

Influência da Temperatura, Umidade, Concentração de Inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e Idade do Fruto no Desenvolvimento da Mancha-Aquosa em Melão*

Elineide B. Silveira¹, Rosa L. R. Mariano^{2**}, Sami J. Michereff^{2**} & Sônia M. A. Oliveira²

¹Departamento de Biologia, Área de Microbiologia, e-mail: elineidebs@yahoo.com.br; ²Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade; Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE

(Aceito para publicação em 08/08/2003)

Autor para correspondência: Elineide B. Silveira

SILVEIRA, E.B., MARIANO, R.L.R., MICHEREFF, S.J. & OLIVEIRA, S.M.A. Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. Fitopatologia Brasileira 29:034-038. 2004.

RESUMO

Foram analisadas as influências da temperatura (15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C), umidade (0 e 6 h em câmara úmida), concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (0; 3,4 x 10¹; 3,4 x 10²; 3,4 x 10³; 3,4 x 10⁴; 3,4 x 10⁵; 3,4 x 10⁶ e 3,4 x 10⁷ UFC.ml⁻¹) e idade do fruto (40, 50, 60 e 70 dias) na severidade da mancha-aquosa em frutos de melão (*Cucumis melo*) do tipo Amarelo. Os frutos foram inoculados pelo método de injeção subepidérmica determinando-se: período de incubação, diâmetro da lesão externa e profundidade da lesão. O período de incubação não foi influenciado significativamente pela temperatura nos frutos mantidos sem e com câmara úmida. As maiores lesões externas foram observadas em frutos mantidos a 30 °C (19,5 mm) em câmara úmida por 6 h, e a 35 °C (15,3 mm) sem câmara

úmida. Maior profundidade das lesões foi observada nos frutos mantidos em câmara úmida a 30 °C (17,5 mm). Sem câmara úmida, as lesões foram maiores nas temperaturas de 25 °C (11,7 mm) e 30 °C (11,3 mm). Não foram observados sintomas da doença em frutos mantidos a 15 e 20 °C. A umidade não influenciou o diâmetro e a profundidade da lesão nas temperaturas de 35 e 25 °C, respectivamente. O diâmetro e profundidade das lesões aumentaram com a elevação da concentração de inóculo. A idade do fruto não influenciou significativamente o diâmetro da lesão externa e maior profundidade das lesões foi observada nos frutos com 50 dias.

Palavras-chave adicionais: *Cucumis melo* var. *inodorus*, epidemiologia, fitobacteriose, nordeste do Brasil.

ABSTRACT

Influence of temperature, humidity, inoculum concentration of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and fruit age on melon fruit blotch development

The influence of temperature (15, 20, 25, 30, 35 and 40 °C), humidity (0 and 6 h in a moist chamber), inoculum concentration of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (0; 3,4 x 10¹; 3,4 x 10²; 3,4 x 10³; 3,4 x 10⁴; 3,4 x 10⁵; 3,4 x 10⁶ and 3,4 x 10⁷ CFU.ml⁻¹) and fruit age (40, 50, 60 and 70 days) on the severity of fruit blotch of melon (*Cucumis melo*) yellow type was studied. Fruits were inoculated by sub-epidermal injection and incubation period, external lesion diameter and lesion depth were determined. The incubation period was not significantly

affected by temperature in fruits kept within or without a moist chamber. Larger external lesions were observed on fruits kept at 30 °C (19.5 mm) in a moist chamber for 6 h and 35 °C (15.3 mm) without a moist chamber. Deeper lesions were observed on fruits kept in a moist chamber at 30 °C (17.5 mm). Under dry conditions, deeper lesions were observed at 25 °C (11.7 mm) and 30 °C (11.3 mm). No disease symptoms were observed on fruits kept at 15 and 20 °C. The humidity did not influence the lesion diameter and depth at 35 and 25 °C, respectively. Lesion diameter and depth were positively correlated to inoculum concentration. Fruit age did not significantly influence lesion diameter, 50-day old fruits showed deeper lesions.

