

DETECÇÃO DE *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* COMO EPIFÍTICA EM FOLHAS E RAÍZES DE TOMATEIRO E DE ERVAS DANINHAS, PELO USO DA TÉCNICA DE INFILTRAÇÃO A VÁCUO*

ROSA DE LIMA RAMOS MARIANO

Prof. Adjunto do Depto. de Agronomia da UFRPE.
Bolsista do CNPq.

STATES M. McCARTER

Prof. Plant Pathology Depto.
University of Georgia.

Pseudomonas syringae pv. *tomato* foi detectada pelo uso da técnica de infiltração a vácuo em folhas de *Chenopodium album*, *Digitalis sanguinata*, *Lepidium virginicum*, e *Xanthium pensylvanicum*, em raízes e folhas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) e no solo. As amostras foram coletadas na Fazenda Experimental da Universidade da Georgia, Athens, GA, USA e processadas em laboratório para a obtenção da suspensão a ser infiltrada a vácuo em plantas de tomate, cultivar FM 6203, considerada suscetível à bactéria. As plantas foram incubadas por 15 dias em câmara de crescimento, a uma temperatura de 18-20°C. A detecção foi fundamentada no aparecimento de lesões típicas da mancha bacteriana pequena, e a identificação etiológica foi realizada através de isolamento em meio de cultura King B, teste de oxidase, hidrólise da arginina, nucleação de gelo, hipersensibilidade em fumo e patogenicidade em tomateiro. Considerando-se os resultados obtidos e trabalhos análogos, já publicados, a técnica torna-se recomendável para futuros estudos epidemiológicos desta bactéria.

INTRODUÇÃO

A mancha bacteriana pequena do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young et al. (PST), foi assinalada na Georgia, USA, em 1978, quando causou a rejeição de 180 ha de transplantes a serem certificados pelo Departamento de Agricultura daquele Es-

* Trabalho apresentado no XX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Londrina, 1987.

tado. (McCarter et al., 1983). No Brasil, a doença foi detectada em 1979, no Estado do Paraná (Leite Jr. e Mohan, 1983, 1985) e, desde então, tem causado crescentes problemas à cultura em vários Estados do Sul do País.

Jones, McCarter e Smitley (1981) utilizaram o método da infiltração a vácuo, descrito por Boosalis (1950) e recomendado por Goto (1972), para detecção de PST em solo artificialmente infestado, e em folhas e raízes de certas ervas daninhas. McCarter et al. (1983) utilizaram o mesmo método para estudar a sobrevivência desta bactéria em ervas daninhas, tomateiros e solos provenientes de campos onde houvera recentes epidemias da doença.

O método de infiltração a vácuo foi também testado com outras bactérias que afetam o tomateiro, com resultados promissores apenas para as que causam doenças em folhagem e não em sistema vascular (Gharbi, 1983).

O presente trabalho teve como objetivo a detecção de PST em raízes e folhas de tomateiro, de ervas daninhas, e solo, visando a ampliação da lista de hospedeiros epífíticos e confirmação da eficiência da técnica para estudos ecológicos e epidemiológicos desta bactéria.

MATERIAL E MÉTODO

As amostras de solo, ervas daninhas e tomateiro foram coletadas nas linhas e entrelinhas de um plantio de tomate em fase de colheita, apresentando sintomas da doença, localizado no município de Athens, Ga, USA.

Em laboratório, raízes e folhas foram cortadas assepticamente, em fragmentos de 1,0 cm², em média, os quais foram pesados e colocados em Erlenmeyers com água destilada e esterilizada (ADE) na proporção de 1:25 (p/v). O solo foi cuidadosamente homogeneizado, pesado, e colocado em ADE na mesma proporção. Os Erlenmeyers foram então colocados em agitador de garras, com ação oscilante, por 20 min, quando as suspensões obtidas de folhas foram imediatamente filtradas, enquanto as suspensões de raízes e solo foram antes centrifugadas a 3000 rpm por 15 min.

Plantas da cultivar FM 6203, altamente suscetível a PST, foram cultivadas em condições de casa-de-vegetação por quatro a cinco semanas, atingindo 12 a 15 cm de altura, sendo retiradas dos copos de papel com um mínimo de dano ao sistema radicular, exatamente no momento da infiltração a vácuo.

