

UTILIZAÇÃO DO FIXATIVO DE PARDUCZ PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS EM TECIDO VEGETAL E CULTURA PURA

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 Gorgia.

ISAIRAS P. PADOVAN

Prof. Adjunto do Depto. de Histologia da UFRPE.

Plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. FM 6203 e Ontario 7710, estramônio (*Datura stramonium*), "estelária" *Stellaria media*, "spurred anoda" (*Anoda cristata*), "smooth vetch" (*Vicia dasycarpa*) e "beggarweed" (*Desmodium tortuosum*), foram inoculadas por pulverização, com as bactérias *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *syringae* e *P. viridiflava*, na concentração de 10^9 u.f.c./ml. Amostras foram coletadas após diferentes períodos, e processadas com o fixativo de Parducz durante 7 min a 40°C. As bactérias anteriormente citadas foram também cultivadas em caldo nutritivo, com ou sem agitação, e em meio de King B. Amostras foram coletadas e processadas com e sem diluição em água destilada e esterilizada, sendo colocadas em seringa contendo 1 ml do fixativo de Parducz, durante 6 min e em seguida filtradas em Nucleopore (0,2 μ m). Em ambos os materiais seguiram-se lavagens, desidratação em etanol, dessecamento pelo processo do ponto crítico, montagem, metalização e observação ao microscópio eletrônico de varredura. Em todas as amostras, tanto as células bacterianas quanto as superfícies do filtro, limbo foliar e suas estruturas, foram facilmente visualizadas, não apresentando deformações. O uso do fixativo de Parducz apresenta a vantagem da rapidez no processamento da amostra, tornando-o mais prático.

INTRODUÇÃO

O tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill, está entre as hortaliças mais cultivadas em Pernambuco, no Brasil e no mundo, podendo sofrer consideráveis re-

duções de produção devido a ocorrência de doenças. Algumas bacterioses foliares podem causar sérios prejuízos à cultura, como aquelas incitadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PST) (Goode e Sasser, 1980), *P. syringae* pv. *syringae* (PSS) (Jones, McCarter e Gitaitis, 1981; Gitaitis et al., 1985) e *P. viridiflava* (PV) (Jones et al., 1984), das quais a primeira já é considerada problema importante no Sul e Sudeste do Brasil (Leite Jr. e Mohan, 1983, 1985).

Bactérias fitopatogênicas que causam lesões em órgãos aéreos, frequentemente são encontradas na superfície das hospedeiras, quer sejam culturas de importância econômica, ou ervas daninhas, numa fase do seu ciclo de vida denominada residente ou epifítica. Este estágio é importante na ecologia destes patógenos, pela função que exerce como fonte de inóculo para a fase patogênica, a qual ocorre sob condições ambientais favoráveis à infecção (Leben, 1965; Hirano e Upper, 1983). Mariano, 1986 e Mariano e McCarter, 1991ab, observaram pelo uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV), que estas bactérias apresentavam-se muitas vezes, interligadas ou agrupadas por fibrilas, as quais, pareciam ancorá-las ao limbo foliar, facilitando a sua sobrevivência.

Este trabalho teve como objetivos: o estudo ultraestrutural da fase epifítica de PST, PSS e PV, na superfície de tomateiros e ervas daninhas, bem como a determinação da origem das fibrilas observadas na interação patógeno-hospedeiras, pela utilização do fixativo de Parducz (Parducz, 1967) através da MEV.