INTRODUÇÃO

A mancha-aquosa, causada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*) Willems *et al.*, ocorre em diversas regiões produtoras de melão (*Cucumis melo* L.) dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, constituindo fator de depreciação do valor comercial dos frutos (Santos & Viana, 2000). Os sintomas da doença são mais comuns e facilmente visualizados nos frutos. Na casca, inicialmente as lesões

caracterizam-se por pequenas manchas verde-claras e oleosas que se tornam marrom-claras ou marrom-escuras, atingindo grande extensão da superfície do fruto (Santos & Viana, 2000). Internamente, ocorre descoloração da polpa que se apresenta marrom-avermelhada (O'Brien, 1999).

A alta severidade da mancha-aquosa na cultura do meloeiro no Rio Grande do Norte pode ser explicada pelas condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de *A. avenae* subsp. *citrulli*, principalmente nos períodos chuvosos (Sales Júnior & Menezes, 2001). Segundo Latin (1996), o progresso da mancha-aquosa em melancia [*Citrus lanatus* (Thumb.) Matsumi & Nakai] é favorecido por temperatura e

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal Rural de Pernambuco. (2002)

** Bolsista do CNPq

umidade elevadas. Porém, ainda não há dados epidemiológicos detalhados para a mancha-aquosa em melão.

Na tentativa de determinar condições mais favoráveis a fitopatógenos, o conhecimento da interação patógeno-hospedeiro-ambiente é imprescindível. Assim, a idade em que a planta hospedeira é mais suscetível, as faixas de temperatura e de umidade relativa, bem como a concentração de inóculo do patógeno adequada para estabelecimento de altos níveis de doença, devem ser definidos para cada associação patógeno-hospedeiro. Por se tratar de uma doença registrada recentemente em meloeiro no Rio Grande do Norte (Assis *et al.*, 1999), existem poucos estudos sobre o patossistema meloeiro - *A. avenae* subsp. *citrulli*, principalmente relacionados a aspectos epidemiológicos em frutos em condições de campo e pós-colheita. Mesmo na cultura da melancia, onde a doença é mais pesquisada, os estudos têm focado a produção de mudas em casa de vegetação e perdas de frutos no campo. Informações sobre o desenvolvimento da doença em pós-colheita são escassas (Rushing *et al.*, 1997), mas fundamentais para o estabelecimento de técnicas e procedimentos que desfavoreçam o desenvolvimento de *A. avenae* subsp. *citrulli* em frutos de melão.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo do patógeno e idade do fruto na severidade da mancha-aquosa em melão.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do inóculo e inoculação

Foi utilizado um isolado (Aac1.50) de *A. avenae* subsp. *citrulli*, pertencente à coleção de bactérias do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Esse isolado foi obtido de fruto de melão amarelo apresentando sintomas característicos da mancha-aquosa, coletado em plantio comercial no município de Baraúna, Rio Grande do Norte, em 2001. Em todos os experimentos, os frutos de melão comerciais do tipo Amarelo, com cerca de 60 dias, foram inoculados pelo método de injeção subepidérmica (Somodi *et al.*, 1991). Após lavagem (água e sabão) e secagem, cada fruto foi marcado por quatro linhas perpendiculares ao seu comprimento. Com microlitros de suspensão bacteriana, cuja concentração variou em cada experimento, foram injetados logo abaixo da superfície da casca, nos espaços intercelulares, em três pontos de cada linha, com auxílio de seringa hipodérmica.

Os frutos foram avaliados pela observação visual dos sintomas da mancha-aquosa, caracterizados por pequenas manchas verde-claras e oleosas que progrediram para marrom-escuras na casca do fruto, correspondendo a descoloração da polpa de cor marrom-avermelhada. Diariamente foi verificada a incidência da doença, calculando-se o período de incubação (número de dias entre a inoculação e o surgimento dos sintomas), e oito dias após a inoculação foi avaliada a severidade, determinando-se o diâmetro da lesão externa e profundidade da lesão, medidos com o auxílio de uma régua milimetrada.

Influência da temperatura e da umidade na severidade da mancha-aquosa em frutos de melão

Frutos com 70 dias de idade foram inoculados com a suspensão de *A. avenae* subsp. *citrulli* contendo Tween 20 (0,005%), ajustada à concentração de $3,4 \times 10^7$ UFC ml⁻¹, conforme equação previamente determinada. Os frutos foram mantidos em incubadora do tipo B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) às temperaturas de 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C, em condições ou não de câmara úmida por 6 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial, representado por seis temperaturas e duas condições de umidade, com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por três pontos de inoculação.

