



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

ÁREA DE MICROBIOLOGIA

**Programa de Iniciação Científica**

**Relatório Final das Atividades**

TÍTULO DO PROJETO

CONTROLE DE *Acidovorax citrulli*, AGENTE CAUSAL DA MANCHA  
AQUOSA DO MELOEIRO

TÍTULO DO PLANO DE TRABALHO

**SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE PLANTAS DA CAATINGA  
PARA O CONTROLE DE *Acidovorax citrulli* EM PLÂNTULAS E  
PLANTAS DE MELOEIRO**

Recife, PE  
AGOSTO/2021

## SUMÁRIO

<b>1. IDENTIFICAÇÃO</b> .....	3
<b>2. RESUMO</b> .....	3
<b>3. INTRODUÇÃO</b> .....	4
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	7
4.1 Geral.....	7
4.2 Específicos.....	7
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	8
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	11
<b>7. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO</b> .....	17
<b>8. CONSIDERAÇÕES PARCIAIS</b> .....	18
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	18
<b>10. DIFICULDADES ENCONTRADAS</b> .....	24
<b>11. PARECER DO ORIENTADOR</b> .....	25

## 1. IDENTIFICAÇÃO

ALUNO (A): Marcelle Andressa da Silva Ferreira

CURSO: Agronomia

PROGRAMA: (  ) PIBIC (  ) PIC (  ) PIBIC-EM

ORIENTADOR (A): Elineide Barbosa de Souza

DEPARTAMENTO/UNIDADE ACADÊMICA: Biologia/Microbiologia

RELATÓRIO: (  ) PARCIAL (  ) FINAL

## 2. TÍTULO DO PROJETO

Controle de *Acidovorax citrulli*, agente causal da mancha aquosa do meloeiro

### TÍTULO DO PLANO DE TRABALHO

Seleção de microrganismos de plantas da caatinga para o controle de *Acidovorax citrulli* em plântulas e plantas de meloeiro

## 3. RESUMO

A mancha aquosa causada por *Acidovorax citrulli* é uma importante doença bacteriana para a cultura do meloeiro no Nordeste do Brasil. O objetivo da pesquisa foi testar a eficiência de microrganismos obtidos de plantas da Caatinga no controle de *A. citrulli* pelos métodos de tratamento de sementes e plântulas de meloeiro. Foram utilizados 48 isolados de microrganismos obtidos de plantas da Caatinga, sendo 33 bactérias e 15 leveduras, recuperados da Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM) do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE e um isolado da bactéria fitopatogênica *A. citrulli*. Nos testes de seleção, pelo tratamento de sementes para a inibição da transmissão do patógeno e por pulverização de plântulas para controle da doença, não foi possível realizar a seleção. Uma vez que os resultados foram prejudicados, principalmente, pelas condições ambientais, devido a valores altos de temperatura e também baixos, o que inibiu o aparecimento de sintomas e diminuiu a severidade da doença nas plantas, principalmente a testemunha positiva durante a realização dos experimentos.

#### 4. INTRODUÇÃO

Segundo Whetzel citado por Kimati e Bergamim Filho (1995), doença em planta consiste de uma atividade fisiológica injuriosa, causada pela irritação contínua provocada por fator causal primário, exibida através de atividade celular anormal e expressa através de condições patológicas características, chamadas sintomas. Portanto, é um processo dinâmico no qual o hospedeiro (planta) e o agente causal, denominado de patógeno (fungos, bactérias, vírus, etc.), em íntima relação com o ambiente, se influenciam mutuamente, resultando modificações morfológicas e fisiológicas. A interação dos fatores patógeno, hospedeiro e ambiente é essencial para a ocorrência de doenças em plantas. Entretanto, a severidade das doenças infecciosas pode ser maior ou menor, dependendo de outros fatores que compõem os vértices do triângulo.

O sintoma de manchas são mais comuns em folhas, mas também podem ocorrer em flores, frutos ou ramos, e são resultantes da morte dos tecidos que se tornam secos e pardos, como é o caso da mancha aquosa do meloeiro (*Cucumis melo* L.). Essa doença é causada pela bactéria *Acidovorax citrulli* (Schaad *et al.*) Schaad *et al.* uma bactéria Gram negativa, na forma de bastonete, aeróbia e móvel por um flagelo polar. Apresenta bom crescimento em meio de cultura de rotina como ágar nutritivo - extrato de levedura - dextrose (NYDA), onde forma colônias pequenas com 0,7 a 1,0 mm, brancas ou cremes, e não fluoresce em meio King B (SCHAAD *et al.*, 1978). Possui reações positivas para os testes de catalase, oxidase, urease e lipase e não hidrolisa a arginina (SCHAAD *et al.*, 1978). Utiliza os carboidratos fermentáveis glucose, galactose, ramnose, sacarose, lactose, maltose, amido, inulina, manitol, dulcitol, sorbitol e salicina (CAVALCANTI *et al.*, 2005; SCHAAD *et al.*, 1978). Cresce a temperatura de 41°C, mas não a 4°C, com máximo desenvolvimento a 35°C; na faixa de pH de 5,0 a 9,0, com máximo em pH 7,0; e nas concentrações de 1, 2, 3 e 4% de NaCl, com crescimento máximo a 2% e mínimo a 4% (CAVALCANTI *et al.*, 2005). Isolados da espécie apresentam reação de hipersensibilidade em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) variada (RANE; LATIN, 1992; SILVEIRA *et al.*, 2003; SOMODI *et al.*, 1991).

As perdas causadas pela mancha aquosa em meloeiro no Rio Grande do Norte já foram assinaladas entre 40 a 50%, atingindo até 100% em períodos chuvosos (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001). Rio Grande do Norte é o principal estado produtor e exportador de melão do Brasil (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTICULTURA, 2018), o que demonstra a importância da doença para a cultura. Os sintomas da doença podem se manifestar em qualquer fase de desenvolvimento da planta. Sobre as folhas podem se desenvolver entre as nervuras, não muito distintivos, e podem ser confundidos com sintomas de outras doenças.

