

Crestamento foliar, nova sintomatologia em algodoeiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Valdemar Atilio Malavolta Jr.¹, Suzete Aparecida Lanza Destéfano², Luís Otávio Saggion Beriam²,
Maria Angélica Pizzinatto¹, Edivaldo Cia¹

¹Instituto Agrônomo/APTA, Caixa Postal 28, 13001-970, Campinas, SP; ²Instituto Biológico/APTA, Campinas, SP.

Autor para correspondência: Valdemar A. Malavolta Jr.

Data de chegada: 16/05/2006. Aceito para publicação em: 11/01/2008

1364

RESUMO

Malavolta Júnior, V.A.; Destéfano, S. A. L.; Beriam; L. O. S.; Pizzinatto, M.A.; Cia, E. Crestamento foliar, nova sintomatologia em algodoeiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.2, p.168-171, 2008

Foi observada recentemente no Estado de São Paulo uma nova sintomatologia em algodoeiro cv. Makina, IAC 24 e Deltaopal, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), denominada "crestamento foliar". Caracteriza-se por crestamento foliar, geralmente acompanhado por halo clorótico, podendo também causar sintomas de "V" invertido, a partir dos bordos foliares. Linhagens de

Xam foram comparadas, por meio de testes de patogenicidade, bioquímicos, sorológicos, culturais e PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S DNAr. Independentemente do tipo de sintoma, as linhagens apresentaram características e perfis idênticos aos apresentados pela linhagem tipo, confirmando a identidade dos isolados como *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.

Palavras-chave adicionais: bacteriose em algodoeiro, *Gossypium hirsutum*

ABSTRACT

Malavolta Júnior, V.A.; Destéfano, S. A. L.; Beriam; L. O. S.; Pizzinatto, M.A.; Cia, E. Cotton leaf blight, a new symptomatology caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.2, p.168-171, 2008

Recently a new symptomatology on cotton plants (cv. Makina, IAC 24 and Deltaopal) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) was observed in São Paulo state, Brazil, and named "bacterial leaf blight". The symptom was characterized by leaf blight, generally exhibiting chlorotic haloes and sometimes showing V-shaped lesions beginning at the leaves' border. Strains of

Xam responsible for typical angular leaf spots and bacterial leaf blight were compared through pathological, biochemical, serological, cultural and RFLP-PCR tests of the 16S-23S spacer region. Independently of the symptom type, the strains exhibited characteristics and profiles that were identical to those exhibited by the type strain, which confirms the isolates identity *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*

Additional keywords: cotton bacteriosis, *Gossypium hirsutum*.

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) ocorre nas principais regiões produtoras de algodão de nosso país, e é responsável por danos econômicos à cultura, afetando capulhos, caule, ramos e folhas. Nas folhas, os sintomas ocasionados são caracterizados como manchas angulares e necrose das nervuras (1, 2, 8). Recentemente, foi observado em cultivo de algodoeiro (cvs. Makina, IAC e Deltaopal) localizado no Centro Experimental de Campinas, IAC, no Estado de São Paulo, sintomas de crestamento foliar similares àqueles causados por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Verticillium* (6). Essa sintomatologia geralmente é acompanhada por halo clorótico, podendo também causar sintomas de "V" invertido, a partir dos bordos foliares, com a penetração da bactéria provavelmente via hidatódios. A região afetada torna-se quebradiça e pardacenta, havendo abscisão das folhas severamente atacadas. Dos materiais coletados foram isoladas bactérias do gênero *Xanthomonas*.

Face à constatação dessa nova sintomatologia, este estudo teve por objetivo confirmar a caracterização das bactérias isoladas de folhas

de algodoeiro com sintomas de crestamento foliar, por meio de testes de patogenicidade, bioquímicos, culturais, sorológicos, moleculares (PCR-RFLP da região espaçadora 16S-23S DNAr) e de sensibilidade "in vitro" a antibióticos de uso agrícola.

Quatro linhagens isoladas de folhas de algodoeiro, sendo duas provenientes de lesões angulares características (IBSBF 1912 e 2003) e duas provenientes de sintomas em "V" invertido e crestamento foliar (IBSBF 1911 e 1913) foram comparadas com a linhagem patotipo de Xam (IBSBF-1773^p). Os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação e laboratórios do Instituto Agrônomo e do Instituto Biológico, localizados em Campinas, SP.

