

# Caracterização de Isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

Janaína C. Oliveira<sup>1</sup>, Elineide B. Silveira<sup>2</sup>, Rosa L.R. Mariano<sup>1</sup>,  
Enildo Cardoso<sup>1</sup> & Ivanise O. Viana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia/Fitossanidade; <sup>2</sup>Departamento de Biologia/Microbiologia,  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-030, Recife, PE, Brasil, e-mail:elineidebs@yahoo.com.br

Autor para correspondência: Elineide B. Silveira

OLIVEIRA, J.C., SILVEIRA, E.B., MARIANO, R.L.R., CARDOSO, E. & VIANA, I.O. Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Fitopatologia Brasileira 32:480-487. 2007.

## RESUMO

Foram caracterizados 41 isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* com base em aspectos fisiológicos e bioquímicos. Todos os isolados induziram sintomas típicos da mancha-aquosa em plântulas, plantas e frutos de meloeiro (*Cucumis melo*) e melancia (*Citrullus lanatus*). Pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ( $P = 0,05$ ) os isolados foram separados quanto ao índice de doença em 5 e 7 grupos, respectivamente para plântulas de meloeiro e melancia, e em 2 grupos para plantas das duas hospedeiras. Em frutos, os isolados foram separados em 3 e 10 grupos para a variável diâmetro da lesão externa e 2 e 9 grupos para profundidade da lesão, respectivamente para melão e melancia. Todos os isolados induziram reação de hipersensibilidade em fumo (*Nicotiana tabacum*); utilizaram os compostos asparagina, L-leucina e DL-ácido láctico; produziram enzimas lipolíticas e o fitohormônio ácido indol acético; foram sensíveis a oxicloreto de cobre ( $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), óxido cuproso ( $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), hidróxido de cobre ( $138,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sulfato de estreptomicina ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e Agrimaicin 500 ( $428 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); e resistentes a kasugamicina ( $87 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), agrimicina ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), eritromicina ( $15 \mu\text{g}$ ), gentamicina ( $10 \mu\text{g}$ ), amoxicilina ( $10 \mu\text{g}$ ), neomicina ( $30 \mu\text{g}$ ), estreptomicina ( $10 \mu\text{g}$ ), norfloxacina ( $10 \mu\text{g}$ ) e rifampicina ( $5 \mu\text{g}$ ). Nenhum isolado apresentou atividade pectinolítica, amilolítica, celulolítica e proteolítica ou produção do polissacarídeo levana e da toxina siringomicina. Foi constatada variabilidade entre os 41 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* quanto à sensibilidade à tetraciclina ( $30 \mu\text{g}$ ), sendo 41,5% resistentes, 46,3% moderadamente sensíveis e 12,2% altamente sensíveis.

**Palavras-chave adicionais:** mancha-aquosa, *Cucumis melo*, *Citrullus lanatus*, características fisiológicas e bioquímicas.

## ABSTRACT

### Characterization of strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

Forty-one isolates of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* were characterized based on physiological and biochemical aspects. All isolates induced typical symptoms of fruit blotch on seedlings, plants and fruits of melon (*Cucumis melo*) and watermelon (*Citrullus lanatus*). The Scott-Knott test ( $P = 0.05$ ) separated the isolates for disease index in 5 and 7 groups, respectively, for melon and watermelon seedlings, and 2 groups for plants of these two hosts. In fruits, all isolates were separated in 3 and 10 groups for the variable diameter of extern lesion, and 2 and 9 groups for lesion depth, respectively, for melon and watermelon. All isolates induced hypersensitivity in tobacco (*Nicotiana tabacum*); utilized the composites asparagine, L-leucine and DL-acid lactic; produced enzymes lipolytic and phytohormone indoleacetic acid. None of the isolates studied showed pectinolytic, amylolytic, cellulolytic or proteolytic activity, nor produced polysaccharide levan and toxin syringomycin; showed sensitivity to copper oxychloride ( $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), cuprous oxide ( $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), copper hydroxide ( $138.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), streptomycin sulfate ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and Agrimaicin 500 ( $428 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); and resistance to kasugamycin ( $87 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), agrimicin ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), erythromycin ( $15 \mu\text{g}$ ), gentamicin ( $10 \mu\text{g}$ ), amoxicilin ( $10 \mu\text{g}$ ), neomycin ( $30 \mu\text{g}$ ) streptomycin ( $10 \mu\text{g}$ ), norfloxacina ( $10 \mu\text{g}$ ) and rifampicin ( $5 \mu\text{g}$ ). With regard to tetracycline ( $30 \mu\text{g}$ ), variability was found among the 41 isolates, with 41.5% considered resistant, 46.3% moderately sensitive and 12.2% highly sensitive.

**Additional keywords:** fruit-blotch, *Cucumis melo*, *Citrullus lanatus*, physiological and biochemical characteristics.