As lesões variam do marrom claro ao marrom avermelhado. Os sintomas foliares não resultam em desfolhamento, o que as tornam importantes reservatórios da bactéria para a infecção do fruto (HOPKINS, 1994). Nos frutos, os sintomas da doença são mais típicos. As lesões são inicialmente pontos oleosos com 1 a 5 mm de diâmetro (SALES JÚNIOR; MENEZES, 2001), as quais se expandem e se tornam manchas marrons, necróticas com ou sem rachadura no centro (VIANA *et al.*, 2000). Geralmente, a bactéria coloniza a polpa do fruto, onde causa podridão seca, podendo assim contaminar as sementes externa e internamente (MARIANO; SILVEIRA, 2007). Em estudos de microscopia eletrônica, Dutta *et al.* (2016) concluíram que a localização no embrião/endosperma aumenta a sobrevivência de *A. citrulli* nas sementes. As doenças e pragas do meloeiro, como de outras culturas, podem causar prejuízos econômicos pela redução da quantidade e/ou qualidade de frutos comercializados (MENEZES *et al.*, 2000). Essa cultura apresenta algumas características que dificultam o manejo fitossanitário, dentre as quais se destacam o ciclo curto, com média de 60 dias e o plantio de forma escalonada, favorecendo a disseminação de pragas e patógenos de um cultivo mais antigo para um recém-plantado (BLEICHER; MELO, 1998; FERNANDES *et al.*, 2000).

E apesar do uso de kasugamicina e oxicleto de cobre apresentar efeito na redução da da incidência doença em frutos (SALES JÚNIOR *et al.*, 2005), o uso intensivo de agroquímicos na agricultura tem acarretado diversos problemas ambientais, tais como: a contaminação de alimentos, do solo, da água e dos animais; a resistência de patógenos, pragas e plantas invasoras; e problemas a saúde dos agricultores (MELO, 2012). Dentre as alternativas para a redução do uso de agroquímicos, o controle biológico é uma das mais discutidas, podendo aproveitar tanto o controle biológico natural quanto realizar a introdução massal de antagonistas (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Controle biológico, segundo Baker e Cook (1974), consiste na redução da quantidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocados por um patógeno ou parasita, nos seus estádios de atividade ou dormência, por um ou mais organismos, realizado naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou pela introdução em massa de um ou mais antagonistas. A introdução de antagonistas adaptados ao microhabitat do patógeno é um aspecto relevante para muitos sistemas planta-patógeno, mas o sucesso do biocontrole dependerá da natureza das propriedades e mecanismos de ação do antagonista (MELO, 1998). Os antagonistas podem proteger as plantas por diferentes mecanismos de ação. Eles pode induzir resistência ou aumentar a resistência contra infecções por um patógeno ou competição por espaços e nutrientes sem interação direta com o patógeno. Ou podem atuar diretamente sobre o patógeno por hiperparasitismo ou antibiose (KÖHL *et*

al., 2019).

Alguns estudos comprovaram a eficiência de bactérias antagonistas para o biocontrole da mancha aquosa em meloeiro e outras cucurbitáceas. Fessehaie e Walcott (2005) relataram que o tratamento de sementes de melancia (*Citrullus lanatus* L.) com *A. citrulli* AAA99-2 não patogênico ou *P. fluorescens* (Flugge) A506 foi eficaz na redução da incidência da doença em plântulas, e que em frutos oriundos de flores contaminadas e tratadas com esses antagonistas ocorreu uma menor porcentagem de sementes de melancia infectadas. Santos *et al.* (2006) obtiveram controle da mancha aquosa através do tratamento de sementes de meloeiro com líquidos fermentados com ou sem presença das células de *B. subtilis* (R14), *B. megaterium* de Bary pv. *cerealis* (Hosford) (RAB7), *B. pumilis* (Meyer e Gottheil) (C116), *Bacillus* sp. (MEN19), sendo os melhores resultados obtidos com RAB7 que proporcionou redução da incidência (89,1%) e do índice de doença (92,7%), elevou o período de incubação da mancha aquosa de 9,8 para 11,9 dias e reduziu a área abaixo da curva de progresso da doença de 3,36 para 0,17. Medeiros *et al.* (2009) testaram 50 isolados de bactérias endofíticas e epifíticas obtidas de melão e outras culturas e selecionaram o isolado RAB9 (*Bacillus* sp.) como eficiente no controle da mancha aquosa pela bacterização de sementes infectadas e o isolado MEN2 (*Paenibacillus lentimorbus* Dutky) pela pulverização em plântulas para proteção das folhas.

No Brasil, já existem pesquisas que evidenciam também a eficiência de leveduras no controle dessa doença. Onde Melo *et al.* (2015) demonstraram que entre 60 isolados, *Rhodotorula aurantiaca* (LMA1), *Pichia anomala* (CC-2) e *Rhodotorula glutinis* (LMS) foram eficientes no controle da doença. O efeito combinado dessas leveduras com silício (Si) também foram testados e a pulverização de LMA1 + Si e LMA1 resultou nos maiores níveis de controle da mancha aquosa nas plantas, sendo sugerida a indução de resistência um dos mecanismos de ação desses tratamentos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2014). Além da demonstração da eficiência desse isolado (LMA1) em colonizar os tecidos do meloeiro após pulverização, também foram disponibilizadas informações importantes para a formulação e produção desses isolados (CONCEIÇÃO, 2019).

O domínio fitogeográfico Caatinga, genuinamente brasileiro, localizado no Nordeste do Brasil e norte de Minas Gerais (sudeste do Brasil) é extremamente rico em diversidade e endemismo. (FERNANDES & QUEIROZ, 2018) Sua vegetação tem grande potencial farmacológico (BARROS *et al.* 2021) E apesar de escassa a literatura sobre a microbiota desse bioma, ressalta-se o seu grande potencial biotecnológico (SILVA *et al.*, 2015). Algumas pesquisas têm sido realizadas utilizando extratos vegetais dessas plantas no controle de

doenças de plantas (SILVA *et al.*, 2020; MALAFAIA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2016), inclusive alguns para o controle da mancha aquosa (ASSUNÇÃO, 2019; CONCEIÇÃO, 2019). No entanto, recentemente, diversos microrganismos provenientes de plantas da Caatinga também demonstraram controle *in vitro* de *A. citrulli* em teste de antibiose, com formações de halos inibitórios de alguns isolados inclusive maiores que o formado pelo tratamento positivo com kasugamicina. Tendo em vista, que o controle eficiente da doença pode se dá através de diferentes mecanismos de ação (KÖHL *et al.*, 2019; MELO *et al.*, 2015; CONCEIÇÃO *et al.*, 2014) esse é o primeiro trabalho que visa avaliar *in vivo* microrganismos isolados de plantas da caatinga para o controle biológico da mancha aquosa do meloeiro.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Geral**

Testar a eficiência de microrganismos de plantas de Caatinga no controle *A. citrulli* em sementes, plântulas e plantas

### **5.2 Específicos**

- Reativar isolados de *A. citrulli* e de microrganismos obtidos de plantas da Caatinga da Coleção de Culturas Rosa Mariano;
- Testar a eficiência de microrganismos no controle de *A. citrulli in vivo* (casa de vegetação) pelo tratamento de sementes (Objetivo não concluído no período de bolsa anterior devido a pandemia da COVID-19);
- Testar a eficiência de bactérias no controle de *A. citrulli* pelo tratamento de plântulas e plantas de meloeiro;
- Testar a eficiência de leveduras no controle de *A. citrulli* pelo tratamento de plântulas e plantas de meloeiro;
- Verificar a estabilidade dos microrganismos no controle de diferentes isolados de *A. citrulli*.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Reativação dos microrganismos

Os isolados de *A. citruli*, de bactérias e leveduras utilizados na pesquisa estavam mantidos em água destilada esterilizada (ADE) na Coleção de Culturas Rosa Mariano do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE.

