

CARACTERIZAÇÃO DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE* EM TOMATEIRO NO BRASIL E REAÇÃO DE CULTIVARES/GENÓTIPOS DE TOMATEIRO A ESSE PATOVAR E AO PATOVAR *TOMATO*

V.A. Malavolta Júnior¹, I.M.G. Almeida², J. Rodrigues Neto², L.O.S. Beriam², P.C.T. de Melo³

¹Instituto Agrônomo, CP 28, CEP 13001-970, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

Plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivar Zenith foram coletadas em julho de 1993 em plantios localizados no Município de Patos de Minas, MG. Folhas dessas plantas apresentavam lesões escuras, grosseiramente circulares com diâmetro de até 1 cm, sem a presença de halo clorótico. Essas lesões podiam coalescer, atingindo grandes extensões do limbo foliar. Isolamentos realizados resultaram em bactérias do gênero *Pseudomonas*, fluorescentes sob luz ultra violeta em meio B de King e patogênicas ao tomateiro em inoculações artificiais. Testes bioquímicos, culturais, fisiológicos e de patogenicidade foram realizados utilizando-se também dois isolados de *P. syringae* pv. *tomato*. Os resultados dos testes para caracterização do agente causal mostraram que os isolados em estudo pertenciam ao Grupo Ia (LOPAT + - - - +) e que produziam ácido a partir de eritról, utilizavam DL-lactato mas não utilizavam D(-) tartarato. Esses resultados permitiram caracterizar a bactéria como *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Em inoculações artificiais realizadas em casa de vegetação, as cultivares/genótipos Ângela, Santa Clara, XPH 5978, XPH 5979, XPH 12068 e Brigade apresentaram resistência ao patógeno. Isolado bacteriano encontra-se depositado na Coleção de Culturas IBSBF, sob número de acesso 1012.

PALAVRAS-CHAVE: Tomateiro, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Lycopersicon esculentum*.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE* ON TOMATO (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) IN BRAZIL AND REACTION OF CULTIVARS AND GENOTYPES OF TOMATO TO THIS BACTERIUM AND TO *P.S.* PV. *TOMATO*. Plants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) showing leaf spots were observed in a crop located in the county of Patos de Minas, State of Minas Gerais, Brazil. These spots were usually dark brown, rounded, with a diameter which could extend to about 1 cm and did not have chlorotic, yellow haloes. The lesions very often coalesced and formed large, irregular, necrotic areas. A fluorescent pseudomonad which belongs to group Ia (LOPAT + - - - +) was isolated from the infected areas. Biochemical, cultural, physiological and pathogenicity tests were also developed utilizing two *P. syringae* pv. *tomato* strains for comparison. The bacterium isolates produced acid from erythritol, utilized DL-lactate but not D(-) tartrate and were characterized as *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. In artificial inoculations under greenhouse conditions the cultivars/genotypes Ângela, Santa Clara, XPH 5978, XPH 5979, XPH 12068 and Brigade exhibited resistance to the pathogen. Bacterial strain was deposited in IBSBF Culture Collection under accession number 1012.

KEY WORDS: Tomato, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Lycopersicon esculentum*.

INTRODUÇÃO

Diversos fatores bióticos e abióticos são responsáveis por perdas quali-quantitativas na exploração comercial de culturas de interesse econômico. Bactérias fitopatogênicas assumem especial importância na cultura do tomateiro, na qual podem se tornar limitantes

à produção. Em nosso país, já foram registradas, infectando naturalmente o tomateiro, as bactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* e *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Pseudomonas corrugata*, *P. marginalis* pv. *marginalis*, *P. syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (MARQUES *et al.*, 1994).

²Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil.

³ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil.

Em julho de 1993, foram coletadas plantas de tomateiro cv. Zenith, em plantios localizados no Município de Patos de Minas, Estado de Minas Gerais, mostrando sintomas foliares caracterizados como lesões escuras, grosseiramente circulares, não rodeadas por halo clorótico. Essas lesões apresentavam tamanho variável, de puntiformes a até 1 cm de diâmetro e, quando coalesciam, atingiam grandes extensões do limbo foliar (Fig. 1). Exames laboratoriais através de observações ao microscópio óptico, mostraram associação de bactérias a essas lesões. Por esses sintomas diferirem dos causados por patógenos bacterianos já assinalados no Brasil, foi realizado o presente trabalho, que teve como objetivo principal a caracterização do agente causal.