## INTRODUÇÃO

A mancha-aquosa é a principal doença bacteriana da cultura do meloeiro (*Cucumis melo* L.) no Nordeste do

Brasil, sendo responsável por grandes perdas na produção e depreciação dos frutos no Rio Grande do Norte e Ceará. A doença é particularmente importante para a região, principal produtora e exportadora nacional de frutos de melão.

O agente causal da mancha-aquosa é *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*) Willems *et al.* (sin: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* Schaad *et al.*; *P. avenae* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*) Hu *et al.* Somodi *et al.* (1991) relataram pela primeira vez a diversidade dessa

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife PE. 2006.

bactéria ressaltando que os isolados obtidos nas epidemias de mancha-aquosa no fim da década de 80 eram diferentes do isolado tipo obtido em 1978 (Schaad *et al.*, 1978). Posteriormente, grupos distintos de *A. avenae* subsp. *citrulli* foram detectados por O'Brien & Martin (1999), Walcott *et al.* (2004) e Burdman *et al.* (2005), com base em características genéticas, bioquímicas, de patogenicidade e agressividade. De acordo com Wiebe *et al.* (2004), esta diversidade em populações de *A. avenae* subsp. *citrulli* favorece a adaptação à pressão de seleção exercida por ambiente desfavorável, introdução de cultivares resistentes e controle químico, dificultando o manejo da doença.

Trabalhos envolvendo a caracterização de isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* do Brasil quanto a componentes epidemiológicos (Silveira *et al.*, 2003), utilização de substratos como fonte de carbono (Walcott *et al.*, 2004) e reação de hipersensibilidade (Silveira *et al.*, 2003) já foram realizados. No entanto, pesquisas sobre esses aspectos e estudos em novas populações do patógeno na região Nordeste são necessárias para um melhor manejo da doença. Também não existem informações sobre os isolados do Brasil quanto à produção de enzimas, fitohormônios, polissacarídeos e toxinas.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* com base na severidade da doença em plântulas, plantas e frutos de meloeiro e melancia; reação de hipersensibilidade em fumo (*Nicotiana tabacum* L.); utilização de compostos como fonte de carbono e nitrogênio; produção de enzimas, fitohormônio, polissacarídeo e toxina; e sensibilidade *in vitro* a compostos cúpricos e antibióticos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Em todos os experimentos foram utilizados 41 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Fitobacteriologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Tabela 1). Quando necessário, as suspensões bacterianas foram ajustadas em fotocolorímetro (560 nm) à concentração de  $3,4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> de acordo com equação previamente estabelecida.

### Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* com base na severidade da mancha-aquosa

Para avaliar a severidade em plântulas, sementes de meloeiro tipo amarelo, híbrido AF-646 e de melancia 'Crimson Sweet' foram inoculadas individualmente com suspensão de cada isolado de *A. avenae* subsp. *citrulli* contendo Tween 20 (0,005%), pelo método de infiltração à vácuo (Mariano & Silveira, 2005). Decorridas 12 horas, as sementes foram plantadas em bandejas de poliestireno expandido contendo a mistura solo esterilizado: substrato Plantmax® (2:1 v:v), e mantidas em casa de vegetação a temperatura média de  $30 \pm 2$  °C. Após emergência, as plântulas foram submetidas à câmara úmida por 48 h. As plântulas foram avaliadas nove dias após o plantio quanto à

severidade, estimada com o auxílio de escala descritiva de 0 a 5 (Araújo *et al.*, 2005), sendo o índice de doença (IDO) calculado de acordo com McKinney (1923), pela fórmula  $IDO = \Sigma (\text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100 / (\text{n}^\circ \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})$ .

Para avaliação da severidade da mancha-aquosa em plantas, folhas definitivas de meloeiro tipo amarelo, híbrido AF-646 e de melancia 'Crimson Sweet' com 20 dias de cultivo em recipientes plásticos de 250 mL contendo a mistura solo esterilizado: substrato Plantmax® (2:1 v:v), foram pulverizadas com a suspensão de cada isolado contendo Tween 20 (0,005%). As plantas foram submetidas à câmara úmida por 48 h antes e após a inoculação, sendo mantidas em casa de vegetação ( $30 \pm 2$  °C). As plantas foram avaliadas cinco dias após a inoculação quanto à severidade, utilizando uma escala descritiva com notas variando de 0 a 6 (Silveira *et al.*, 2003), sendo calculado o IDO (McKinney, 1923).

A inoculação em frutos comerciais de melão e melancia foi realizada pelo método de injeção subepidérmica com suspensão de cada isolado de *A. avenae* subsp. *citrulli* (Somodi *et al.*, 1991). Os frutos foram submetidos à câmara úmida por 48 h e mantidos em incubadora a 30°C durante oito (melão) ou cinco dias (melancia), de acordo com ensaio preliminar. Os frutos foram avaliados quanto ao diâmetro da lesão externa (DLE) e profundidade da lesão (PL), medidos com o auxílio de um paquímetro.