O isolado CCRMAc1.12 de *A. citruli* foi reativado em meio de cultura extrato de levedura-dextrose-ágar (NYDA) (23 g ágar nutritivo, 10 g glicose, 5 g extrato de levedura, 3 g extrato de carne, 5 g peptona, 1 L água). Para confirmar a patogenicidade, foram preparadas suspensões bacterianas ajustadas em espectrofotômetro a  $A_{540nm} = 0,25$ , que equivale a uma concentração de  $3,4 \times 10^7$  UFC/mL. Foi inoculado em frutos de meloeiro através do método de injeção subepidérmica 100 mL da suspensão bacteriana logo abaixo da superfície da casca, nos espaços intercelulares, com auxílio de seringa hipodérmica; em plântulas de meloeiro com 7 dias após a emergência, foram submetidas a câmara úmida de pré e pós inoculação, onde foi pulverizada em folhas cotiledonares até o escoamento a suspensão bacteriana acrescida de 0,05% de Tween 20. Tanto fruto, quanto as plântulas foram avaliadas durante 7 dias para observação da presença ou ausência de sintomas.

Os 48 isolados, 33 de bactérias e 15 de leveduras, obtidos de plantas da Caatinga foram reativados, respectivamente, em meio de cultura NYDA e Sabouraud-dextrose-ágar (SDA) (40 g dextrose, 10 g neopeptona, 17 g ágar, 1 L água) suplementado com extrato de levedura (1,5 g/L) e cloranfenicol (50 mg/L). Esses isolados foram resultantes da pesquisa da bolsa PIBIC do período 2019-2020.

### 2. Tratamento de sementes com microrganismos para controle de *Acidovorax citrulli*

Sementes de meloeiro foram inicialmente desinfestadas em hipoclorito de sódio (0,5% de cloro ativo) durante 10 minutos, lavadas em ADE e secas ao ar por 24 horas. Após esse período, foram imersas por 30 minutos em 250 mL da suspensão de CCRMAc1.12 ( $3,4 \times 10^7$  UFC/mL) e postas para secar por 16 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as sementes foram imersas por 30 minutos em 100 mL da suspensão dos microrganismos na concentração  $9,0 \times 10^8$  UFC/mL, ajustadas pela escala de McFarland (Figura 1A, B, C). As sementes inoculadas e tratadas foram colocadas para secagem por 16 horas, em temperatura ambiente.



As sementes foram plantadas em bandejas de poliestireno expandido (Isopor, Brasil) contendo a mistura de solo: húmus (1:1 v/v) e após a emergência, as plântulas foram submetidas à câmara úmida por 24 horas (Figura 1 D, E, F). As plântulas foram avaliadas diariamente por seis dias quanto ao aparecimento de sintomas e severidade de doença, estimada com o auxílio de uma escala descritiva com notas de 0 a 5, onde: 0, plântulas sem sintomas; 1, plântulas com lesões marginais em até 50% de uma ou ambas as folhas cotiledonares; 2, plântulas com lesões marginais em até 75% de ambas as folhas cotiledonares; poucas lesões no centro do limbo; deformação foliar leve; 3, plântulas com lesões marginais em 100% de ambas as folhas cotiledonares; muitas lesões no centro do limbo; deformação foliar acentuada; enfezamento; 4, plântulas com lesões marginais em 100% de ambas as folhas cotiledonares, muitas lesões no centro do limbo progredindo para o hipocótilo; deformação foliar total; enfezamento; 5, necrose total das folhas cotiledonares e hipocótilo; tombamento e morte (Araújo *et al.*, 2005)

As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura e umidade relativa do ar, respectivamente de 20° a 47.2°C e 28 a 95%. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo cada repetição constituída por uma planta.

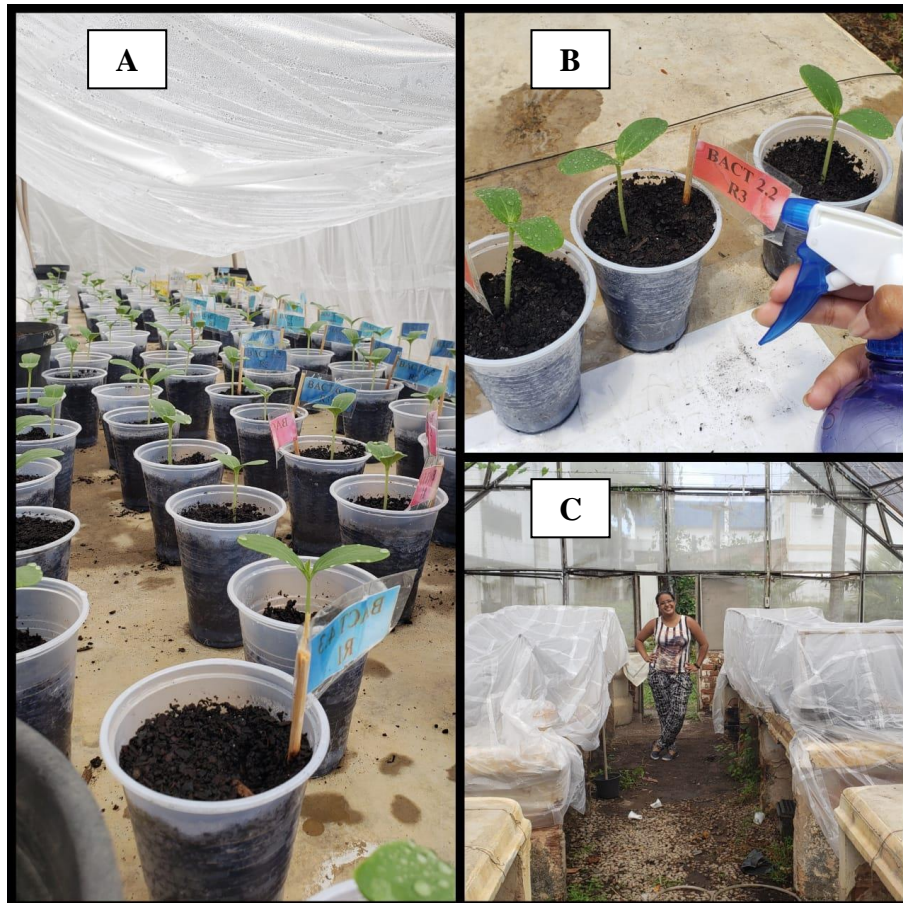


**Figura1.** A - Sementes de meloeiro imersas na suspensão de *Acidovorax citrulli*(CCRMa1.12); B – Suspensão de microrganismos ajustadas pela escala de McFarland; C – Sementes de meloeiro imersas na suspensão dos microrganismos; D e E – Sementes plantadas em bandejas de poliestireno expandido (Isopor, Brasil); F – Plântulas submetidas a câmara úmida após a germinação.

