. (2010), empregando o meio de cultura MSSXAN, não constataram a presença de *X. a. pv. malvacearum* em diversos lotes de sementes de algodoeiro empregados na região de Chapadão do Sul nas safras 2008/09 e 2009/2010. Estes autores concluíram que, pelo fato de grande parte das sementes terem sido produzidas na região, provavelmente a mancha-angular não incidiu nos algodoeiros cultivados nas lavouras destinadas à produção de sementes por motivos climáticos.

Os resultados mostraram que não houve transmissão de *X. a. pv. malvacearum* via semente-plântula de algodoeiro, ao campo, no município de Chapadão do Sul, por duas safras agrícolas, com o uso de sementes inoculadas. Trabalhos dessa natureza podem colaborar com a compreensão dos

fenômenos que favorecem a ocorrência de doenças bacterianas em diferentes regiões geográficas. Além disso, indica que diversos fenômenos, além da presença de patógenos nas sementes, estão associados ao processo de transmissão dos mesmos pelas sementes.

CONCLUSÕES

O método de inoculação das sementes de algodoeiro empregado nesse trabalho constatou células viáveis de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* até os 20 dias após a submersão das sementes em suspensão bacteriana;

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, não foi observada a transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* via semente-plântula de algodoeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Edital MCT/CNPq/CT-Agronegócio N ° 42/2008), pelo apoio financeiro;

Aos pesquisadores Dr. Paulo Aguiar (Fundação MT) e Dr. Luiz Gonzaga Chitarra (Embrapa Algodão), pelas sementes de algodoeiro do genótipo NC 53345.

ABSTRACT: It was evaluated the cotton seed-to-plant transmission of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (XAM), in the field conditions of cerrado of Mato Grosso do Sul, Brazil, and in two crop seasons (2009/10 e 2010/11). In laboratory conditions it was done the validation of the method of seed inoculation by immersion in a bacterial suspension with 10^8 ucf.mL⁻¹ for three hours and after that this method was used. It was obtained lots with 1, 2, 5, 10 e 20 % of infected seed and the seed were sowed and the plants cultivated. After 15, 30 e 45 days of the sow, was evaluated the incidence of plants with symptoms of angular leaf spot. There were not diseased plants, indicating the lack of the transmission of XAM in emerged cotton plants in the region where this work was developed.

KEYWORDS: *Gossypium hirsutum*. Bacteria. Dissemination.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**, 5 ed., San Diego:Elsevier, 2005. 922 p.
- BOTELHO, G. R.; MENDONCA-HAGLER, L. C. Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 401-416, 2006.
- CIA, E.; FUZATTO, M. G.; KONDO, J. I.; GRIDI-PAPP, I. L.; CHIAVEGATO, E. J.; PIZZINATTO, M. A. Desenvolvimento de resistência múltipla a doenças em linhagens avançadas de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 420-423, 2003.

CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, v.2, 4 ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 41-52.

CORREIA, H. C.; SILVA, R. R.; THEODORO, G. F.; CHUMPATI, A. A.; THEODORO, J. V. C.; MARINGONI, A. C.; CASSETARI NETO, D. Ausência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro empregadas em Chapadão do Sul. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35. p. 247, 2010. (Suplemento).

DEZORDI, C.; MARINGONI, A. C.; MENTEN, J. O. M.; CAMARA, R. C. Semi-selective culture medium for *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* detection in cotton seeds (*Gossypium hirsutum* L.). **Asian Journal of Plant Pathology**, New York, p. 1-11, 2009.

HILLOCKS, R. J. **Cotton diseases**. Wallingford: CAB International, 1992. 412 p.

MACHADO, J. C. Patologia de sementes: significados e atribuições. In: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. (Ed.) **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed., Jaboticabal: Funep, 2000. 522-580p.

MARIANO, R. L. R. ; ASSIS, S. M. P. Inoculação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.) **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2000. p. 53-63.

MARINGONI, A. C. **Técnicas em fitobacteriologia**. Botucatu: FEPAF, 2010. 70p.

MELO FILHO, G. A.; RICHETTI, A. **Cadeia produtiva do algodão de Mato Grosso do Sul: eficiência econômica e competitividade**. Dourados : Embrapa Agropecuária Oeste, 2003. (Série Documentos no. 54). 72p.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: McMillan Press, v. 2, 1977. 1191 p.

OKECHUKWU, R. U.; EKPO, E. J. A.; OKECHUKWU, O. C. Seed to plant transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* isolates in cowpea. **African Journal of Agricultural Research**, New York, v. 5, n. 6, p. 431-435, 2010.

PEREIRA, A. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; KASCHUK, G.; CHUEIRE, L. M. O.; CAMPO, R. J.; TORRES, E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 31, n. 6, p. 1397-1412, 2007.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; LACY, G. H. *Xanthomonas*. In: SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Plant pathogenic bacteria**. 3 ed., St. Paul: APS, 2001. p. 175-200.

SILVA, R. R.; THEODORO, G. F.; STAUDT, R. C. Avaliação da incidência de doenças em algodoeiros cultivados na região de Chapadão do Sul. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 14, n. 2, p. 91-95, 2010.

TEBALDI, N. D.; PANIZZI, R. C.; SADER, R. Detecção, transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 416-418, 2007.