Este processo consistiu na imersão das folhas de cinco plantas, em aproximadamente 200 ml da suspensão de cada amostra à qual foram adicionadas duas gotas do espalhante adesivo Tween 20. Os recipientes, copos plásticos de

250 ml, foram colocados em dessecador de vidro, com capacidade de oito litros, acoplado à uma bomba de vácuo. Foi então feito vácuo de 760 mm de mercúrio por 1 e 2 min, seguindo-se evacuação abrupta. Os tomateiros infiltrados foram replantados em potes plásticos contendo solo esterilizado, e incubados em câmara de crescimento a 18-20°C, por catorze dias, para possibilitar o aparecimento dos sintomas.

As leituras realizadas após este período foram fundamentadas na presença de sintomas típicos da mancha bacteriana pequena, que se apresenta como lesões marrons, pequenas, com halo amarelado, bem como presença de lesões atípicas, marrons, indistintas, sem halo. A partir de ambos os tipos de lesões, foram realizados isolamentos em meio de cultura King B (King, Ward e Raney, 1954). Bactérias com fluorescência verde sob luz ultra-violeta (390 nm) foram testadas para oxidase, hidrólise de arginina, nucleação de gelo, hipersensibilidade em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e teste de patogenicidade em tomateiro cultivar FM 6203.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1. De todas as plantas testadas, incluindo o tomateiro, apenas a ambrosia americana não produziu lesões típicas da mancha bacteriana pequena. Com relação as outras ervas daninhas, PST foi detectada nas folhagem de erva-de-S. João, Capim pé-de-galinha, mastruz ereto e espinho de carneiro, mas não em raízes. A bactéria foi detectada tanto nas folhas e raízes do tomateiro, quanto nos solos das linhas e entrelinhas do plantio.

McCarter et al. (1983) também não detectaram PST em folhas e raízes de ambrosia americana, o que sugere a preferência desta bactéria por outros hospedeiros, conforme constatado por Mariano (1986). Os resultados aqui obtidos concordam com McCarter et al. (1983) que detectaram PST em folhas de erva-de-S. João, mastruz ereto e capim pé-de-galinha. Em espinho-de-carneiro, os citados autores detectaram PST em raízes mas não em folhas. De acordo com Mariano (1986), PST não sobreviveu nas folhas de espinho de carneiro e capim pé-de-galinha, inoculados, embora tenha sobrevivido em raízes da primeira por duas semanas.

Lesões atípicas originaram bactérias com colônias verdes, fluorescentes, oxidase, arginina dehidrolase e nucleação de gelo positivas, as quais não induziram hipersensibilidade em fumo ou patogenicidade em tomateiro. Estas bactérias não pertencem ao grupo *syringae* (Hyldebrand, Schroth e Sands, 1988; Fahy e Lloyd, 1983). Lesões típicas da mancha bacteriana pequena, originaram sempre bactérias com colônias verdes fluorescentes, oxidase, arginina dehidrolase e

nucleação de gelo negativas, induzindo hipersensibilidade em fumo e patogenicidade em tomateiro, as quais foram identificadas como PST. Esta bactéria foi diferenciada de *P. syringae* pv. *syringae* pelo tipo de lesão produzida e pela nucleação de gelo, além de outras características.

Apesar da técnica de infiltração a vácuo não ser considerada quantitativa e sim qualitativa, tem eficiência amplamente comprovada (Jones, McCarter e Smitley, 1981; McCarter et al., 1983; Gharbi, 1983) inclusive para detecção de baixas populações de bactérias (Melo e Mariano, 1988).

TABELA 1 - Detecção e caracterização de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a partir de lesões em plantas de tomate cultivar FM 6203, infiltradas a vácuo com suspensões obtidas de ervas daninhas, tomateiro e solo

MATERIAL	PARTE ANALISADA	TIPO DE LESÃO ^a	OXIDASE	ARGININA	NUCLEAÇÃO DE GELO	HR ^b	PATOGENICIDADE
<i>Ambrosia artemisifolia</i> L. (Ambrosia americana)	Folhas	A	+	+	+	-	-
	Raízes	S					
<i>Chenopodium album</i> L. (Erva-de-S. João)	Folhas	T	-	-	-	+	+
	Raízes	S					
<i>Digitalis sanguinalis</i> (L.) Scop. (Capim pé-de-galinha)	Folhas	T	-	-	-	+	+
	Raízes	A	+	+	+	-	-
<i>Lepidium virginicum</i> L. (Matruz ereto)	Folhas	T	-	-	-	+	+
	Raízes	S					
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Tomateiro)	Folhas	T	-	-	-	+	+
	Raízes	T	-	-	-	+	+
<i>Xanthium pensylvanicum</i> Wallr. (Espinho de carneiro)	Folhas	T	-	-	-	+	+
	Raízes	S					
SOLO 1 ^c		T	-	-	-	+	+
SOLO 2		T	-	-	-	+	+