### 3. Pulverização de plântulas com microrganismos para controle de *Acidovorax citrulli*

Sementes de meloeiro foram cultivadas em vasos de 400 ml, contendo a mistura solo:húmus (1:1), e após seis dias, as folhas cotiledonares foram pulverizadas com os 48 isolados de microrganismos da Caatinga na concentração de  $9,0 \times 10^8$  UFC/mL, ajustadas pela escala de McFarland. Após 24 horas, a suspensão de *A. citrulli*CCRMA1.12 ( $3,4 \times 10^7$  UFC/mL) foi pulverizada nas folhas até o escorrimento (ARAÚJO *et al.*, 2005). As mudas foram submetidas à câmara úmida de pré e pós-inoculação por 24 horas, sendo mantidas em casa de vegetação (Figura 2). Seis dias após a inoculação, foi avaliada a

severidade da doença em plântulas, estimada com auxílio de uma escala descritiva com notas variando de 0 a 5 (ARAÚJO *et al.*, 2005), onde: 0 = plântulas sem sintomas; 1 a 4 = plântulas com lesões marginais em uma ou ambas as folhas cotiledonares, variando de 1 a 25%, 26 a 50%, 56 a 75% e de 76 a 100%, respectivamente; e 5 = necrose total das folhas cotiledonares e hipocótilo, tombamento e morte. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída por quatro plântulas.

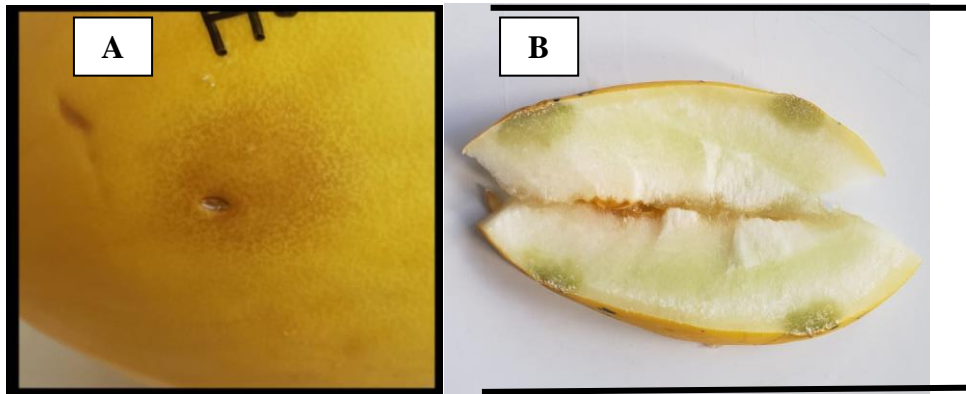


**Figura2.** **A** – Visão do experimento em casa de vegetação; **B**– Plantas de meloeiro sendo pulverizadas com suspensão de microrganismo antagonista; **C**– Plantas de meloeiro submetidas à câmara úmida após a inoculação com *Acidovorax citrulli*(CCRMaC1.12).

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

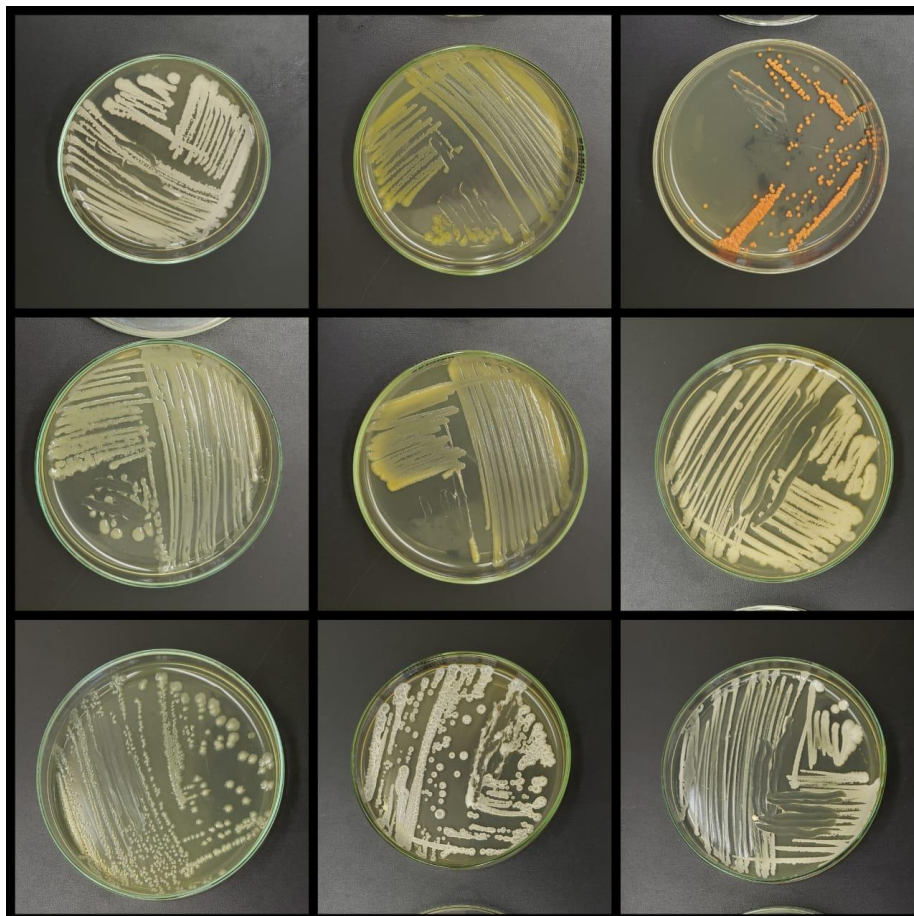
O isolado CCRMaC1.12 de *A.citrulli* induziu sintomas típicos de mancha aquosa em frutos de meloeiro (Figura 3). Inicialmente foram observadas lesões oleosas que se expandiram e se tornaram manchas marrons na casca do fruto e, após a abertura do fruto verificou-se que a bactéria colonizou a polpa causando uma podridão seca.





