

PRIMEIRO RELATO DE OCORRÊNCIA DA MANCHA BACTERIANA MARROM NO ESTADO DO PARÁ

SOARES, R.M.¹; MEYER, M.C.¹; FERREIRA, E.G.C.¹; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.¹; FANTINATO, G.G.P.¹; ÁVILA, W.²

¹Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass, Distrito de Warta, C.P. 231, CEP 86001-970, Londrina-PR, rafael.soares@embrapa.br.

²Juparanã, Paragominas-PA.

Introdução

A ocorrência da mancha bacteriana marrom (MBM), causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (CFF), foi confirmada em lavouras de soja no Brasil na safra 2011/12, nos municípios de Londrina e Guarapuava, PR (SOARES et al., 2013). A partir do primeiro relato da ocorrência desta bactéria no Brasil, em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) no ano de 1995 no Estado de São Paulo (MARINGONI; ROSA, 1997), o patógeno foi excluído da lista de pragas quarentenárias A1. Mesmo assim, medidas de contenção da dispersão da doença devem ser adotadas, bem como devem ser feitos levantamentos para verificar e descrever a dispersão da doença no país.

Os sintomas causados pela doença consistem, principalmente, em extensas lesões cloróticas e necróticas nas folhas, que reduzem a área fotossintética. Em alguns casos, pode ocorrer murcha de plantas, prejudicando o pleno desenvolvimento das mesmas. Trata-se de uma bactéria que sobrevive no campo em restos culturais, sementes e no solo (EPPO, 2011). A utilização de cultivares resistentes é a principal forma de controle da doença.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar amostras de folhas de soja com sintomas semelhantes aos causados pela MBM, provenientes de lavouras no Estado do Pará, coletadas em 2016, para determinar o agente causal do problema, baseando-se na avaliação dos sintomas apresentados nas plantas infectadas, bem como no isolamento, caracterização molecular e bioquímica do patógeno.

Material e Métodos

Amostras de folhas de soja com lesões cloróticas e necróticas foram coletadas no dia 13/05/2016, em lavoura do município de Paragominas, Pará, localizado na latitude de 2° 59' 42" S, e longitude de 47° 21' 10" O. Devido à característica dos sintomas semelhantes aos causados pela MBM, procedeu-se as técnicas

para obtenção de isolados bacterianos, onde pequenos pedaços das folhas foram cortados e desinfestados com álcool e hipoclorito de sódio e usados para fazer suspensões em água esterilizada, que foram transferidas na forma de estrias para placas de Petri com meio de cultura NSA (nutriente-sacarose-ágar). Os crescimentos bacterianos obtidos foram transferidos em meio CNS (*Clavibacter Nebraskensis Selective Medium*), descrito por Behlau et al. (2006) como semi-seletivo para CFF. Os isolados foram submetidos a testes de coloração diferencial de Gram e solubilidade em KOH (HALEBIAN et al., 1981) e inoculados em plantas de soja de uma cultivar suscetível a CFF, cultivadas em casa de vegetação. As folhas foram inoculadas com o método de corte com tesoura umedecida na suspensão (RAVA, 1984), avaliando-se a presença de clorose e necrose ao redor do corte. Posteriormente, realizou-se a extração de DNA genômico (LI; DE BÖER, 1995) dos isolados bacterianos obtidos das folhas de soja com sintomas da doença, seguida da confirmação molecular via PCR. As amostras de DNA foram extraídas em duplicatas biológicas para cada isolado e submetidas a reação de PCR inicialmente com o conjunto de *primers* bacterianos universal, FD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e RD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') que amplificam o gene ribossomal 16S (WEISBURG et al., 1991), como forma de controle endógeno da análise. Posteriormente, empregou-se os *primers* espécie-específicos *Cff*FOR2 (5'-GTTATGACTGAACTTCACTCC-3') e *Cff*REV4 5'-GATGTTCCCGGTGTTCTCGA-3' desenhados especificamente para a identificação de CFF (TEGLI et al., 2002). Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em solução tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV. Como controle positivo, foram utilizadas amostras de DNA de três isolados de CFF previamente identificados e obtidos de soja (SOARES et al., 2013) e como

controle negativo, amostra de DNA de um isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

Resultados e Discussão

Os dois isolados obtidos (Cff7 e Cff8) ocasionaram sintomas de clorose e necrose nas folhas das plantas inoculadas em casa de vegetação (Figura 1), similar aos sintomas ocasionados por MBM, além de apresentarem reação Gram positiva e não serem solúveis em KOH, características estas próprias de bactérias do gênero *Curtobacterium*.