METODOLOGIA

MEV de Bactérias em Tecido Vegetal

Além de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. FM 6203 e Ontario 7710, PST foi também inoculada em estramônio (*Datura stramonium* L.) e estelária (*Stellaria media* (L.) Cyr.); PSS em "spurred anoda" (*Anoda cristata* (L.) Schlecht) e "smooth vetch" (*Vicia dasycarpa* Ten.) e PV em "beggarweed" (*Desmodium tortuosum* (Sw.) DC.), todas consideradas hospedeiras epifíticas dessas bactérias, respectivamente. Utilizou-se o método de atomização, com suspensões na concentração de 10^9 u.f.c./ml. Plantas testemunhas foram tratadas com água destilada. Após secagem por duas a três horas à temperatura ambiente, as plantas foram incubadas em câmara de crescimento a 18-20°C. Amostras foram coletadas após secagem, 24, 48, 72, 96 e 144 horas, bem como duas, quatro, seis, oito e 16 semanas, exceto para PV em tomate, onde as amostras de duas e quatro semanas foram substituídas por uma e cinco semanas. De cada amostra foram cortadas faixas perpendiculares à nervura principal do folíolo, nas regiões basal, média e apical, as quais foram seccionadas em fragmentos de aproximadamente 2mm². Este material foi processado com o fixativo de Par-

ducz (3 ml de solução aquosa de tetróxido de ósmio a 4%, 1 ml de solução saturada de HgCl_2 , duas gotas de solução de tween 20 a 0,1%) durante sete minutos a 40°C. Seguiram-se três lavagens com água destilada, desidratação em série de etanol (15, 30, 50, 70, 80, 85, 90, 95 e 100%), dessecamento pelo processo do ponto crítico, com CO_2 , montagem de 12 a 16 fragmentos por porta-especimen, metalização com ouro por dois minutos e observação ao MEV modelo Philips 505. Para cada amostra, igual número de faces adaxial e abaxial da superfície foliar foram observadas.

MEV de Bactérias em Cultura Pura

As bactérias PST, PSS e PV, foram cultivadas, separadamente, em 50 ml de caldo nutritivo, com ou sem agitação, à temperatura ambiente, até atingirem a concentração de 10^8 ufc/ml sendo então diluídas para 10^6 e 10^4 ufc/ml em água destilada e esterilizada (ADE). Bactérias também foram cultivadas em meio de King B contido em placas, por 36-48 h, sendo preparada uma suspensão com 10^8 ufc/ml em ADE. Testemunhas sem bactérias foram incluídas. De cada amostra, 1 ml de suspensão foi colocado em seringa contendo 1 ml do fixativo de Parducz durante seis minutos. Cada seringa foi então acoplada a um dispositivo Swinnex contendo um filtro descartável nucleopore, com 13 mm de diâmetro e poros de 0,2 μm . A suspensão foi filtrada e as células fixadas foram lavadas três vezes com tampão cacodilato 0,1M, através do mesmo filtro, o qual foi removido e processado como já descrito para o material vegetal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as amostras analisadas, tanto as células bacterianas quanto a superfície do filtro nucleopore utilizado como suporte para as culturas puras, bem como a superfície do limbo foliar e suas estruturas, processadas com o fixativo de Producz, não apresentaram deformações.

Foram observados a nível ultraestrutural na superfície foliar: estômatos (Figura 1.1), cerosidade (Figura 1.2), nervuras (Figura 1.3), células epidérmicas e pêlos ou tricomas (Figura 1.4). As bactérias foram observadas isoladamente (Figura 1.3) e, mais comumente em grupos (Figura 1.1 e 1.4), muitas vezes interligadas por fibrilas. Localizavam-se preferencialmente em áreas protegidas tais como, depressões entre as células, base de tricomas, nervuras, ao redor e dentro de estômatos. Este fato foi também observado por Leben (1965), Schneider e Grogan (1977), Bashan et al. (1981), Getz, Fulbright e Stephens (1983) e Mariano e McCarter (1991ab).

O período de sobrevivência de células bacterianas na superfície foliar variou de acordo com a interação patógeno-hospedeira. PST foi detectada nas

duas ervas daninhas até quatro semanas e nas duas cultivares de tomate, até oito semanas. PSS foi observada em 'FM 6203' até quatro semanas, em "spurred anoda" até oito semanas e, em 'Ontário 7710' e "smooth vetch" até 16 semanas. PV foi observada em "beggarweed" até oito semanas e nas duas cultivares de tomate até 16 semanas.

