

## COMUNICAÇÕES

### UMA NOVA BACTERIOSE DO TOMATEIRO EM VIÇOSA, MINAS GERAIS<sup>1</sup>

Dulândula Silva Miguel<sup>2</sup>  
Reginaldo da Silva Romeiro<sup>3</sup>  
José Rogério de Oliveira<sup>3</sup>

Muitas fitobactérias têm sido descritas por infectar o tomateiro (2). Na microrregião de Viçosa, onde o tomateiro é cultivado comercialmente por pequenos agricultores há muitas décadas, as bacterioses mais comuns são a murchadeira (*Pseudomonas solanacearum*), o cancro-bacteriano (*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*) e *Erwinia carotovora* causando canela-preta, talo-oco e podridão-mole\*.

Nos últimos anos, agricultores e extensionistas de Viçosa e municípios vizinhos têm trazido, freqüentemente, à clínica de fitobacterioses do Setor de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa plantas de tomateiro apresentando sintomas foliares diferentes daqueles ocasionados por fungos fitopatogênicos comuns na região. Testes de exsudação em gota têm sido positivos para esses casos, indicando uma etiologia bacteriana para a enfermidade.

No presente trabalho, esta fitobacteriose, desconhecida na região, é identificada e seu agente etiológico, descrito como espécie. A enfermidade não é nova no Brasil; já foi relatada em outras regiões do País, conforme ROBBS *et alii* (11).

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 15.02.1993

<sup>2</sup> Acadêmica de Agronomia da UFV e Bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

<sup>3</sup> Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, MG.

\*Informação pessoal de D. M. Rocha, extensionista da EMATER - MG, Viçosa (1992).

**Material e Métodos** – Testes de exsudação em gota (12) foram realizados transferindo-se fragmentos de lesão para gotas de água, em lâmina, observando-se, após colocação de lamínula, a preparação com o menor aumento do microscópio óptico. O isolamento foi feito a partir de fragmentos de tecido foliar retirados dos bordos da área necrosada. Os fragmentos foram imersos em álcool a 50%, por 20 segundos, desinfetados superficialmente com NaClO a 2%, por 2 minutos, macerados em uma gota de água estéril e, após 15 minutos, a suspensão semeada em meio 523 de KADO e HESKETT (5) pela técnica de estrias ou riscas (12). As placas foram incubadas a 28°C/48 horas. Colônias passíveis de serem da fitobactéria foram repicadas para o mesmo meio e testadas quanto à patogenicidade. Cinco isolamentos da bactéria foram obtidos, a partir de órgãos vegetais infectados de diferentes origens.

*Teste de Hipersensibilidade:* Suspensão de células do patógeno foi preparada em solução salina, a partir de cultura em meio sólido com 24 horas de idade e sua concentração ajustada para OD550 = 0,50, por turbidimetria (7). Folhas de feijoeiro e fumo foram infiltradas com auxílio de seringa hipodérmica, conforme KLEMENT *et alii* (8). As plantas-teste foram mantidas em casa de vegetação e examinadas 24 e 48 horas após a infiltração.

*Inoculação Artificial:* Suspensão de inóculo dos cinco isolamentos em teste foi preparada como para o teste de hipersensibilidade. Inoculação foi conduzida por atomização, seccionamento do limbo foliar com tesoura imersa em inóculo e injeção (13).

*Determinação do Gênero Fitopatogênico:* Visualização da célula bacteriana para efeito de estudo de forma e agrupamento foi feita pelo uso do método de Benians (3). Teste de coloração de Gram como descrito por ACKERMAN-BROWN (1). Produção de xantomonadinas foi investigada conforme metodologia descrita por LELLIOTT e STEAD (10). Utilização de asparagina foi estudada em meio descrito por STARR (17) e produção de pigmentos fluorescentes, pelo uso do meio de King B (6). Relações com o oxigênio livre foram investigadas tanto pelo uso de câmara de anaerobiose em que a ausência de oxigênio foi conseguida pelo reagente "Anaerocult" (Merk) (14), como pelo uso de meio de fermentação/oxidação (16).

*Determinação da Espécie Fitopatogênica:* Em se tratando de uma espécie fluorescente do gênero *Pseudomonas*, foram realizados os testes LOPAT conforme metodologia-padrão descrita por FAHY e PERSLEY (4), SCHAAD (16), LELLIOTT e STEAD (10), os quais consistiram em produção de levan, teste de oxidase, podridão-mole em batata, produção de desidrolase arginínica e hipersensibilidade em fumo.