Utilizou-se sempre o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída respectivamente por dez plântulas, duas folhas da planta ou três pontos de inoculação nos frutos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (P=0,05).

### Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* com base na reação de hipersensibilidade

A suspensão de cada um dos 41 isolados foi infiltrada nos espaços intercelulares da região contida entre duas nervuras laterais, na face dorsal de folhas expandidas de fumo 'NC-95'. Após a infiltração, as plantas foram mantidas em ambiente com baixa umidade relativa do ar. A avaliação foi realizada 24 h após o teste, sendo a reação de hipersensibilidade caracterizada por necrose e dessecamento do tecido na região infiltrada (Mariano & Silveira, 2005).

### Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* com base na utilização de compostos como fonte de carbono e nitrogênio

Uma porção do crescimento bacteriano foi depositado, com alça de platina, em tubos de ensaio com tampa de rosca contendo 4,5 mL de meio basal de clara (0,5 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1000 mL de água destilada) acrescido dos compostos asparagina, L-leucina ou DL-ácido láctico a 10%, adicionados, após filtração, ao meio autoclavado (Mariano & Silveira, 2005). Os isolados foram incubados a 30 °C e avaliados após 48 h quanto à

**TABELA 1** - Isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) da coleção de bactérias fitopatogênicas do laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE, utilizados nesse estudo

Isolados	Cucurbitácea	Fonte	Local de Origem
Aac1	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.5	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.12	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.31	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.35	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.36	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.37	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.39	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.40	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.43	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.45	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.49	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.50	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.70	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.71	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.72	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.73	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.78	Melão Amarelo	Fruto	Baraúna/RN
AacMP1	Melão Pepino	Fruto	Mossoró/RN
AacMP2	Melão Pepino	Fruto	Mossoró/RN
AacR2	Melão Charantais	Semente	Baraúna/RN
AacR3	Melão Amarelo	Semente	Baraúna/RN
AacR7	Melão Amarelo	Semente	Baraúna/RN
Aac4.9	Melão Orange	Fruto	Baraúna/RN
Aac5.1	Melão Pele de Sapo	Fruto	Baraúna/RN
Aac5.3	Melão Pele de Sapo	Fruto	Baraúna/RN
Aac5.16	Melão Pele de Sapo	Fruto	Baraúna/RN
Aac5.20	Melão Pele de Sapo	Fruto	Baraúna/RN
Aac5.28	Melão Pele de Sapo	Fruto	Baraúna/RN
Aac1.83	Melão	Fruto	Baraúna/RN
Aac1213	Melancia	Fruto	Presidente Prudente/SP
Aac1214	Melancia	Fruto	Presidente Prudente/SP
Aac180	Melancia	Fruto	Petrolina/PE
Aac1225	Melão	Fruto	Assú/RN
Aac1627	Melão	Semente	-
Aac1.84	Melão	Fruto	Baraúna/RN
Aac1521	Melão	Fruto	Baraúna/RN
Aac8	Melão	Semente	-
Aac14	Melão	Semente	-
Aac12	Melão	Semente	-
Aac9	Melão	Semente	-

turvação do meio, indicativo da utilização do aminoácido como única fonte de carbono e energia.

#### **Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* com base na produção de enzimas, fitohormônio, polissacarídeo e toxina**

Os isolados foram testados quanto à produção de enzimas pectinolíticas, amilolíticas, celulolíticas, lipolíticas e proteolíticas, através de métodos específicos (Cattelan, 1999; Mariano & Silveira, 2005). A depressão no meio de cultura foi o indicativo positivo para produção de enzimas pectinolíticas e a presença de halo claro ao redor das colônias

de *A. avenae* subsp. *citrulli* para as demais enzimas. No caso da atividade amilolítica o halo foi evidenciado após a adição de lugol. Para produção do polissacarídeo levana foi utilizado o método descrito por Mariano & Silveira (2005), sendo o resultado positivo indicado pela presença de colônias grandes, usualmente brancas, mucóides e elevadas.

Na determinação da produção do ácido indol-acético (AIA), um fitohormônio do grupo das auxinas, foi utilizado o método colorimétrico adaptado por Cattelan (1999). O resultado positivo foi caracterizado pela formação de halo avermelhado na membrana, no local correspondente à colônia. Na avaliação da produção da toxina siringomicina,

foi utilizado o método descrito por Sinden *et al.* (1971), sendo a supressão no crescimento de *Geotrichum candidum* Link ao redor da colônia bacteriana, indicativo do teste positivo.

### Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* com base na sensibilidade *in vitro* a cúpricos e antibióticos

Os produtos comerciais foram diluídos em 4,5 mL de ADE, agitados por três minutos em agitador tipo Vortex e adicionados ao meio ágar nutritivo-extrato de levedura-dextrose (NYDA) para atingir as seguintes concentrações: oxicloreto de cobre (120 µg mL<sup>-1</sup>); óxido cuproso (120 µg mL<sup>-1</sup>); hidróxido de cobre (138,2 µg mL<sup>-1</sup>); sulfato de estreptomicina (25 µg mL<sup>-1</sup>); kasugamicina (2% de cloridrato de kasugamicina) (87 µg mL<sup>-1</sup>); agrimaicin 500 (3% de oxitetraciclina e 50% de sulfato tribásico de cobre) (428 µg mL<sup>-1</sup>) e agrimicina (1,5% de oxitetraciclina e 15% de sulfato de estreptomicina) (200 µg mL<sup>-1</sup>). Os cúpricos foram adicionados ao meio antes de sua autoclavagem. Aliquotas de 5 µL das suspensões bacterianas foram depositadas em quatro pontos equidistantes da placa de Petri contendo NYDA suplementado com os produtos nas concentrações acima citadas. As placas foram mantidas a 30°C por 72 h. A avaliação foi realizada considerando-se como sensíveis isolados que não apresentaram crescimento confluyente.

Foram também testados os seguintes antibióticos em discos: amoxicilina (10 µg); eritromicina (15 µg); estreptomicina (10 µg); gentamicina (10 µg); neomicina (30 µg); norfloxacin (10 µg); rifampicina (5 µg) e tetraciclina (30 µg) através do método de difusão em ágar (Madigan *et al.*, 1997). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por um disco de antibiótico. A avaliação foi realizada através da medição do halo de inibição do crescimento bacteriano, em dois sentidos diametralmente opostos, com o auxílio de um paquímetro. Os isolados foram classificados em três grupos, de acordo com as reações de resistência (halo ≤ 14 mm), sensibilidade média (14 mm < halo < 20 mm) e sensibilidade alta (halo ≥ 20 mm), estabelecidos conforme valores médios dos halos de inibição referentes a cada antibiótico (Acar & Goldstein, 1986).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em plântulas e plantas de meloeiro e melanciaira todos os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* causaram sintomas típicos da mancha-aquosa, inclusive os de melão-pepino (*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud.) (AacMP1 e AacMP2) (Tabela 2). Foram constatadas diferenças significativas ( $P = 0,05$ ) entre os isolados quanto ao índice de doença, permitindo a separação em 5 e 7 grupos em plântulas, respectivamente para meloeiro e melanciaira, e em 2 grupos em plantas para as duas hospedeiras. Os índices variaram para meloeiro e melanciaira, respectivamente de 5 a 77% e 3,7 a 100% em plântulas e de 3,1 a 20,6% e 3,1 a 29%

em plantas (Tabela 2). O'Brien & Martin (1999) também obtiveram diferentes níveis de severidade da mancha-aquosa em plântulas para uma mesma cultivar de meloeiro ou de melanciaira quando inoculados com diferentes isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*.

Em plântulas de melanciaira, a média dos índices da mancha-aquosa dos três isolados provenientes de melanciaira foi de 97,7%, enquanto que os outros 36 isolados de meloeiro foram muito menos agressivos (média de índice de doença = 23,2%) (Tabela 2). O mesmo aconteceu, em menor escala, em plântulas de meloeiro, nas quais os isolados provenientes de meloeiro induziram índice médio de doença de 34,3% comparado aos 23,9% de melanciaira. Isto demonstrou uma certa especificidade patógeno-hospedeiro, também relatada por Burdman *et al.* (2005).

Uma menor agressividade da maioria dos isolados de meloeiro a plântulas de melanciaira observada neste trabalho pode explicar porque *A. avenae* subsp. *citrulli* ainda não foi assinalada em campos de produção de melancia no Nordeste, constituindo problema econômico apenas para meloeiro. Fato similar foi verificado com isolados de melanciaira em relação à cultura do meloeiro (O'Brien & Martin 1999; Walcott *et al.*, 2004). Contudo, a melanciaira é susceptível a isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* oriundos de melão, o que pode representar risco potencial em propriedades agrícolas produtoras de melão e melancia, prática frequentemente observada no pólo agrícola Mossoró-Baraúna.

Em frutos, todos os isolados foram patogênicos às duas culturas, sendo separados em 3 e 10 grupos para diâmetro da lesão externa e 2 e 9 grupos para profundidade da lesão em meloeiro e melanciaira, respectivamente, pela análise de agrupamento de Scott-Knott ( $P = 0,05$ ) (Tabela 2). Aos oito dias após inoculação, o diâmetro médio das lesões em frutos de meloeiro foi de 14,2 mm enquanto a profundidade média atingiu 13,7 mm. Em frutos de melanciaira, o diâmetro médio das lesões foi de 6,9 mm e a profundidade média atingiu 13,1 mm aos cinco dias após inoculação. Verificou-se que 97,6% dos isolados induziram maior PL do que DLE em frutos de melanciaira comparado a 53,7% em meloeiro. Em geral, frutos infectados naturalmente apresentam a polpa já bastante comprometida mesmo quando a lesão externa se mostra com apenas alguns centímetros de diâmetro (O'Brien & Martin, 1999).