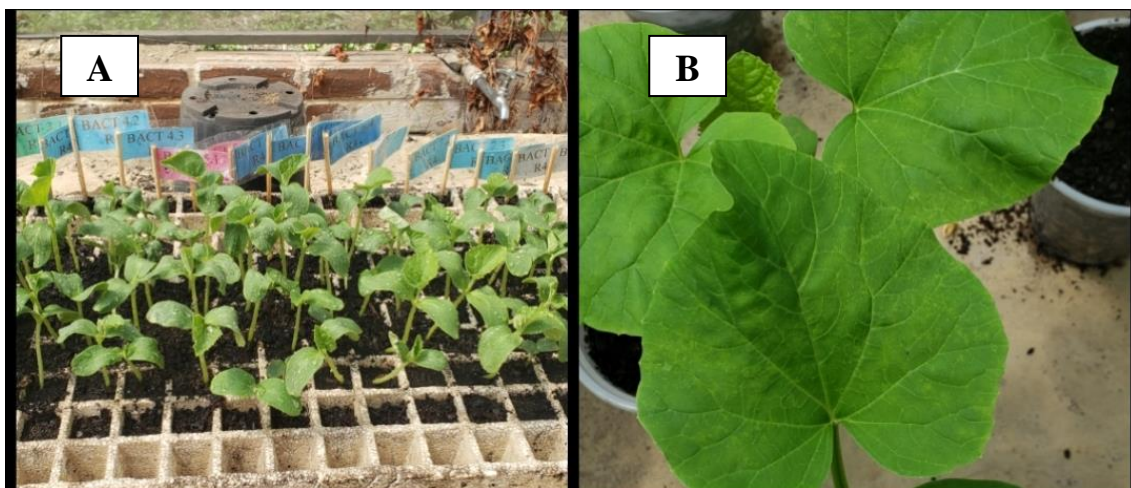
**Figura 3**– Sintomas externos (A) e internos (B) da mancha aquosa em fruto de meloeiro inoculado com *Acidovorax citrulli*(CCRMAc1.12)

Foram recuperados 33 isolados de bactérias e 15 isolados de leveduras da CCRM (Figura 4) os quais foram testados no controle de *A. citrulli* pelo tratamento de sementes e pulverização em plântulas.



**Figura 4** – Isolados de bactérias e leveduras oriundos de plantas da Caatinga e recuperados da Coleção de Culturas Rosa Mariano (CCRM) do Laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE.

Nos testes de seleção de microrganismos de plantas da Caatinga para o controle de *A. citrulli in vivo*, pelos métodos de tratamento das sementes e pulverização das plântulas, não foram observados sintomas da mancha aquosa nas plântulas, incluindo a testemunha apenas inoculada com o patógeno (Figuras 5).



**Figura 5**– Visão de plântulas de meloeiro tratadas com bactérias e leveduras de plantas da Caatinga, pelos métodos de tratamento de sementes (A) e pulverização das plântulas (B), e inoculadas com *Acidovorax citrulli*(CCRMaC1.12), evidenciando ausência de sintomas da mancha aquosa.

Uma vez que o isolado de *A. citrulli* estava patogênico, provavelmente a ausência de doença foi devido as altas temperaturas atingidas na casa de vegetação durante o período da realização do experimento, que atingiu até 47,9°C, com variação de temperatura e umidade relativa de 24,3 a 47,9°C e 28 a 95%, respectivamente (Figura 6).



**Figura6**– Termômetro mostrando a variação da temperatura e umidade na casa de vegetação no decorrer da realização dos experimentos.

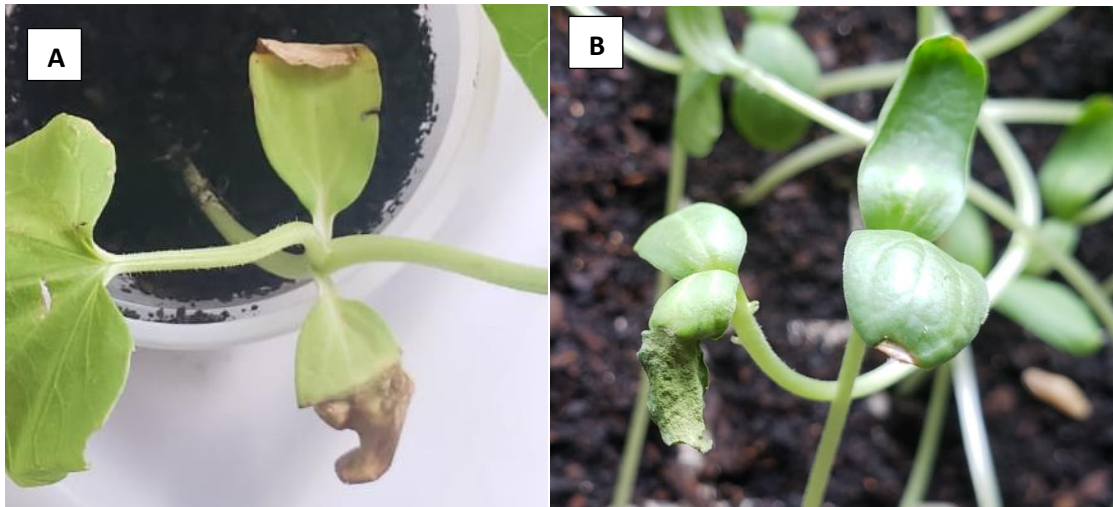
Embora umidade relativa e temperatura elevadas sejam condições favoráveis ao desenvolvimento da mancha aquosa (WALCOTT,2005), Assunção (2019) também detectou baixa severidade da mancha aquosa em plântulas oriundas de sementes inoculadas com *A. citrulli* em condições de temperatura de 42,5 °C, inferior a detectada no nosso experimento. Por outro lado, em experimentos realizados em temperatura nas baixas, variando de 25-32 °C, foram observados alta severidade da doença (BAHAR *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2013; WECHTER *et al.*, 2011). A temperatura afeta diretamente a multiplicação e colonização da bactéria nos tecidos da planta. Em frutos, Silveira *et al.* (2003) comprovaram que isolados de *A.citrulli* não causam sintomas em temperatura acima de 40°C, sugerindo que nesta temperatura há uma redução do metabolismo da bactéria. Em meio de cultura artificial essa bactéria também só cresce em temperatura de até 41°C (SCHAAD *et al.*, 2001).