Influência da concentração do inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e da idade dos frutos de melão na severidade da mancha-aquosa

Suspensões de *A. avenae* subsp. *citrulli* nas concentrações de 0 ; $3,4 \times 10^1$; $3,4 \times 10^2$; $3,4 \times 10^3$; $3,4 \times 10^4$; $3,4 \times 10^5$; $3,4 \times 10^6$ e $3,4 \times 10^7$ UFC ml⁻¹, contendo Tween 20 (0,05%), foram inoculadas em frutos com 40, 50, 60 e 70 dias de idade. Os melões foram mantidos individualmente em câmara úmida por 6 h, à temperatura de 30 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial, representado por oito concentrações de inóculo do patógeno e quatro idades de frutos, com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por três pontos de inoculação.

Análises estatísticas

Os dados obtidos nos experimentos de temperatura e umidade e de concentração de inóculo e idade dos frutos foram submetidos à análise de regressão linear e não-linear, com o auxílio dos programas SAS User'S guide: statistics, Version 8 (SAS Institute Inc., Cary, USA, 1999) e STATISTICA for Windows (StatSoft Inc., Tulsa - OK, USA, 2000), respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se 100% de incidência da mancha-aquosa. O período de incubação variou de dois a cinco dias, com média de 2,57 dias, não sendo influenciado significativamente pela temperatura nos frutos mantidos sem e com câmara úmida. No entanto, Friesland & Schrödter (1988) destacaram a influência da temperatura sobre o período de incubação de doenças de plantas. Silveira (2002) verificou um período de incubação médio de 2,9 dias para a mancha-aquosa em frutos de melão mantidos a 30 ± 3 °C e Somodi *et al.* (1991) verificaram sintomas em frutos de melancia após dois dias, na faixa de temperatura de 15 a 36 °C.

Dos modelos testados, o modelo cúbico $y = a + bx + cx^2 + dx^3$, onde y = diâmetro da lesão externa (DLE) ou profundidade da lesão (PL) e x = temperatura, proporcionou melhor ajuste dos dados de progresso da mancha-aquosa em frutos de melão mantidos sem e com câmara úmida. A estimativa do parâmetro temperatura foi significativa em relação ao DLE e PL ($P < 0,001$)

para os tratamentos com e sem câmara úmida. Os maiores diâmetros de lesões externas foram observados nos frutos mantidos a 30 °C (19,5 mm) com câmara úmida durante 6 h, e a 35 °C (15,3 mm) sem câmara úmida (Figura 1A). Com relação à profundidade, as lesões nos frutos mantidos em câmara úmida a 30 °C (17,5 mm) foram maiores que as demais. Sem câmara úmida, as lesões foram maiores à temperatura de 25 °C (11,7 mm) e 30 °C (11,3 mm) (Figura 1B).

A 40 °C, verificou-se diminuição no diâmetro da lesão externa e profundidade da lesão nos frutos mantidos com e sem câmara úmida. Isto sugere que nesta temperatura houve redução do metabolismo da bactéria. Embora Schaad *et al.* (1978) tenham citado que *A. avenae* subsp. *citrulli* pode crescer à temperatura de 41 °C em meio de cultura artificial, não existem relatos sobre a temperatura ótima para crescimento desta bactéria.

Segundo O'Brien & Martin (1999), a parte interna do fruto pode estar bastante comprometida, mesmo quando a lesão externa é de apenas alguns centímetros de diâmetro. Contudo, observaram-se maiores lesões externamente nos frutos de melão, o que poderia ser explicado pelo método de inoculação utilizado.