Todos isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* avaliados induziram reação de hipersensibilidade em fumo. Na literatura existem controvérsias quanto à essa característica. Na descrição do isolado tipo, a subespécie não induz hipersensibilidade em fumo (Schaad *et al.*, 1978). Entretanto, reações positivas foram obtidas com isolados de melanciaira (Rane & Latin 1992; Somodi *et al.* 1991) e outros 20 isolados de meloeiro, incluídos no presente estudo (Silveira *et al.*, 2003).

Os compostos asparagina, L-leucina e DL- ácido láctico foram utilizados por todos os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* como fonte de carbono e energia. Walcott *et al.* (2004), estudando dois grupos geneticamente distintos

**TABELA 2** - Caracterização de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) com base na severidade da mancha-aquosa em plântulas, plantas e frutos de meloeiro e melanciaira

Isolados	Meloeiro					Melanciaira			
	Plântulas	Plantas	Frutos <sup>2</sup>		Plântulas	Plantas	Frutos		
	IDO <sup>1</sup> (%)	IDO (%)	DLE (mm)	PL (mm)	IDO (%)	IDO (%)	DLE (mm)	PL (mm)	
Aac1	32,4 b <sup>3</sup>	16,7 a	10,0 c	10,3 b	20,0 e	16,7 a	5,4 g	5,9 i	
Aac1.5	5,0 e	12,2 a	13,6 c	23,0 a	19,5 e	10,2 b	5,1 g	9,7 g	
Aac1.12	64,6 a	20,6 a	15,6 b	24,2 a	14,8 f	16,7 a	1,1 j	20,7 b	
Aac1.31	9,5 e	16,7 a	9,1 c	11,2 b	21,4 e	12,2 a	8,5 e	13,4 e	
Aac1.35	62,9 a	10,2 b	16,8 b	25,6 a	57,1 c	8,3 b	6,0 f	17,7 c	
Aac1.36	9,5 e	10,2 b	18,2 b	22,7 a	25,8 d	12,2 a	5,9 f	7,6 h	
Aac1.37	5,7 e	5,5 b	11,1 c	28,2 a	7,3 g	10,6 b	6,0 f	9,4 g	
Aac1.39	61,0 a	14,3 a	11,3 c	12,3 b	16,5 e	7,0 b	3,4 h	12,1 f	
Aac1.40	9,5 e	8,7 b	6,8 c	10,0 b	9,9 f	12,2 a	5,1 g	13,2 e	
Aac1.43	64,6 a	14,3 a	5,2 c	12,8 b	12,9 f	8,3 b	2,1 i	10,7 f	
Aac1.45	10,2 e	5,8 b	17,0 b	13,1 b	11,4 f	8,3 b	8,7 e	15,0 d	
Aac1.49	53,5 a	4,4 b	24,9 a	12,7 b	8,0 g	3,1 b	7,9 e	11,2 f	
Aac1.50	10,2 e	10,2 b	11,2 c	13,5 b	9,4 f	16,7 a	0,0 k	9,4 g	
Aac1.70	55,2 a	12,2 a	15,5 b	14,2 b	12,7 f	5,5 b	5,7 f	12,7 e	
Aac1.71	55,2 a	5,8 b	18,0 b	15,0 b	3,7 g	4,4 b	6,1 f	8,6 h	
Aac1.72	36,4 b	14,3 a	15,5 b	12,0 b	31,1 d	8,7 b	8,2 e	20,5 b	
Aac1.73	36,6 b	12,2 a	9,6 c	8,2 b	21,6 e	14,3 a	6,5 f	11,0 f	
Aac1.78	55,2 a	12,2 a	21,2 a	12,0 b	11,8 f	16,7 a	3,9 h	4,8 i	
AacMP1	37,3 b	8,7 b	20,9 a	19,0 a	63,3 b	10,2 b	3,7 h	18,6 c	
AacMP2	77,0 a	3,1 b	19,1 b	14,0 b	49,6 c	16,7 a	2,9 i	15,5 d	
AacR2	19,2 d	10,2 b	23,7 a	25,0 a	27,3 d	3,1 b	3,4 h	7,1 h	
AacR3	27,9 c	8,3 b	9,9 c	8,0 b	42,7 c	8,3 b	8,9 e	12,7 e	
AacR7	26,0 c	20,6 a	29,5 a	23,5 a	13,0 f	16,7 a	10,0 d	13,6 e	
Aac4.9	56,3 a	16,7 a	8,8 c	8,9 b	70,1 b	4,4 b	7,5 e	14,7 d	
Aac5.1	34,2 b	16,7 a	18,0 b	21,2 a	28,8 d	7,0 b	7,7 e	9,5 g	
Aac5.3	18,2 d	16,7 a	4,7 c	2,9 b	13,6 f	14,3 a	2,9 i	13,2 e	
Aac5.16	6,4 e	14,3 a	14,4 b	9,9 b	17,6 e	16,7 a	8,6 e	11,2 f	
Aac5.20	43,4 b	5,5 b	13,0 c	11,3 b	15,2 f	5,8 b	3,4 h	15,0 d	
Aac5.28	43,6 b	8,3 b	13,1 c	8,6 b	16,8 e	14,3 a	6,0 f	13,2 e	
Aac1.83	64,6 a	16,7 a	17,9 b	8,5 b	53,8 c	7,0 b	13,7 b	19,7 b	
Aac1213	27,9 c	8,3 b	11,7 c	5,9 b	100,0 a	16,7 a	15,0 a	19,7 b	
Aac1214	16,0 d	3,1 b	14,2 b	8,3 b	100,0 a	29,0 a	11,2 c	18,7 c	
Aac180	27,9 c	5,5 b	7,9 c	14,0 b	93,2 a	24,7 a	14,7 a	25,0 a	
Aac1225	5,0 e	8,7 b	16,5 b	13,0 b	10,0 f	10,2 b	6,0 f	16,6 d	
Aac1627	18,9 d	14,3 a	6,2 c	4,0 b	22,9 e	8,7 b	4,7 g	11,2 f	
Aac1.84	15,4 d	10,2 b	21,1 a	16,0 b	63,8 b	12,2 a	5,9 f	16,0 d	
Aac1521	17,3 d	12,2 a	13,0 c	14,5 b	11,0 f	12,2 a	6,6 f	7,7 h	
Aac8	56,3 a	8,7 b	8,0 c	12,9 b	11,8 f	8,7 b	11,9 c	8,2 h	
Aac14	61,0 a	8,3 b	17,1 b	9,6 b	53,2 c	4,4 b	9,5 d	10,0 g	
Aac12	49,0 a	12,2 a	11,0 c	10,6 b	26,5 d	7,0 b	13,5 b	13,5 e	
Aac9	33,4 b	8,7 b	13,7 c	11,3 b	23,1 e	12,2 a	10,2 d	14,2 e	
C.V. (%)	14,9	26,4	10,3	11,6	12,6	27,6	2,4	2,4	