a A = atípicas, T = típicas, S = sem lesões

b HR = hipersensibilidade em fumo

c 1 = coleta na linha de plantio, 2 = coleta entre linhas

CONCLUSÕES

A técnica de infiltração a vácuo pode ser utilizada para o estudo de possíveis locais de sobrevivência e fonte de inóculo de PST, contribuindo, assim, para um maior conhecimento da ecologia e epidemiologia da mancha bacteriana pequena.

ABSTRACT

Pseudomonas syringae pv. *tomato* was detected through the use of vacuum infiltration technique, on leaves of *Chenopodium album*, *Digitalis sanguinata*, *Lepidium virginicum*, and *Xanthium pensylvanicum* as well as on roots and leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and soil. The samples were collected at the Experimental Farm, University of Georgia, USA, processed and, the suspension was vacuum infiltrated in tomato plants, cultivar FM 6203, considered susceptible to the bacteria. Plants were incubated for fourteen days in a growth chamber at 18-20°C. The detection was based upon the occurrence of characteristic speck lesions and the identification was established through isolation of the bacteria on King's B medium, oxidase test, arginine dehydrolase test, ice-nucleation, HR reaction on tobacco and pathogenicity to tomato. Considering these results and other similar reports, the used technique is recommended for future ecological and epidemiological studies of this bacteria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BOOSALIS, M. G. A partial vacuum technique for inoculating seedlings with bacteria and fungi. *Phytopathology*, St. Paul, v. 40, n. 1, p. 2-3, Jan./Dec. 1950. Abstract.
- 2 FAHY, P. C.; LLOYD, A. B. *Pseudomonas*: The fluorescent Pseudomonads. In: FAHY, P. C.; PERSLEY, G. J. *Plant bacterial diseases: a diagnostic guide* New York : Academic Press, 1983. p. 141-188.
- 3 GHARBI, A. G. *Evaluation of a vacuum infiltration procedure for detecting five bacterial pathogens of tomato*. Georgia, 1983. 63 p. (Mestrado em Fitopatologia) - University of Georgia, 1983.
- 4 GOTO, M. The significance of the vegetation for the survival of plant pathogenic bacteria. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 3., 1972, Wageningen. *Proceedings...* Wageningen : Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1972. p. 39-53.
- 5 HYLDEBRAND, D. C.; SCHROTH, M. N.; SANDS, D. C. *Pseudomonas*. In: SCHAAD, N. W. (Ed.). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St. Paul : APS Press, 1988. p. 60-83.
- 6 JONES, J. B.; McCARTER, S. M.; SMITLEY, D. R. A vacuum infiltration inoculation technique for detecting *Pseudomonas tomato* in soil and plant tissue. *Phytopathology*, St. Paul, v. 71, n. 11, p. 1187-1190, Nov. 1981.

- 7 KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Atlanta, v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.
- 8 LEITE JR., R. P.; MOHAN, S. K. Mancha bacteriana pequena do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* no Estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 10, n. 3, p. 541, 1985.
- 9 —; —. Ocorrência de mancha bacteriana pequena do tomateiro causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* no Estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 8, n. 3, p. 638, 1983.
- 10 McCARTER, S. M.; JONES, J. B.; GITAITIS, R. D. et al. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue, and epiphytic weed host in Georgia. *Phytopathology*, St. Paul, v. 73, n. 10, p. 1393-1398, Oct. 1983.
- 11 MARIANO, R. L. R. *Ecology of three fluorescent Pseudomonads that cause foliar diseases of tomato*. Georgia, 1986. 114 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - University of Georgia, 1986.
- 12 MELO, R. A. G. de; MARIANO, R. L. B. Detecção do agente da podidão negra das crucíferas pela técnica de infiltração a vácuo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 13, n. 2, p. 102, 1988.

Recebido para publicação em 15 de julho de 1992