Poros foram observados na superfície do filtro (Figura 2.2) bem como bactérias isoladas (Figura 2.2) e, mais comumente, em grupos (Figura 2.1, 2.2 e 2.4). As fibrilas em estudo só foram observadas quando as bactérias foram cultivadas em caldo nutritivo, em agitador rotativo, e observadas sem diluição (Figura 2.1). Bactérias cultivadas em meio de King B, ou as testemunhas, compostas de caldo nutritivo submetido à agitação sem bactérias (Figura 2.3) apresentaram material granular, diferente das fibrilas, sugerindo a origem bacteriana destas estruturas, sob determinadas condições de multiplicação ou estágio de desenvolvimento. Estas fibrilas foram anteriormente observadas em *Agrobacterium tumefaciens* (Matthysse, Holmes e Gurlitz, 1981, 1982; Matthysse, 1983; Deasey e Matthysse, 1984), facilitando a aderência desta causadora de galhas, à parede celular da hospedeira, tendo origem bacteriana. Similarmente foram observadas em *P. syringae* pv. *pisi* e *P. syringae* pv. *tabaci*, mas não em *P. fluorescens*, associadas a tecido de meristema de fumo (Huang e Van Dyke, 1978), sendo neste caso relatadas como produzidas pelo hospedeiro.

Também foram observadas a formação de corpos esféricos (Figura 1.4) na parede celular das três espécies bacterianas, quando cultivadas em caldo nutritivo sob agitação. Este resultado concorda com o relato de Huang e Van Dyke (1978) que observaram estruturas idênticas em *P. fluorescens* sob meristema de fumo.

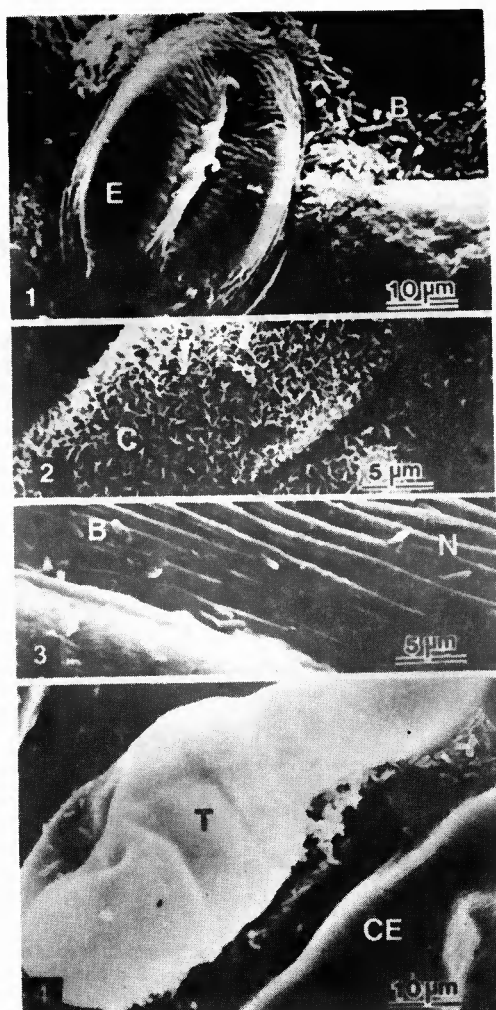


FIGURA 1 - Ultraestrutura da fase epifítica de bactérias fitopatogênicas em superfície foliar de tomate e ervas daninhas, 1 - B = bactéria, E = estômato; 2 - C = cerosidade; 3 - B = bactéria, N = nervura; 4 - CE = célula epidermal, T = tricoma