Não foi verificado desenvolvimento de sintomas nas temperaturas de 15 e 20 °C. Possivelmente, além de influenciar no metabolismo do fruto, a temperatura mais baixa afeta o desenvolvimento da doença. De acordo com Arinze (1986), baixas temperaturas reduzem a atividade microbiana pela alteração da respiração do fruto e de reações enzimáticas que causam deterioração. O pré-resfriamento ao qual são submetidos os frutos de melão para exportação, com o objetivo de baixar a temperatura para 10 a 15 °C, é uma medida de controle eficiente da mancha-aquosa na fase pós-colheita. Contudo, no mercado interno, tanto no Rio Grande do Norte quanto em outros estados do Nordeste e outras regiões, o transporte em caminhões sem refrigeração e a comercialização em idênticas condições em supermercados e/ou feiras livres favorecem a incidência da doença. Moretti (2000), realizando estudos de variação da temperatura de carga de melões durante o transporte rodoviário sem refrigeração, demonstrou que a temperatura nos frutos apresentava valores superiores a 29 °C, atingindo picos de 40 °C. Nessa faixa de temperatura os frutos estariam suscetíveis à infecção (Figura 1), o que comprova a importância das baixas temperaturas no controle da mancha-aquosa em pós-colheita.

A umidade não influenciou o diâmetro da lesão externa e profundidade da lesão, nas temperaturas de 35 e 25 °C, respectivamente (Figura 1). A ocorrência de lesões externamente e internamente nos frutos, mesmo na ausência da câmara úmida, indica que a localização inicial de *A. avenae* subsp. *citrulli* nos espaços intercelulares é suficiente para o estabelecimento do processo de infecção. De acordo com os resultados, as epidemias em pós-colheita da mancha-aquosa do melão parecem ser mais influenciadas por diferenças na temperatura, uma vez que a presença da umidade não é essencial para o início da infecção, embora possa favorecer a maior severidade da doença. A perda de umidade de produtos frescos

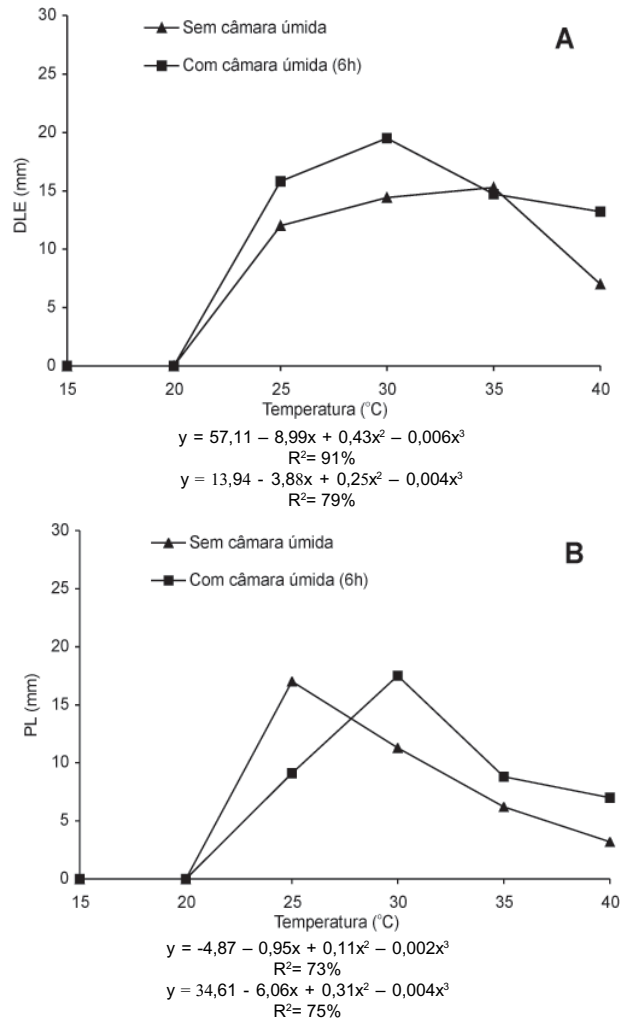


FIG. 1 - Influência da temperatura e da umidade na severidade da mancha-aquosa em frutos de melão (*Cucumis melo*) com 70 dias de idade, inoculados artificialmente, determinada pelo: A- diâmetro da lesão externa (DLE) e B- profundidade da lesão (PL).