<sup>1</sup> IDO - Índice de doença aos nove dias após o plantio (plântulas) ou cinco dias após a inoculação (plantas), calculado de acordo com McKINNEY (1923), utilizando-se os dados de severidade da doença, estimada com o auxílio de escalas descritivas (Araújo *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2003).

<sup>2</sup> DLE e PL - respectivamente, diâmetro da lesão externa e profundidade da lesão em fruto, aos oito (melão) e cinco dias (melancia) após a inoculação.

<sup>3</sup> Médias seguidas da mesma letra, no sentido vertical, não diferem significativamente entre si (P = 0,05) pelo teste de Scott-Knott.

de *A. avenae* subsp. *citrulli* quanto à utilização de carboidratos, utilizando o sistema BIOLOG<sup>®</sup>, verificaram que os isolados do Brasil Aac1 (AAC201-21), Aac1.5 (AAC201-23), Aac1.12 (AAC201-22) e AacR2 (AAC201-24) pertencem ao Grupo I de similaridade genética. Todos esses isolados utilizaram asparagina, apenas Aac R2 não utilizou o DL- ácido láctico e nenhum deles L-leucina (Ron R. Walcott, comunicação pessoal). O resultado diferente constatado no presente trabalho em relação a esses isolados pode ter ocorrido em função do método utilizado. O'Brien & Martin (1999) e Burdman *et al.* (2005) também verificaram diferenças entre isolados dessa bactéria quanto à utilização de L-leucina. Segundo esses últimos autores, L-leucina pode ser utilizada para separar isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* de melancieira (L-leucina positivo) de outras cucurbitáceas (L-leucina negativo), o que difere do constatado na presente pesquisa.

Todos os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* produziram enzimas lipolíticas e ácido indol-acético. Atividade lipolítica foi citada por Schaad *et al.* (1978) na descrição do isolado tipo da subespécie e verificada de maneira geral para os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* (Somodi *et al.*, 1991). Contudo, não há referência na literatura sobre a produção do fitohormônio por esta bactéria. Segundo Pascholati (1995), o papel das substâncias de crescimento produzidas por patógenos ainda não é bem compreendido.

A produção de enzimas celulolíticas, pectinolíticas, amilolíticas ou proteolíticas não foi detectada nos 41 isolados testados. Burdman *et al.* (2005), testando 12 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* de meloeiro e melancieira oriundos de Israel, verificaram que nenhum produziu enzimas amilolíticas, mas divergindo dos resultados obtidos nessa pesquisa, pois todos apresentaram atividade celulolítica e fraca atividade pectinolítica e proteolítica.

Segundo Rudolph (1995), a levana está envolvida no congestionamento de água nos espaços intercelulares dos tecidos infectados das plantas, promovendo o sintoma de encharcamento, porém parece não estar presente neste patossistema uma vez que esse não foi produzido por *A. avenae* subsp. *citrulli*, estando de acordo com os resultados obtidos por Melo *et al.* (2004) em relação a 12 isolados dessa bactéria oriundos de meloeiro.