No teste de PCR, todas as amostras dos diferentes isolados, bem como os controles positivos e negativo amplificaram o fragmento esperado de aproximadamente 1500 pb quando da amplificação da região do gene que codifica o rRNA 16S bacteriano, demonstraram a amplificabilidade das mesmas (Figura 2). Quando as amostras foram amplificadas com os *primers* espécie-específicos, todos os isolados amplificaram o fragmento esperado de 300 pb em todas as repetições biológicas avaliadas (Figura 3). Todos os controles positivos também amplificaram o fragmento esperado, observando-se a não amplificação no controle negativo e no controle da reação sem *template*, como esperado. Os dados moleculares foram concordantes com as análises fenotípicas, morfológicas e bioquímicas, indicando que os isolados obtidos de amostras de soja tratam-se de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Esses resultados fenotípicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares confirmam que os isolados obtidos são da espécie CFF e que esta espécie foi o agente casual da MBM obtidas das folhas com sintomas da doença.

Conclusão

Os sintomas verificados nas folhas de soja foram causados por CFF. Os testes de coloração, de solubilidade e a análise molecular utilizando *primers* espécie-específico confirmou que os isolados são de CFF, agente causal da MBM, sendo esse o primeiro relato de ocorrência desta doença em soja no Estado do Pará.

Referências

BEHLAU, F.; NUNES, L.M.; LEITE JUNIOR, R.P. Meio de cultura semi-seletivo para detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em solo e sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 394-396, 2006.

EPPO. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **OEPP/EPPO Bulletin**, v.41, p. 320-328, 2011.

HALEBIAN, S.; HARRIS, B.; FINEGOLD, S.M. Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, p. 444-448, 1981.

LI, X.; DE BÖER, S.H. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. **Phytopathology**, v. 85, p. 837-842, 1995.

MARINGONI, A.C.; ROSA, E.F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopatologica**, v. 23, p. 160-162, 1997.

SOARES, R.M.; FANTINATO, G.G.P.; DARBEN, L.M.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.; SEIXAS, C.D.S.; CARNEIRO, G.E.S. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 452-454, 2013.

TEGLI, S.; SERENI, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 331-337, 2002.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANES, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.



Figura 1. Sintomas de clorose e necrose em plantas inoculadas com corte de tesoura infectada em solução de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, isolado Cff7.

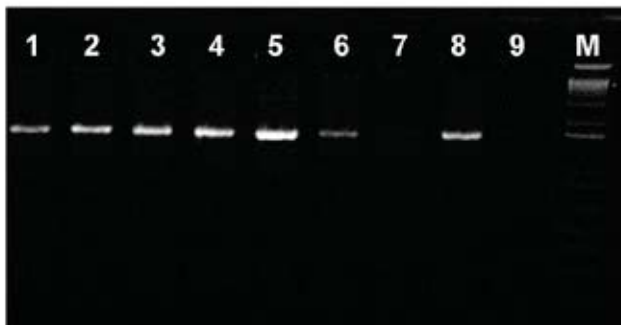


Figura 2. Teste de amplificabilidade das amostras de DNA de isolados bacterianos obtidos de folhas de soja com iniciadores específicos para o gene 16S rRNA. Repetições biológicas do isolado Cff7 (1-2) e do Cff8 (3-4), além dos controles positivos (5-7), do controle negativo (8), a reação sem *template* (9) e o marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (M).

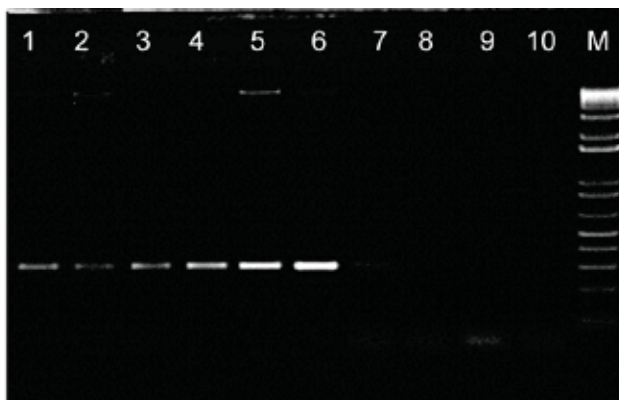


Figura 3. Detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em amostras de soja oriundas do Estado do Pará. As amostras foram amplificadas em duplicata com primers específicos CffFOR2 e CffREV4. Repetições biológicas do isolado Cff7 (1-2), do isolado Cff8 (3-4), dos controles positivos (5-6), Cff2 (7), do controle negativo em duplicada técnica (8-9), da reação sem *template* (10) e do marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (M).