Assim que foi possível, os experimentos foram repetidos. Como anteriormente o isolado de *A. citrulli* induziu sintomas típicos da doença em frutos de meloeiro, no entanto, não foi capaz de induzir sintomas nem em plântulas, nem plantas, repetiu-se o teste de patogenicidade em plântulas. Isso porque em decorrência da manutenção e frequência de repicagens o isolado pode perder patogenicidade ou virulência, pois as culturas mais velhas acabam por gerar culturas-filhas modificadas, levando-se em consideração a ocorrência de alterações tanto de caráter morfológico quanto fisiológico (SOLA *et al.*, 2012).

Após 7 dias, o isolado CCRM Ac 1.12 induziu manchas oleosas que evoluíram para necrose em folhas cotiledonares (Figura 7A). Algumas plântulas apresentaram necrose no hipocótilo, evoluindo rapidamente para damping-off, semelhante as descrições de Assunção *et al.* (2019). Após reisolamento da bactéria, de folhas sintomáticas, foi possível recuperar uma cultura com características morfológicas semelhantes ao inóculo inicial e a descrição na literatura, correspondendo a colônias pequenas de 0,3 a 1 mm de coloração creme (SCHAAD *et al.*, 1978). Quando inoculadas mais uma vez em plântulas, novamente foi possível observar os sintomas citados a cima. (Figura 7B), descartando assim, a hipótese que o isolado CCRM Ac1.12 perdeu a capacidade de causar doença em plântula e estaria causando apenas podridão em frutos, e corroborando que a ausência de sintomas foi em decorrência da alta temperatura na casa

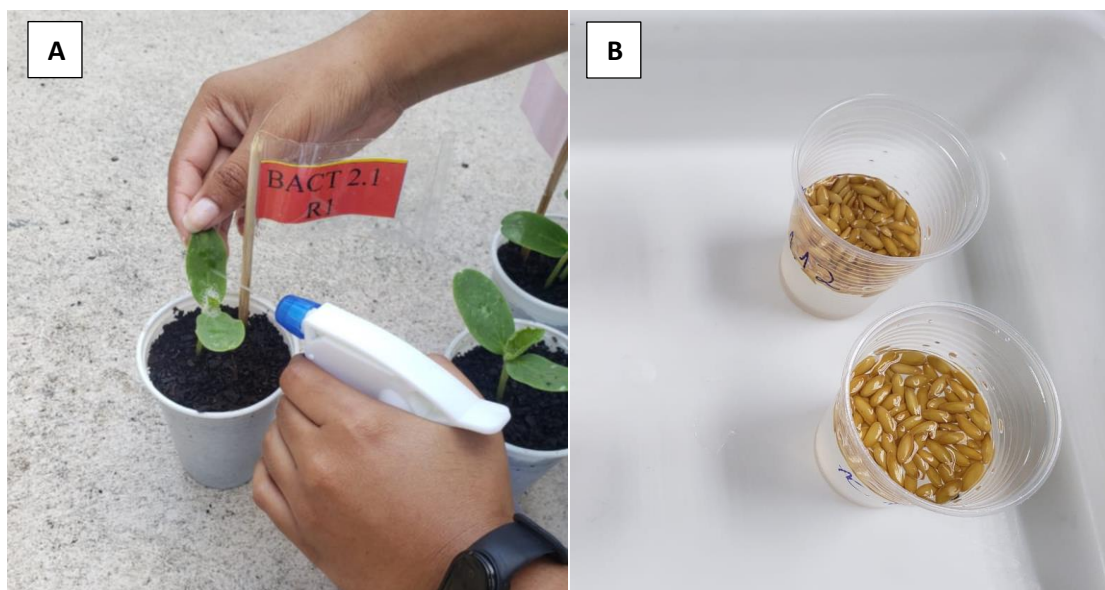


de vegetação, uma vez que os testes de patogenicidade foram realizados em condições de laboratório, com média de 27° C.



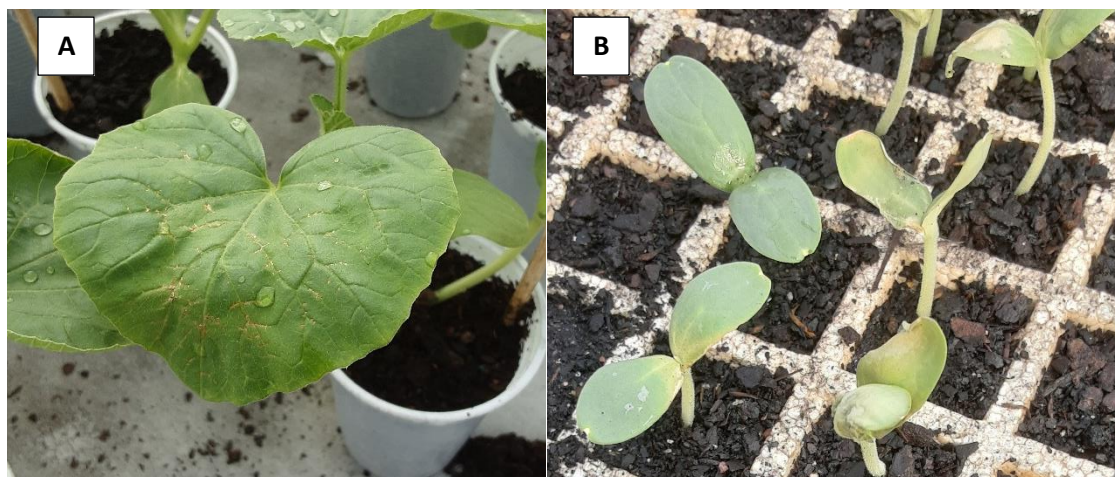
**Figura 7** – Plântulas de meloeiro demonstrando sintomas em folhas cotiledonares após (A) o primeiro teste de patogenicidade com o isolado CCRM Ac1.12 e (B) após a segunda inoculação com a cultura originada do reisolamento.

Os isolados antagonistas de bactérias e leveduras isolados de plantas da caatinga foram recuperados e usados como tratamentos, repetindo o experimento de pulverização em plântulas para o controle da mancha-aquosa (Figura 8A) e o tratamento de sementes para supressão da transmissão do patógeno (Figura 8B).



**Figura 8** – Inoculação de *Acidovorax citrulli* (CCRM Ac1.12) para o ensaio de pulverização em plântulas para o controle da mancha-aquosa e (B) Inoculação do patógeno no ensaio de supressão da transmissão em sementes.