Nos testes de patogenicidade, foram utilizadas plantas de algodoeiro das cultivares Deltaopal, IAC 24 e Makina, com 20 dias de idade. Essas cultivares diferem quanto à resistência a Xam, sendo consideradas, respectivamente, como resistente, moderadamente resistente e suscetível. Para cada um dos tratamentos (linhagem bacteriana, cultivar e método de inoculação) foram utilizadas plantas

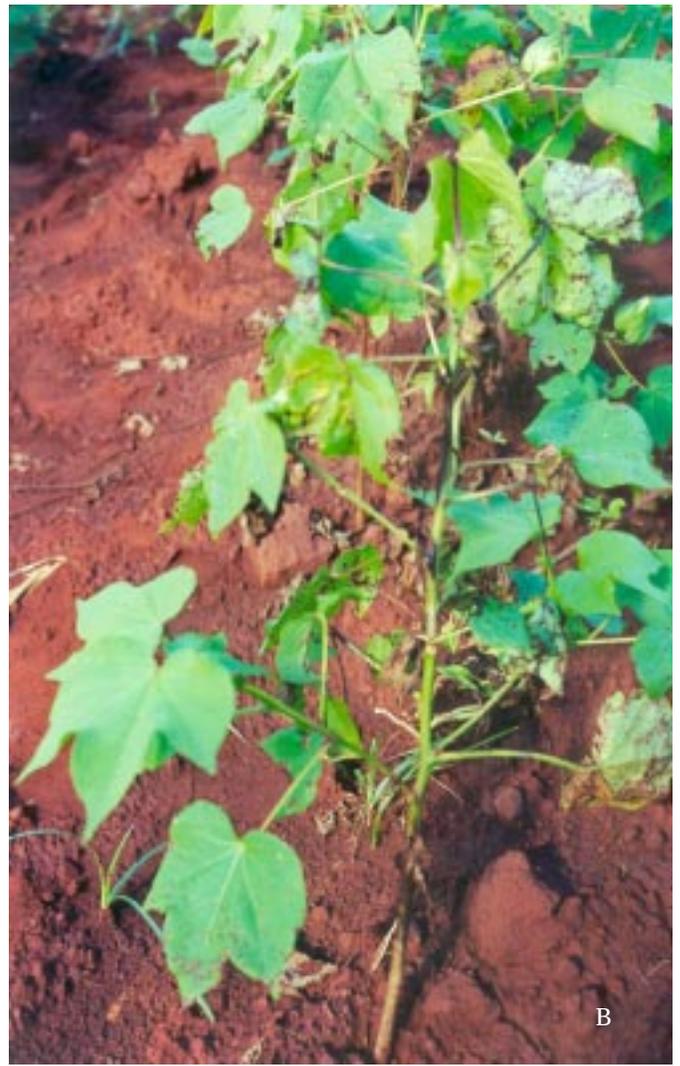


Figura 1. Sintomas de crestamento foliar em algodoeiro causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (A. Inoculação artificial; B. Infecção natural)

contidas em três vasos, cada qual com 3-4 mudas. Folhas totalmente expandidas destas cultivares foram inoculadas, separadamente, por meio de ferimentos por agulhas múltiplas previamente mergulhadas em suspensão bacteriana (5×10^8 UFC/mL) ou por pulverização foliar com pressão de $1,0 \text{ kgf/cm}^2$, até o ponto de escorrimento, utilizando uma suspensão de 10^7 UFC/mL, sem entretanto causar anasarca dos tecidos foliares. Plantas controle foram tratadas com água destilada esterilizada. O material inoculado foi mantido em casa-de-vegetação, sob câmara úmida durante 72 h. As linhagens empregadas (IBSBF 1911, 1912, 1913 e 2003) foram capazes de reproduzir tanto os sintomas típicos de mancha angular como os de crestamento foliar, independentemente da resistência genética do hospedeiro.

Os testes bioquímicos e culturais foram conduzidos segundo metodologia descrita por Schaad et al. (7), para o gênero *Xanthomonas*. Os resultados desses testes permitiram confirmar a identificação dos isolados de algodoeiro, originários de lesões angulares e lesões em "V", como pertencentes ao gênero *Xanthomonas*, e estão sumarizados na TABELA 1.

Suspensões bacterianas em solução salina das linhagens constantes da TABELA 1 foram testadas como antígenos em ensaios sorológicos de dupla difusão em ágar contra antissoro policlonal produzido para a linhagem IBSBF-1881 de *X. a. pv. malvacearum*, pertencente à coleção

de antissoros do Instituto Biológico. As suspensões também foram testadas contra soro normal, controle negativo das reações sorológicas. Os resultados desses testes mostraram reação de identidade total entre as linhagens causadoras de lesões angulares típicas, aquelas causadoras de sintomas de crestamento foliar e a linhagem patotipo de Xam.