é grandemente determinada pela umidade relativa do ambiente. Elevados teores de umidade relativa, embora ajudem a manter a turgidez e reduzir as perdas de água no fruto, podem ser favoráveis ao desenvolvimento de patógenos (Chitarra & Chitarra, 1990).

A estimativa do parâmetro idade do fruto não foi significativa em relação ao diâmetro da lesão externa. O modelo linear $y = a + bx$, onde y = diâmetro da lesão externa (DLE) e x = concentração do inóculo (CI) de *A. avenae* subsp. *citrulli*, proporcionou melhor ajuste dos dados de progresso da mancha-aquosa em frutos de melão com coeficientes de determinação (R^2) de 98% e significância de $P < 0,001$ (Figura 2).

A idade do fruto e concentração de inóculo influenciaram significativamente a profundidade da lesão da mancha-aquosa, com $P = 0,04$ e $P < 0,001$, respectivamente. Dos oito modelos testados, o modelo linear, com a equação $z = -18,62 +$

$0,749x + 3,724y - 0,008x^2 + 0,018xy - 0,333y^2$, onde z = profundidade da lesão (PL), x = idade do fruto (IDADE) e y = concentração de inóculo (CI), proporcionou melhor ajuste dos dados de progresso da doença em frutos de melão com coeficientes de determinação (R^2) de 82,1%.

O diâmetro da lesão externa nos frutos de melão aumentou, de forma linear, com o incremento na concentração de inóculo de $3,4 \times 10^2$ para $3,4 \times 10^7$ UFC ml⁻¹ e a profundidade da lesão, de $3,4 \times 10^1$ para $3,4 \times 10^7$ UFC ml⁻¹. Na concentração $3,4 \times 10^1$ UFC ml⁻¹ não foi observada a presença de sintomas internos da doença nos frutos com 60 e 70 dias. O aumento da severidade da mancha-aquosa com a elevação da concentração de inóculo do patógeno destaca a importância do controle da doença na parte aérea da planta, pela eliminação ou redução da população do patógeno, impedindo a infecção do fruto e/ou a manifestação da doença no campo e na pós-colheita.

Frutos de melão com 40, 50, 60 e 70 dias foram suscetíveis a *A. avenae* subsp. *citrulli* contudo, frutos com 50 dias foram mais afetados pela doença em relação à profundidade da lesão. Estes resultados discordam do que se verifica no campo, no Rio Grande do Norte, onde os sintomas são frequentemente observados nos frutos maduros, à época da colheita. Uma possível explicação para a maior severidade obtida nos frutos com 50 dias, seria a ocorrência de alterações morfológicas e fisiológicas induzidas pela colheita prematura. Sabe-se que em melancia, a infecção por *A. avenae* subsp. *citrulli* ocorre durante a floração ou formação do fruto, embora a constatação mais freqüente de sintomas da doença seja feita também nos frutos maduros antes da colheita (Isakeit, 1999). Frutos de melancia com duas a três semanas de idade são mais suscetíveis à invasão pela bactéria, pois à medida que ocorre o amadurecimento são cobertos com uma camada de cera que fecha os estômatos e previne a entrada do patógeno (Hopkins *et al.*, 1992). Com a formação da camada de cera, os frutos maduros podem ser invadidos pela bactéria somente por