Apesar das plântulas de meloeiro apresentarem manchas cloróticas e oleosas, além de darem origem a folhas verdadeiras apresentando manchas necróticas (Figura 9A), não foi possível avaliar a severidade nos tratamentos devido a desuniformidade de plantas sintomáticas com grande número de plantas assintomáticas, incluindo também a testemunha positiva (Figura 10). Resultados semelhantes foram encontrados no experimento de supressão da transmissão do patógeno nas sementes. Onde foi possível verificar morte de plântulas e necrose nas folhas cotiledonares (Figura 9B), no entanto, a maioria dos isolados correspondentes a testemunha positiva não apresentaram sintomas. Nenhuma planta correspondendo a testemunha negativa, nos dois experimentos, apresentaram sintomas da doença.



**Figura 9** – Sintomas de mancha aquosa em meloeiro (A) em folhas verdadeiras e (B) em folhas cotiledonares.

A baixa severidade no grande número de plantas deve estar correlacionada, provavelmente, mais uma vez as condições ambientais. Tendo em vista que a realização dos ensaios ocorreu durante um período chuvoso, a temperatura máxima foi de 27°C enquanto que a mínima 20°C. A temperatura é fator fundamental no desenvolvimento dos microrganismos. Isso porque o metabolismo e a velocidade de reprodução microbiana decrescem em baixas temperaturas, assim gradualmente diminuem o seu número (TORTORA, 2012). Quando avaliado o crescimento de quatro isolados brasileiros de



*Acidovorax citrulli* sob diferentes temperaturas *in vitro*, observou-se menor crescimento da bactéria em baixas temperaturas, sendo sua temperatura ótima 32°C (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

A diminuição no crescimento da bactéria em baixas temperaturas tem influência também no desenvolvimento da doença e de epidemias. A baixa temperatura pode influenciar a penetração e colonização do patógeno na planta (MICHEREFF, 2001). A influência da temperatura no desenvolvimento da mancha aquosa em frutos de melão tipo-amarelo foi avaliada, e não se obteve sintomas nas temperaturas de 15 e 20°C (SILVEIRA *et al.* 2003).

Dessa maneira, não foi possível selecionar dentre os microrganismos isolados de plantas da caatinga, antagonistas para o controle da mancha-aquosa do meloeiro devido a influência dos fatores ambientais. Onde a realização dos experimentos foi prejudicada devido aos dois extremos de temperatura que inibiu o desenvolvimento da doença.

## 8. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividade	2020					2021						
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
Reativação dos microrganismos	<u>x</u>	<u>x</u>										
Tratamento de sementes com bactérias e leveduras para controle de <i>A. citrulli</i> *												
Pulverização de plântulas com bactérias e leveduras para controle de <i>A. citrulli</i>			<u>x</u>	<u>x</u>	<u>x</u>							
Pulverização de plantas com bactérias e leveduras para controle de <i>A. citrulli</i>						<u>x</u>	<u>x</u>	<u>x</u>				

Estabilidade de bactérias e leveduras no controle de diferentes isolados de <i>A. citrulli</i>									<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	
Elaboração de relatório						<u>X</u>						<u>X</u>

\*Atividade do período anterior da bolsa e não realizada devido a pandemia da COVID-19.

Atividades realizadas estão marcadas de cor cinza.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não foi possível selecionar microrganismos de plantas da Caatinga com eficiência no controle da mancha aquosa causada pela bactéria *A. citrulli in vivo*, provavelmente em virtude dos picos de alta e baixa temperatura verificadas na casa de vegetação durante a elaboração dos experimentos, o que impediu a multiplicação e colonização da bactéria, resultando na ausência de sintomas da doença e baixa severidade.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. **ABF**. Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Editora, Gazeta Santa cruz, 2018. 88 p. Disponível em: <[http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wpcontent/uploads/2018/04/FRUTICULTURA\\_2018\\_dupla.pdf](http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wpcontent/uploads/2018/04/FRUTICULTURA_2018_dupla.pdf)>. Acesso em: fev. 2021.

ASSUNÇÃO, E. F. **Manejo da mancha aquosa do meloeiro**: fontes de resistência genética e extratos aquosos de plantas da caatinga. Recife, 2019. 86 f. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

BAHAR, O. G.; KRITZMAN, BURDMAN, S. Bacterial fruit blotch of melon: Screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 499, p. 71-83, 2009.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. H. Freeman, 1974. 433 p.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. Importância das doenças de plantas. In: BERGAMIN FILHO, K., H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia.**, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 1995. p. 13-33.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.) **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.

BLEICHER, E; MELO, Q. M. S. **Manejo da mosca-branca *Bemisia argentifolii***. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 1998. 15p. (Circular técnica, 3).

CARVALHO, F. C. Q; SANTOS, L. A; DIAS, R. C. S; MARIANO, R. L. R, SOUZA, E. B. Selection of watermelon genotypes for resistance to bacterial fruit blotch. **Euphytica**, Wageningen, v. 190, p. 169-180, 2013.

CAVALCANTI, M. T; SILVEIRA, E. B; MARIANO, L. R. M; VIANA, I. O. Crescimento de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* sob diferentes temperaturas, pH, concentrações de cloreto de sódio e fontes de carbono. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1313-1318, 2005.

CONCEIÇÃO, C. S. Leveduras e extratos aquosos de plantas de caatinga no controle da mancha aquosa do meloeiro Recife, 2019. 93 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

CONCEIÇÃO, C. S.; ASSUNÇÃO, E. F.; REZENDE, J. S.; MORAIS, R. F.; SILVA, A. M. F.; GAMA, M. A. S.; SOUZA, E. B. Ocorrência de mancha aquosa em melancia e meloeiro no estado do Piauí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2017. Uberlândia. **Anais...** Viçosa: SBF, 2017.

CONCEIÇÃO, C. S.; FELIX, K. C. S.; MARIANO, R. L.; MEDEIROS, E. V.; SOUZA, E. B. Combined effect of yeast and silicon on the control of bacterial fruit blotch in melon. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 174, n. 3, p. 164-170, 2014.

DUTTA, B.; SCHERM, H.; GITAITIS, R. D.; WALCOTT, R. R. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions. 2011. **Plant Disease**, St. Paul, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0292>>. Acesso em: 18 jan 2021.

FERNANDES, O. A.; FERREIRA, C. C.; MONTAGNA, M. A. **Manejo integrado de pragas de meloeiro**: manual de reconhecimento das pragas e táticas de controle. Jaboticabal: Funep-CNPq, 2000. 28 p.

HOPKINS, D. L. Field spread of bacterial fruit blotch of watermelon. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 4, p. 466, 1993.

HOPKINS, D. L.; CUCUZZA, J. D.; WATERWON, J. C. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n.5, p. 529-532, 1996.