Além das linhagens IBSBF 1911, 1912, 1913 e 2003 isoladas de algodoeiro, as linhagens tipo de *X. c. pv. campestris* (IBSBF-1163^T), *X. a. pv. axonopodis* (IBSBF-1444^T) e a patotipo de *X. a. pv. malvacearum* (TABELA 1), foram incluídas para fins comparativos nos experimentos de amplificação por PCR. As extrações de DNAs foram efetuadas de acordo com Pitcher et al. (5) e os experimentos de amplificação da região espaçadora 16S-23S DNAr, de acordo com Destéfano & Rodrigues Neto (3). Os produtos de PCR obtidos foram digeridos com as seguintes enzimas de restrição: Afa I, Alu I, Dde I, Hae III e Hpa II. A observação dos perfis de restrição foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 3%. Os géis foram tratados com brometo de etídeo (10 mg/mL), visualizados sob luz U.V. e fotografados em sistema digital. A amplificação da região espaçadora produziu um único fragmento de aproximadamente 1 kb para todas as linhagens testadas. As digestões dos produtos de PCR com Afa I geraram fragmentos de 500 e 490 pares de bases (pb); com Alu I, os fragmentos obtidos foram de aproximadamente 260, 210, 120 e 100 pb. Nas

TABELA 1. Linhagens bacterianas e resultados dos testes comparativos entre isolados de algodoeiro, *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *axonopodis* (Xaa).

TESTES								
Bactéria	Xam	Xam	Xam	Xam	Xam	Xam	Xaa	Xcc
Número de Acesso IBSBF	1733 ^P	1881	1911	1912	1913	2003	1444 ^T	1163 ^T
Acesso em outras coleções	ICMP-5739						ATCC-19312	ATCC-33913
Hospedeiro	Gossypium sp.	Gossypium hirsutum	Gossypium hirsutum	Gossypium hirsutum	Gossypium hirsutum	Gossypium hirsutum	Axonopus scopanicus	Brassica oleracea var. gemmifera
Origem	Sudão	Brasil (SP)	Colômbia	Reino Unido				
O/F	Oxidativo	NR	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo	NR	NR
Reação de Gram	- ¹	NR	-	-	-	-	NR	NR
Oxidase	-	NR	-	-	-	-	NR	NR
Catalase	-	NR	-	-	-	-	NR	NR
Uréase	-	NR	-	-	-	-	NR	NR
Produção de ácido a partir dos carboidratos								
D(-) arabinose, celobiose, frutose,	+ ²	NR	+	+	+	+	NR	NR
D(+) galactose, manose, D(+) trealose								
Dulcitol, á-m-D-glicoside, m-inositol,	-	NR	-	-	-	-	NR	NR
rhamnose, salicina, D(-) sorbitol								
Utilização de ácidos orgânicos								
Acetato, citrato, succinato	+	NR	+	+	+	+	NR	NR
Oxalato, tartarato	-	NR	-	-	-	-	NR	NR

^T - Linhagem Tipo, ^P - Linhagem Patotipo, IBSBF - Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, Campinas, SP, ATCC - American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA

ICMP - International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand

¹ - resultado positivo; ² - resultado negativo, NR não realizado

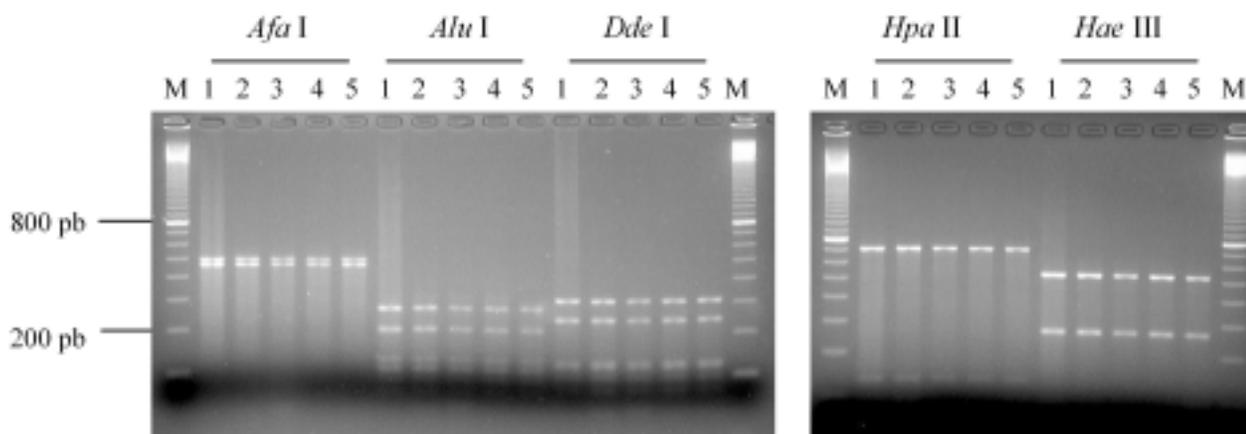


Figura 2. Digestão dos produtos de amplificação da região espaçadora 16S-23S com diferentes enzimas de restrição. (M) marcador de peso molecular de 100 pb (Amersham Biosciences); (1 a 5) IBSBF 1733^P, IBSBF 1911, IBSBF 1912, IBSBF 1913 e IBSBF 2003.

digestões com Dde I, os fragmentos foram de 310, 240, 120 e 100 pb. Hpa II e Hae III produziram fragmentos de 700 e 130 pb; e 510 e 280 pb, respectivamente (Figura 2). Em todos os casos, as linhagens IBSBF 1911, 1912, 1913 e 2003 isoladas de algodoeiro apresentaram perfis idênticos aos apresentados pela linhagem patotipo de *X. a. pv. malvacearum* (IBSBF 1733^P).

Nos testes para avaliação de sensibilidade a antibióticos foram utilizadas as linhagens IBSBF 1911, 1912, 1913 e 2003 e os seguintes produtos, diretamente incorporados ao meio NA: 1) sulfato de estreptomicina a 15% + oxitetraciclina a 1,5%; 2) oxitetraciclina a 3% + sulfato de cobre tribásico a 40%; 3) oxitetraciclina a 20%; e 4) kasugamicina a 2%, nas concentrações de 100, 250 e 500 ppm

de princípio ativo. Quatro placas por tratamento/concentração com os diferentes antibióticos foram semeadas, separadamente, utilizando-se 0,1 mL das suspensões bacterianas de cada linhagem (ca. 10⁸ UFC/mL). Placas-testemunha não receberam nenhum produto. Leituras foram realizadas diariamente até 10 dias após o plaqueamento, sendo avaliado o crescimento ou não de colônias bacterianas. As quatro linhagens avaliadas mostraram-se sensíveis aos produtos e às dosagens empregadas. Entretanto, considerando a existência de relatos de resistência natural a antibióticos em *X. a. pv. malvacearum*, entre eles a estreptomicina e a oxitetraciclina, já descritos desde a década de 60 (1, 2, 4), e que em outros países antibióticos vêm sendo empregados no controle de *X. a. pv.*

malvacearum, tanto no tratamento de sementes quanto em pulverização de plantas, deve-se tomar precauções para evitar seleção de populações bacterianas resistentes.

Com base nos resultados dos testes de patogenicidade, bioquímicos, culturais, sorológicos e moleculares efetuados, confirma-se a identidade dos isolados como *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em algodoeiro, causando sintomas de crestamento foliar, além da usual mancha angular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brinkerhoff, L.A. Variability of *Xanthomonas malvacearum*: the cotton bacterial blight pathogen. Stillwater: Oklahoma State University, 1963. 95p. (Technical Bulletin T-98).
2. Brinkerhoff, L.A. Variation in *Xanthomonas malvacearum* and its relation to control. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v.8, p.85-110, 1970.
3. Destéfano, S.A.L ; Rodrigues Neto, J. Rapid differentiation of *Xanthomonas* strains causing disease in citrus plants based on polymerase chain reaction-amplified ribosomal dna spacer polymorphisms. Summa Phytopathologica, v.28, n.2, p.167-172, 2002.
4. Nafade, S.D.; Verma, J.P. Drug resistant mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. Indian Phytopathology, New Delhi, v.38, p.74-80, 1985.
5. Pitcher, D.G.; Saunders, N.A., Owen, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters of Applied Microbiology, Oxford, v.8, p.151-156, 1989.
6. Pizzinatto, M.A.; Malavolta Jr., V.A.; Cia, E. Crestamento foliar em algodão, novo sintoma causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. Summa Phytopathologica, Botucatu, v.30, p.128, 2004.
7. Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Lacy, G.H. *Xanthomonas*. In: Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Chun, W. (Eds.). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3th, Saint Paul: The American Phytopathological Society, 2001. p.175-200.
8. Smith, E.F. The angular leaf-spot of cotton. In: Bacterial diseases of plants. Philadelphia: W.B. Saunders, , 1920. p.314-339.