Fig. 1 - Sintomas causados por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em tomateiro. Inoculação artificial.

MATERIALE MÉTODOS

Isolamento do patógeno: porções de tecido foliar (aproximadamente 3x4 mm) apresentando sintomas foram maceradas em água destilada esterilizada e a suspensão resultante riscada em placas de Petri contendo meio Nutriente Agar (LEVINE, 1954). Após 48 horas de incubação a 28 °C, as colônias predominantes foram selecionadas e repicadas para meio B de King (KING *et al.*, 1954) ou meio Nutriente Agar.

Testes de patogenicidade: foram realizados através de inoculações artificiais, empregando-se três isolados e, para fins comparativos, dois isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Essas inoculações foram feitas através de pulverização de suspensão bacteriana com concentração aproximada de 10⁸ UFC/mL, aplicada por meio de pulverizador manual, sem pressão, até o ponto de escorrimento, em folhas de plântulas de tomateiro mantidas em casa de vegetação. Após inoculação, as plantas foram mantidas sob câmara úmida por 72 horas.

Caracterização dos isolados: foram utilizados 3 isolados bacterianos. Esses isolados foram caracterizados através de testes bioquímicos, culturais e fisiológicos relacionados por BRADBURY (1986) e por LELLIOTT & STEAD (1987), incluindo os testes LOPAT (LELIOTT *et al.*, 1966), produção de ácido de carboidratos e utilização de sais sódicos. Os testes de hipersensibilidade foram realizados por meio de infiltração em folhas de fumo cv. White Burley, conforme metodologia descrita por KLEMENT *et al.* (1964).

Avaliação de resistência varietal: para os testes de resistência varietal foram empregadas 21 cultivares/genótipos de tomateiro constantes na Tabela 2. Plantas com 30 dias de idade, mantidas em vasos plásticos (4 plantas/vaso) em condições de casa de vegetação, foram inoculadas separadamente com cada isolado bacteriano, empregando-se três vasos para cada cultivar/genótipo. Como inóculo foram empregadas

suspensões bacterianas de um isolado em estudo e também dos isolados IBSBF 836 (estirpe tipo de *P.s.* pv. *tomato*) e IBSBF 524 (*P.s.* pv. *tomato*), com concentração aproximada de 10⁸ UFC/mL. O método de inoculação foi o de pulverização foliar com pressão (atomização) até o ponto de escorrimento. A aplicação foi realizada por meio de um atomizador "H Airbrush", com pressão de 1,0 kgf/cm², fornecida por compressor Primar, sem entretanto produzir anasarca nos tecidos foliares. A avaliação da reação das plantas foi realizada 15 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala com valores de 0 a 5, onde 0= ausência de sintomas; 1= lesões puntiformes, esparsas e em pequeno número; 2= lesões puntiformes, em grande número; 3= lesões maiores e esparsas; 4= lesões maiores, atingindo grande parte do limbo foliar, mas sem coalescência e 5= lesões grandes, coalescentes, comprometendo mais de 50% do limbo foliar.

Eletroforese de proteínas: alíquotas do complexo protéico da membrana (THAVEECHAI & SCHAAD, 1986) de todos os isolados empregados no presente trabalho foram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio (PAGE/SDS) (HAMES, 1982; BLUM *et al.*, 1987), após dosagem proteica (HARTREE, 1972).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolamentos realizados mostraram, após 48-72 horas, predominância de colônias convexas, de coloração creme, Gram negativas, oxidativas, que, em meio BK, apresentavam fluorescência sob luz ultra violeta. Os resultados dos testes LOPAT (+ - - +) permitiram caracterizar os isolados em estudo como pertencentes à espécie *P. syringae*, diferenciando-os de outras *Pseudomonas* fluorescentes (*P. viridiflava*, *P. cichorii*, *P. marginalis*) já relacionadas como patogênicas ao tomateiro (BRADBURY, 1986). Outros testes