HOPKINS, D. L.; CUCUZZA, J. D.; WATTERSON, J. C. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1495-1499, 2003.

HOPKINS, D. L.; THOMPSON, C. M. Evaluation of *Citrullus* sp. germ plasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 1, p. 61-64, 2002.

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO. Princípios gerais de controle. In: BERGAMIN FILHO, K.; H. AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 692-709.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 845, 2019.

MARIANO, R. L. R.; SILVA, V. A. V.; SILVA, A. M. F.; MEDEIROS, F. H. V.; VIANA, I. P. Ocorrência da mancha-aquosa do melão na Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, Suplemento, p. 147-148. 2004.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Mancha-aquosa: importante bacteriose do meloeiro no brasil. **Anais... Recife**, v. 1, p.79-88, 2004.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Melões indefesos. **Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 7, n. 46, p. 08-10, 2007.

MELO, E. A. Eficácia de leveduras no biocontrole da mancha aquosa em meloeiro. 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

MELO, E. A.; MARIANO, R. L. R.; LARANJEIRA, D.; SANTOS, L. A.; OMENA GUSMÃO, L.; SOUZA, E. B. Efficacy of yeast in the biocontrol of bacterial fruit blotch in melon plants. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 1, p. 56-64, 2015.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogenicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Controle biológico**. Jaguariúna. Embrapa, 1998, p. 17-67.

MENEZES, J. B.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; MAIA, C. E.; ANDRADE, G. G.; ALMEIDA, J. H. S.; VIANA, F. M. P. Melão pós-colheita. In: ALVES, R. E. **Características do melão para exportação**. Brasília: Embrapa-Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 13-22. (Frutas do Brasil, 10).

MORANDI, M. A.; BETTIOL, W.; PAULA JÚNIOR, T. J. Controle biológico de doenças de plantas. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; RODRIGUES, F. A. (Eds.). **O essencial da fitopatologia: controle de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, 2014. p. 175-234.

RANE, K. K.; LATIN, R. X. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n. 5, p. 509-512, 1992.

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, 2001. 25 p. (Relatório Técnico).

SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, I. S.; MARIANO, R. L. R.; SILVA, G. F.; NUNES, G. H. F. Efeito de Kasugamicina e Oxicloreto de Cobre no Controle da Mancha-Aquosa do Meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 30, p. 295-298, 2005.

SANTOS, A. A.; VIANA, F. M. **Mancha-aquosa do melão**. Fortaleza. EMBRAPA-SPI. 2000.

SANTOS, E. R.; GOUVEIA, E. R.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 376-378, 2006.

SANTOS, E. R.; GOUVEIA, E. R.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 376-378, 2006.

SANTOS, F. J. S.; LIMA, R. N.; CRISÓSTOMO, L. A.; SOUZA, F. **Irrigação do melão: manejo através do tanque classe “A”**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 7 p. (Circular Técnica, 11).

SANTOS, F. J. S.; LIMA, R. N.; CRISÓSTOMO, L. A.; SOUZA, F. **Irrigação do melão: manejo através do tanque classe “A”**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 7 p. (Circular Técnica, 11).

SCHAAD NW; JONES JB.; CHUN W (eds.). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul: APS Press, 2001.372 p.

SCHAAD, N. W.; SOWELL, G.; GOTH, R. W.; COLWELL, R. R.; WEBB, R.E. *Pseudomonas pseudoalcaligenessubsp. citrulli*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washingtonv, v. 28, p. 117-125, 1978.

SILVEIRA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Severidade da mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p.171-175, 2003.

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

SOLA, M. C.; FEISTEL, J. C.; OLIVEIRA, A. P.; REZENDE, C. S. M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, 2012.

SOMODI, G. C.; JONES, J. B.; HOPKINS, D. L.; STALL, R. E.; KUCHARÉK, T. A.; HODGE, N. C.; WATTERSON, J. C. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. **Plant Disease**, St. Paul., v. 75, n. 10, p. 1053-1056, 1991.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, L. C. Microbiologia – 10. Edição – Porto Alegre: Artmed, 2012.

VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A.; CARDOSO, J. E.; FREIRE, F. C. O.; LOPES, C. A. **Surto da mancha-aquosa em frutos de melão nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte**: recomendações preliminares de controle. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 4p. (Comunicado Técnico, 50).

WALCOTT, R. R. **Bacterial fruit blotch of cucurbits**. The Plant Health Instructor, 2005. DOI: 598 10.1094/PHI-I-2005-1025-02.

WALCOTT, R. R.; GITAITIS, R. D.; CASTRO, A. C. Role of blossoms in watermelon seed infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 5, p. 528–534, 2003.

WALCOTT, R. R.; LANGSTON, D.; GITAITIS, R. D.; GAY, D.; HOPKINS, D. L;

KUCHAREK, T. A.; LATIN, R.; EGGEL, D.; COOK, W. P.; KEINATH, A. P.; LOVIC, B. **Guidelines for managing bacterial fruit blotch disease**. Georgia, 2001. Disponível em: <<http://www.stalals.com/flyer.htm>>. Acesso em: 18 jan 2021.

WANG, S. L.; LIAN, Y. C.; LIANG, T. W. Purification and characterization of a novel alkaline alpha amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU 001, and application in antioxidant and prebiotic. **Process Biochemistry**, Taiwan, v. 46, n. 3, p. 745-750, 2011.

WANG, X.; LI, G.; JIANG, D. H.; HUANG, H. C. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. **Biological Control**, Montreal, v.50, p. 164-171, 2009.

WECHTER, W. P.; LEVI, A.; LING, K. S.; COUSIN, C.; BLOCK, C. C. Identification of resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* among melon (*Cucumis* spp.) plant introductions. *HortScience*, Alexandria, v. 46, p. 207-212, 2011.

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. p.115-133, 1988.

## **11. DIFICULDADES ENCONTRADAS**

Além das condições ambientais já relatadas, o desenvolvimento do projeto foi bastante prejudicado devido as restrições de acesso ao laboratório devido a pandemia da COVID-19; a realização da reforma da casa de vegetação (Figura 10A) realizada pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, sendo necessária a solicitação de um outro local, temporariamente, para a realização dos experimentos; E também a interdição do prédio Otávio Gomes, que ocorreu devido ao desabamento do gesso do teto do segundo andar (Figura 10B), local onde se encontra o laboratório de fitobacteriologia, e danos estruturais que estão sendo relatados há algum tempo.





**Figura 10** – (A) Casa de vegetação do laboratório de Fitobacteriologia da UFRPE desmontada para reforma. (B) Desabamento do gesso do teto do prédio Otávio Gomes.

## 12. PARECER DA ORIENTADORA

---

Assinatura do Orientador