ferimento (Somodi *et al.*, 1991). Não existem estudos de campo que relacionem a penetração de *A. avenae* subsp. *citrulli* e o desenvolvimento da mancha-aquosa em frutos de melão. Acredita-se que por ser uma espécie da mesma família da melancia, o meloeiro apresente características morfológicas e fisiológicas semelhantes e, conseqüentemente, uma resposta similar à infecção pelo patógeno.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, bem como ao Dr. Rui Sales Júnior (ESAM/PROFRUTAS-CDSV-RN) pela concessão de frutos de melão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARINZE, A.E. Post-harvest diseases of tomato fruit in Southern Nigeria. *Fitopatologia Brasileira* 11:637-645. 1986.
- ASSIS, S.M.P., MARIANO, R.L.R., SILVA-HANLIN, D.M.W. & DUARTE, V. Mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, no Estado do Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira* 24:191. 1999. (Rsumo)
- CHITARRA, M.I.F. & CHITARRA, A.B. Pós-colheita de frutos e hortaliças. Fisiologia e manuseio. Lavras: ESAL-FAEPE, 1990.
- FRIESLAND, H. & SCHRÖDTER, H. The analysis of weather factors in epidemiology. In: Kranz, J. & Rotem, J. (Eds.). *Experimental techniques in plant diseases epidemiology*. Berlin. Springer-Verlag. 1988. pp.115-133.
- HOPKINS, D.L., KUCHAREK, T., GAY, D., GITAITIS, R., COOK, W. & KEINATH, A. Bacterial fruit blotch of watermelon. Florida. *American Sunmelon. Bulletin*, 1992.
- ISAKEIT, T. Bacterial fruit blotch in watermelon. Texas: The Agricultural Extension Service-USA, 1999. Disponível em: <<http://www.cygnus.tamu.edu/exlabn/vegetables/Watermelon/wmelon.htm>>. Acesso em: 22 dez. 2000.
- LATIN, R.X. Bacterial fruit blotch of Cucurbits. St. Paul: Plant Health Progress-USA, 1996. Disponível em: <<http://www.planthealthprogress.org/current/management/bacterialblotch/article.htm>>. Acesso em: 23 dez. 2001.
- MORETTI, C.L.; Qualidade em tempo real. *Cultivar-Hortaliças e Frutas* 8:29-31. 2001.
- O'BRIEN, R.G. Bacterial fruit blotch of melons. Department of Primary Industries. Queensland, 1999. Disponível em: <<http://www.dpi.qld.gov.au/doinotes/hortic/vegetable/h99144.html>>. Acesso em: 02 ago. 2000.
- O'BRIEN, R.G. & MARTIN, A.L. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 39:479-485. 1999.
- RUSHING, J.W., COOK, W.P. & KEINATH, A.P. Postharvest behavior of watermelon fruit blotch. In: Hopkins, D., Stall, R.E., Latin, R., Rushing, J., Cook, W.P. & Keimath, A.P. (Eds.) *Bacterial fruit blotch of watermelon*. Tampa. *Citrus & Vegetable Magazine*. 1997. pp.5-6.

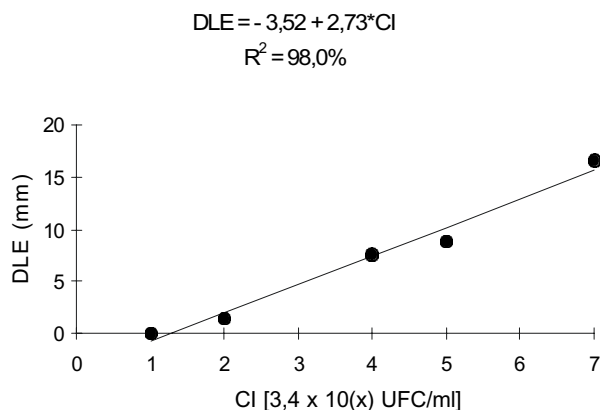


FIG. 2 - Influência da concentração de inóculo (CI) de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* na severidade da mancha-aquosa, em frutos de melão (*Cucumis melo*) inoculados artificialmente e mantidos em câmara úmida por 6 h a 30 °C, determinada pelo diâmetro da lesão externa (DLE).

- SALES JÚNIOR, R. & MENEZES, J.B. Mapeamento das doenças fúngicas, bacterianas e viróticas do cultivo do melão no Estado do RN. Mossoró. Escola superior de Agricultura de Mossoró. Relatório Técnico, 2001.
- SANTOS, A.A. & VIANA, F.M. Mancha-aquosa do melão. Ceará. EMBRAPA. 2000.
- SCHAAD, N.W., SOWELL, G., GOTO, R.W., COLWELL, R.R. & WEBB, R.E. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 28:117-125. 1978.
- SILVEIRA, E.B. Variabilidade de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e epidemiologia da mancha-aquosa do melão. (Tese de Doutorado). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2002.
- SOMODI, G.C., JONES, J.B., HOPKINS, D.L., STALL, R.E., KUCHARAK, T.A., HODGE, N.C. & WATERSON, J.C. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Disease 75:1053-1056. 1991.