Tabela 1 - Características bioquímicas dos isolados de tomate, de *Pseudomonas syringae* pv. *tomatoe* de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Características	Isolados de tomate	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> *	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> *
Produção de ácido a partir de:			
adonitol	-**	-	-
D(-)arabinose	-	-	-
celobiose	-	-	-
eritritol	+	+	-
m- inositol	+	+	+
inulina	-	-	-
maltose	-	-	-
sacarose	+	+	+
D-salicina	-	-	-
D(-)sorbitol	+	+	+
D(+)-trehalose	-	-	-
Utilização de:			
benzoato	-	-	-
gluconato		+	+
DL-lactato	+	v+	-
malonato	+	+	+
succinato	+	+	+
D(-)tartarato	-	v-	+
L(+)-tartarato	-	-	-
betaína	+	+	+

(*) Dados obtidos em BRADBURY (1986); MISAGHI & GROGAN (1969); YOUNG & TRIGGS (1994).

(**) + positivo; - negativo; v+ variável com maioria positiva. v - variável com maioria negativa

bioquímicos, culturais e fisiológicos empregados para caracterização dos isolados estão relacionados na Tabela 1 e permitiram caracterizar o agente causal como sendo *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, diferenciando-a de *P.s.* pv. *tomato* pela não utilização de D(-) tartarato e utilização de eritritol e DL-lactato, além da patogenicidade apresentada a cultivares de tomateiro resistentes a *P.s.* pv. *tomato* (GITAITIS *et al.*, 1985; JONES *et al.*, 1986). Os perfis protéicos em PAGE/SDS dos isolados bacterianos em estudo foram semelhantes àquele obtido para o isolado de *P. s.* pv. *syringae*, confirmando a classificação da bactéria.

Como patogênicas ao tomateiro, já foram registradas em diversos países as seguintes pseudomonadas fluorescentes: *P. cichorii*, *P. viridiflava*, *P. marginalis* pv. *marginalis* e *P. syringae* pv. *tomato*, sendo que as duas últimas já haviam sido relacionadas no Brasil (MALAVOLTA JÚNIOR & RODRIGUES

Tabela 2 - Reação de cultivares/genótipos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PST) e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (PSS), em inoculações artificiais.

Cultivar/Genótipo	Isolado bacteriano número*		
	836 (PST)	524 (PST)	1012 (PSS)
Ângela Hiper	3**	4	2
IPA 6	5	5	2
AF26317	2	3	2
Santa Clara	4	5	0
Ângela	5	4	0
Colorado	5	5	4
Barão Vermelho	5	3	2
Kada	2	2	2
XPH 5976	1	0	2
XPH 5978	1	1	0
XPH 5979	1	0	0
Brigade	4	5	0
AF 26318	3	4	2
XPH 12044	0	0	2
XPH 12045	1	1	2
Botu 13	0	0	3
XPH 12066	0	0	2
XPH 12067	0	0	3
XPH 12068	0	0	0
XPH 12070	1	0	2
Zenith	1	0	2

* número de registro na Coleção de Culturas IBSBF.

**0= ausência de sintomas; 1= lesões puntiformes, esparsas e em pequeno número; 2= lesões puntiformes, em grande número; 3= lesões maiores e esparsas; 4= lesões maiores, atingindo grande parte do limbo foliar, mas sem coalescência e 5= lesões grandes, coalescentes, comprometendo mais de 50% do limbo foliar.

NETO, 1991; MARQUES *et al.*, 1994). Desta maneira, *P. s.* pv. *syringae* passa a ser considerada também patogênica ao tomateiro em nosso país, sendo que resultados preliminares deste trabalho já foram apresentados (ALMEIDA *et al.*, 1994). Ressalta-se também que em trabalho paralelo realizado com material procedente da mesma região de Patos de Minas, MARINGONI *et al.* (1994) também descreveram *P. s.* pv. *syringae* como agente causal de anomalias semelhantes às descritas no presente trabalho.