Nenhum isolado produziu siringomicina, desde que esta toxina é comumente produzida por patovares de *Pseudomonas syringae* van Hall (Bender, 1999). No entanto, bactérias fluorescentes também podem ser isoladas de lesões similares as da mancha-aquosa (Rosa L.R. Mariano, comunicação pessoal; Somodi *et al.*, 1991) e com base nos resultados do presente trabalho, além da produção de fluorescência em meio de King B, a produção de siringomicina pode auxiliar na diferenciação entre *A. avenae* subsp. *citrulli* e *P. syringae*. A siringomicina tem propriedades antibacterianas, antifúngicas e fitotóxicas e apesar de não ter sido produzida pelos isolados de

*A. avenae* subsp. *citrulli* testados, Hu & Young (1998) relataram que alguns isolados dessa bactéria produziram substâncias com atividade antifúngica variando de nula a positiva contra *Rhodotorula mucilaginosa* Harrison.

Todos os isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* foram sensíveis a oxiclreto de cobre (120 µg mL<sup>-1</sup>), óxido cuproso (120 µg mL<sup>-1</sup>), hidróxido de cobre (138,2 µg mL<sup>-1</sup>), sulfato de estreptomicina (25 µg mL<sup>-1</sup>) e Agrimaicin (428 µg mL<sup>-1</sup>), e resistentes a kasugamicina (87 µg mL<sup>-1</sup>) e agrimicina (200 µg mL<sup>-1</sup>). Sales Júnior *et al.* (2005) utilizando concentrações diferentes dos produtos, relataram a eficiência de kasugamicina (700 ppm) na inibição *in vitro* do crescimento de *A. avenae* subsp. *citrulli*, e de oxiclreto de cobre (1250 ppm), kasugamicina (70 ppm), kasugamicina + oxiclreto de cobre (40+1250 ppm) e sal de oxitetraclina (82 ppm) na redução da incidência da mancha-aquosa em frutos no campo. Walcott *et al.* (2004) verificaram que isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* de meloeiro e melancieira, provenientes de vários países, apresentaram sensibilidade diferente ao sulfato de cobre. Os isolados de meloeiro oriundos do Rio Grande do Norte-Brasil Aac1.5, Aac1.12 e AacR2 foram resistentes ao produto e Aac1 foi sensível.

A detecção da sensibilidade dos isolados a maioria dos produtos testados é importante para a eficiência do controle da mancha-aquosa, uma vez que se recomenda para o tratamento de sementes: estreptomicina por 16 h (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) (Sowell & Schaad, 1979); sulfato de estreptomicina 0,1% por 30 min; sulfato de estreptomicina 0,1% + solução salina 1,5% por 30 min (Moraes *et al.*, 2002); acibenzolar-S-methyl (Bion) 0,01%, sulfato de estreptomicina 0,1%, kasugamicina 0,1% e oxiclreto de cobre 0,5%, isoladamente ou em mistura por 30 min (Silva Neto *et al.*, 2003). Aplicações quinzenais ou semanais com fungicidas cúpricos, iniciando-se antes ou durante a floração, e se prolongando até a maturação dos frutos, são indicadas para reduzir as perdas associadas à doença no campo (Walcott *et al.*, 2001).

Baseado na classificação de Acar & Goldstein (1986) todos isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* apresentaram resistência aos antibióticos eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), amoxicilina (10 µg), neomicina (30 µg), estreptomicina (10 µg), norfloxacin (10 µg) e rifampicina (5 µg). Burdman *et al.* (2005) verificaram que isolados dessa bactéria oriundos de meloeiro foram sensíveis a rifampicina (40 µg mL<sup>-1</sup>) enquanto isolados de melancieira foram resistentes, podendo esse teste ser utilizado para diferenciar isolados das duas culturas. No presente estudo, porém, não foi possível separar isolados de meloeiro e melancieira com base nesta característica.

Foi constatada variabilidade entre os 41 isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* quanto a sensibilidade à tetraciclina (30 µg), sendo 41,5% resistentes, 46,3% moderadamente sensíveis e 12,2% altamente sensíveis. Embora os isolados tenham apresentado características diferentes quanto à sensibilidade à tetraciclina, todos

foram sensíveis a Agrimaicin (428 µg mL<sup>-1</sup>), que contém tetraciclina na forma de oxitetraciclina em sua composição.