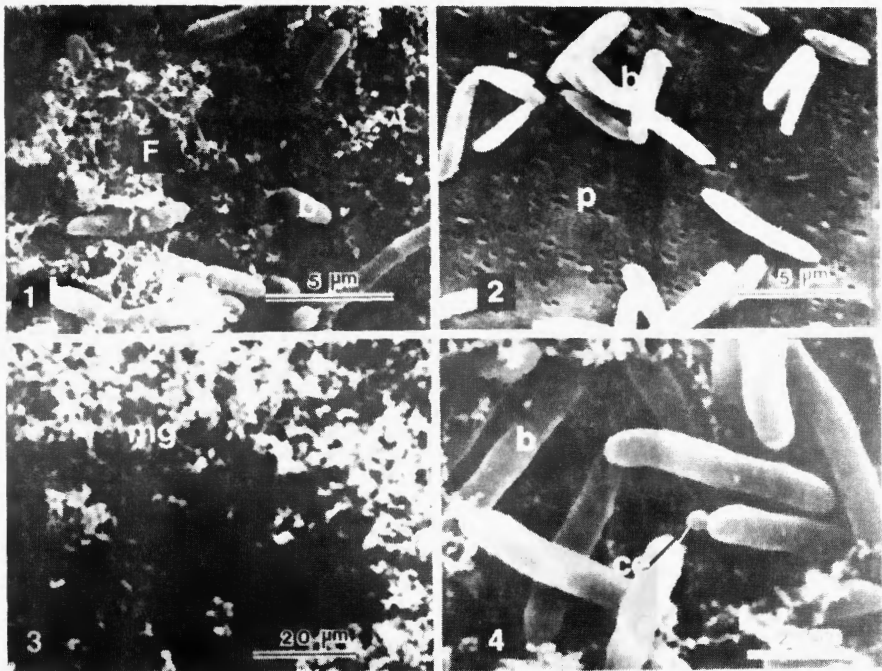


FIGURA 2 - 1 - Células de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* cultivadas em caldo nutritivo, sob agitação, observadas sem diluição (10^8 ufc/ml), B = bactéria, F = fibrila; 2 - Células de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* cultivadas em meio de King B (sólido), diluídas em água destilada e esterilizada, antes da observação (10^8 ufc/ml), notar a ausência de fibrilas, B = bactéria, P = poros do filtro; 3 - Caldo nutritivo mantido sob agitação sem bactérias (testemunha), notar material granular, porém ausência de fibrilas, MG = material granular; 4 - Células de *Pseudomonas viridiflava* cultivadas em caldo nutritivo, sob agitação e observadas sem diluição (10^8 ufc/ml), B = bactéria, CE = corpo estéril, F = fibrila.

CONCLUSÕES

A utilização do fixativo de Parducz, permitiu o estudo ultraestrutural das interações entre PST, PSS e PV com tecido vegetal, detectando a localização e sobrevivência destas bactérias.

A mesma técnica permitiu a visualização e determinação da origem das fibrilas, observadas unindo as células bacterianas na superfície foliar.

Recomenda-se o uso deste fixativo para microscopia eletrônica de varredura em pesquisas que requeiram precisão, em curto espaço de tempo, nas áreas de Microbiologia, Botânica e Fitopatologia, entre outras.