Os resultados dos testes de avaliação de resistência varietal encontram-se na Tabela 2. Por essa tabela, observa-se que as cultivares/genótipos mais resistentes a *P. s.* pv. *tomato* foram Botu 13, Zenith, XPH 5976, XPH 5978, XPH 5979, XPH 12044, XPH 12045, XPH 12066, XPH 12067, XPH 12068, XPH 12070, enquanto que as mais suscetíveis foram Ângela Hiper, IPA 6, Santa Clara, Ângela, Colorado, Barão Vermelho,

Brigade e AF 26318. As demais cultivares/genótipos testados (AF 26317 e Kada) se mostraram medianamente resistentes. Com relação aos isolados de *P. s. pv. syringae* em estudo, foram resistentes: Ângela, Brigade, Santa Clara, XPH 5978, XPH 5979 e XPH 12068. As demais cultivares/genótipos testados se comportaram como medianamente resistentes, com exceção da cultivar Colorado que foi suscetível.

Alguns genótipos portadores do gene Pto exibem também resistência a *P. s. pv. syringae*, enquanto outros não. Isso indica que seguramente outro(s) gene(s) é (são) responsável(is) pela resistência a *P. s. pv. syringae*.

Isolado bacteriano encontra-se depositado na Coleção de Culturas IBSBF sob n° 1012.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, I.M.G.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; RODRIGUES NETO, J.; BERIAM, L.O.S. Ocorrência de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) no Brasil. *Summa Phytopathol.*, v.20, p.47, 1994.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GRÖSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, v.8, p.93-99, 1987.
- BRADBURY, J.F. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Kew: C.A.B. Internacional, 1986. 332p.
- GITAITIS, R.D.; JONES, J.B.; JAWORSKI, C.A.; PHATAK, S.C. Incidence and development of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato transplants in Georgia. *Plant Disease*, v.69, p.32-35, 1985.
- HAMES, B.D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES, B.D. & RICKWOOD, D. (Eds.) *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1982. p.1-91.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, v.48, p.422-427, 1972.
- JONES, J.B.; McCARTER, S.M.; GITAITIS, R.D. Association of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with a leaf spot of tomato transplants in southern Georgia. *Phytopathol.*, v.71, p.1281-1285, 1981.
- KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.*, v.44, p.301-307, 1954.
- KLEMENT, Z.; FARKAS, G.L.; LOVREKOVICH, L. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathol.*, v.54, p.474-477, 1964.
- LELLIOTT, R.A. & STEAD, D.E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In: LELLIOTT, R.A. & STEAD, D.E. *Methods in plant pathology*. Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1987. 216 p.
- LELLIOTT, R.A.; BILLING, E.; HAYWARD, A.C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.29, n.3, p.470-489, 1966.
- LEVINE, M. *An introduction to laboratory technique in bacteriology*. New York: Mac Millan, 1954. p.68-79.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V. & RODRIGUES NETO, J. Controle de doenças causadas por bactérias em tomateiro. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO E ABASTECIMENTO DE TOMATE, 2., 1991, Jaboticabal. *Anais. Jaboticabal: FUNEP*, 1991. p.166-182.
- MARINGONI, A.C.; KUROZAWA, C.; BARBOSA, V. Ocorrência de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em tomateiro na região de Patos de Minas, MG. *Summa Phytopathol.*, v.20, p.49, 1994.
- MARQUES, A.S.S.; ROBBS, C.F.; BOITEUX, L.S.; PARENTE, P.M.G. *Índice de fitobacterioses assinaladas no Brasil*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 65p.
- MISAGHI, I. & GROGAN, R.G. Nutritional and biochemical comparisons of plant-pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.*, v.59, p.1436-1450, 1969.
- THAVEECHAI, N. & SCHAAD, N.W. Immunochemical characterization of a subspecies-specific antigenic determinant of a membrane protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phytopathol.*, v.76, p.148-153, 1986.
- YOUNG, J.M. & TRIGGS, C.M. Evaluation of determinative tests for pathovar of *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.77, p.195-207, 1994.

Recebido em 13/9/01

Aceito em 22/4/02