De acordo com os resultados obtidos, em trabalhos futuros o teste de patogenicidade em plântulas de melancia pode ser utilizado para caracterizar isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli* de meloeiro e melancia. Além disso, a patogenicidade em plantas e frutos de meloeiro e melancia e sensibilidade *in vitro* à tetraciclina também podem ser considerados indicadores de variabilidade.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc 551.198/2002-8) e Fundação de Amparo à Ciência e tecnologia do Estado do Pernambuco (FACEPE, APQ 23-CAG-03/ 2001-01/01-24) pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACAR, J.F. & GOLDSTEIN, F.W. Disk susceptibility test. In: Rorian, V. (Ed.) Antibiotics in laboratory medicine. London. Williams & Wilkins. 1986. v.1, pp.27-62.
- ARAÚJO, D.V., MARIANO, R.L.R. & MICHEREFF, S.J. Métodos de inoculação de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em melão. *Summa Phytopathologica* 31:69-73. 2005.
- BENDER, C.L., ALARCON, C.F. & GROSS, D.C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation and biosynthesis by peptide and polyketide syntheses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:226-292. 1999.
- BURDMAN, S., KOTS, N., KRITZMAN, G. & KOLEPOWITZ, J. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. *Plant Disease* 89:1339-1347. 2005.
- CATELLAN, A.J. Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Londrina. EMBRAPA Soja. 1999.
- HU, F.P. & YOUNG, J.M. Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology* 84:263-271. 1998.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. & PARKER, J. Brock biology of microorganisms. 8th ed. New Jersey. Prentice Hall. 1997.
- MARIANO, R.L.R. & SILVEIRA, E.B. (Coords.). Manual de práticas em Fitobacteriologia. 2.ed. Recife: UFRPE, 2005.
- McKINNEY, R.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research* 6:195-218. 1923.
- MELO, L.A., MENDES, A.P., SANTOS, J.P. & MARQUES, A.S.A. Mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*: caracterização de isolados. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 24p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 70).
- MORAES, I.S.F., MEDEIROS, F.H.V., MARIANO, R.L.R. & VIANA, I. O. Proteção de plantas de melão contra *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* mediada por *Bacillus* spp. *Fitopatologia Brasileira* 27 (Supl.):65-66. 2002.
- 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.
- PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: Arsenal Enzimático. In: Bergamin Filho, A., Amorim, L. & Kimati, H. (Eds). *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*. 3. ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 1995. v.1. pp. 343-364.
- RANE, K.K. & LATIN, R.X. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. *Plant Disease* 76:509-512. 1992.
- RUDOLPH, K.W.E. *Pseudomonas syringae* pathovars. In: Singh, V.S., Singh, R.P. & Kohmoto, K. (Eds.). Pathogenesis and host specificity in plant disease: Histopathological, Biochemical, Genetic and molecular bases. Oxford. Elsevier Science. v.1. 1995. pp. 47-138.
- SALES JÚNIOR, R., OLIVEIRA, I.S., MARIANO, R.L.R., SILVA, G.F. & NUNES, G.H.S. Efeito de kasugamicina e oxicleto de cobre no controle da mancha-aquosa do meloeiro. *Fitopatologia Brasileira* 30:295-298. 2005.
- SCHAAD, N.W., SOWELL, G., GOTH, R.W., COLWELL, R.R. & WEBB, R.E. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28:117-125. 1978.
- SILVA NETO, E.B. MEDEIROS, F.H.V.; MARIANO, R.L.R. & SILVEIRA, E.B. Controle químico da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes. *Fitopatologia Brasileira* 28 (Supl.):340. 2003.
- SILVEIRA, E.B., MARIANO, R.L.R. & MICHEREFF, S.J. Variabilidade de isolados de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* provenientes de melão produzido no estado do Rio Grande do Norte. *Summa Phytopathologica* 29:255-261. 2003.
- SINDEN, S., DEVAY, J. & BACKMAN, P. Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae* and its role in the bacterial canker disease in peach tree. *Physiology Plant Pathology* 1:199-213. 1971.
- SOMODI, G.C., JONES, J.B., HOPKINS, D.L., STALL, R.E., KUCHAREK, T.A., HODGE, N.C. & WATTERSON, J.C. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. *Plant Disease* 75:1053-1056. 1991.
- SOWELL, G. & SCHAAD, N.W. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon: seed transmission and resistance of plant introductions. *Plant Disease Reporter* 63:437-441. 1979.
- WALCOTT, R.R., FESSEHAIE, A. & CASTRO, A.C. Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on cucurbit hosts. *Journal of Phytopathology* 152:277-285. 2004.

WALCOTT, R.R., LANGSTON, D., GITAITIS, R., GAY, D., HOPKINS, D., KUCHAREK, T., LATIN, R., EGEL, D., COOK, K., KEINATH, A. & LOVIC, B. Guidelines for managing bacterial fruit blotch disease. Georgia. 2001. Disponível em: <<http://www.tifton.uga.edu/veg/Alerts.htm>>. Acesso em: 18 jan. 2006.

WIEBE, W.L., HOPKINS, D.L. & WALCOTT, R.R. Bacterial Fruit Blotch - Questions and answers with the experts. **Bulletin**, 2004. 12 p. Disponível em: <<http://www.seedquest.com/vegetables/watermelon/pdf/bfb.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2006.

---

*Recebido 3 Maio 2006 – Aceito 28 Dezembro 2007 – FB 6050*