ABSTRACT

Tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) cv. FM 6203 and Ontario 7710, cocklebur (*Datura stramonium*), chickweed (*Stellaria media*), spurred anoda (*Anoda cristata*), smooth vetch (*Vicia dasycarpa*) and beggarweed (*Desmodium tortuosum*), were inoculated by atomization, with suspensions of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *syringae* and *P. viridiflava*, contained 10^9 c.f.u./ml. Samples were collected after different times, and processed with Parducz fixative during 7 min at 4°C. The same bacteria were also cultivated in nutrient broth, with and without shaking and on King's B medium. Samples were collected and processed with and without dilutions in distilled sterilized water, being placed in syringe to which 1 ml of Parducz fixative was added, mixed, allowed to stand for 6 min. and then passed through a Nucleopore (0,2 μ m) filter attached in a swinnex plastic holder. Both material were subsequently washed, dehydrated in ethanol series, critical point dried, monted, coated and observed with a Philips scanning electron microscope. Bacterial cells, filter surface, foliar tissue and structures, were easily visualized, without deformations. The use of this kind of fixative has the advantage of faster sample processing, which becomes more practical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BASHAN, Y.; SHARON, E.; OKON, Y. et al. Scanning electron and light microscopy of infection and symptom development in tomato leaves infected with *Pseudomonas tomato*. *Physiological Plant Pathology*, London, v. 19, p. 77-84, 1981.
- 2 DEASEY, M. C.; MATTHYSSE, A. G. Interactions of wild-type and cellulose-minus mutant of *Agrobacterium tumefaciens* with tobacco mesophyll and tobacco tissue culture cells. *Phytopathology*, St. Paul, v. 74, n. 8, p. 991-994, Aug. 1984.
- 3 GETZ, S.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T. Scanning electron microscopy of infection sites and lesion development on tomato fruit infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 73, n. 1, p. 39-43, Jan. 1983.
- 4 GITAITIS, R. D.; JONES, J. B.; JAWORSKI, C. A. et al. Analyses of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato transplants in Georgia. *Plant Disease*, St. Paul, v. 69, p. 32-35, 1985.

- 5 GOODE, M. J.; SASSER, M. Prevention the key to controlling bacterial spot and bacterial speck of tomato. *Plant Disease*, St. Paul, v. 64, p. 831-834, 1980.
- 6 HIRANO, S. S.; UPPER, C. D. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 21, p. 243-269, 1983.
- 7 HUANG, J. S.; VAN DYKE, C. G. Interaction of tobacco callus tissue with *Pseudomonas tabaci*, *P. pisi*, and *P. fluorescens*. *Physiological Plant Pathology*, London, v. 13, p. 65-72, 1978.
- 8 JONES, J. B.; McCARTER, S. M.; GITAITIS, R. D. Association of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with a leaf spot disease of tomato transplants in Southern Georgia. *Phytopathology*, St. Paul, v. 71, n. 12, p. 1281-1285, Dec. 1981.
- 9 —; JONES, J. P.; McCARTER, S. M. et al. *Pseudomonas viridiflava*: causal agent of bacterial leaf blight of tomato. *Plant Disease*, St. Paul, v. 68, n. 4, p. 341-342, Apr. 1984.
- 10 LEBEN, C. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 3, p. 209-230, 1965.
- 11 LEITE JR., R. P.; MOHAN, S. K. Mancha bacteriana do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* no Estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 10, n. 3, p. 541, 1985.
- 12 —; —. Ocorrência da 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.
- 13 MARIANO, R. L. R. *Ecology of three fluorescent pseudomonads that cause foliar diseases of tomato*. Georgia, 1986. 144 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - University of Georgia.
- 14 —; McCARTER, S. M. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato and weeds. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 16, n. 1, p. 92-97, 1991b.
- 15 MARIANO, R. L. R.; McCARTER, S. M. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato and weed species. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 16, n. 1, p. 86-92, 1991a.
- 16 MATTHYSSE, A. G. Role of bacterial cellulose in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 154, p. 906-915, 1983.
- 17 —; HOLMES, K. V.; GURLITZ, R. H. G. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 145, n. 1, p. 583-595, Jan. 1981.

- 18 —; —; —. Bending of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot protoplasts. *Physiological Plant Pathology*, London, v. 20, p. 27-33, 1982.
- 19 PARDUCZ, B. Ciliary movement and coordination in ciliates. *International Review of Cytology*, San Diego, v. 21, p. 27-33, 1967.
- 20 SCHNEIDER, R. W.; GROGAN, R. G. Tomato leaf trichomes, a habitat for resident populations of *Pseudomonas tomato*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 67, n. 7, p. 898-902, July, 1977.

Recebido para publicação em 15 de julho de 1992,