**Resultados e Discussão** – Sempre que folhas de tomateiro com sintomas típicos da enfermidade eram submetidas ao teste de exsudação em gota (12) observava-se abundante exsudação de células bacterianas que saíam sob forma de massa ou nuvem de dentro do fragmento examinado. As massas de células situavam-se sempre nos bordos do fragmento, como esperado, e eram hialinas e abundantes.

Tentativas de isolamento em meio de KADO e HESKETT (5) resultaram sempre no aparecimento de colônias de coloração azulada clara quando observadas contra luz, pequenas, elevadas, de bordos regulares e brilhantes.

Os cinco isolamentos obtidos a partir destas colônias induziram reação de hipersensibilidade com menos de 24 horas em folha de feijão, fumo, maracujá e café. Os sintomas eram áreas necróticas, dessecadas e localizadas, não aumentando de tamanho com a idade.

Ao microscópio, pelo método de coloração de Benians, a bactéria evidenciava-se como bastonetes retos, isolados, regulares. O teste de Gram indicou serem todos os isolamentos Gram-negativos.

Provas realizadas para determinação do gênero fitopatogênico permitem posicionar os isolamentos em estudo no gênero *Pseudomonas*. Como todos eles produziram pigmentos fluorescente facilmente evidenciável sob luz ultravioleta (comprimento de onda de 380 nm), pode-se afirmar que todos eles pertencem ao grupo fluorescente do gênero.

Os testes LOPAT (Quadro 1) indicaram tratar-se da espécie *Pseudomonas syringae*, uma vez que os isolamentos em estudo exibiram fluorescência em meio de King B, induziram reação de hipersensibilidade ao fumo e comportaram-se como negativos no teste de oxidase, desidrolase arginínica, não produziram levan nem ocasionaram podridão-mole em batata (4, 16). Testes complementares, conforme preconizados por LELLIOTT e STEAD (10) e por KRIEG e HOLT (9) confirmaram os resultados, uma vez que os testes de utilização de L-histidina, eritritol e de atividade de nucleação de gelo foram negativos, descartando a possibilidade de se tratar do patovar *syringae*.

**Conclusões** – A enfermidade bacteriana de tomateiro surgida na região de Viçosa nos últimos anos é incitada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, espécie já descrita no Brasil (11) e em outros países (2).

Pertence ainda ao campo das hipóteses como a enfermidade surgiu na microrregião de Viçosa, mas a hipótese mais provável é via semente, uma vez que a presença do patógeno associado a sementes é mencionada por SEATLLER *et alii* (15). Inexistindo em nosso País controle rigoroso de qualidade de sementes comercializadas, é verossímil a hipótese. Mais estudos estão sendo realizados no Departamento de Fitopatologia da UFV para confirmar esta pressuposição.

QUADRO 1 - Características fisiológicas, bioquímicas e tintoriais para diferenciação de espécies fitopatogênicas de *Pseudomonas* do grupo fluorescente (4, 9, 10, 14)

CARACTERÍSTICA	<i>Pseudomonas</i>						
	<i>fluorescens</i>	<i>tolaasii</i>	<i>agarici</i>	<i>cichorii</i>	<i>viridiflava</i>	<i>syringae</i>	<i>isolamento em estudo</i>
Pigmento fluorescente	+	+	+	+	+	+	+
Hipersensibilidade em fumo	V	-	-	+	+	+	+
Produção de levan	+	-	-	-	-	V	-
Oxidase	+	+	+	+	-	-	-
Desidrolase arginínica	+	-	-	-	-	-	-
Podridão-mole em batata	+	-	-	-	+	-	-

(+) = Positivo para 80% ou mais dos isolamentos testados; (-) = Negativo para 80% ou mais dos isolamentos testados; (V) =

Reação variável; (ND) = Não-determinado para a espécie.

## SUMMARY

### (A NEW BACTERIAL DISEASE OF TOMATO IN VIÇOSA, MINAS GERAIS STATE)

In 1991 it was observed a new disease of tomato in commercial plantations at the region of Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. The disease shows up as necrotic lesions in leaves, either irregularly round or along leaf borders, initially small and increasing in size with age. These lesions are usually surrounded by a chlorotic halo. Drop exsudate tests indicated a bacterial etiology for the disease. From such lesions, it was consistently isolated a bacterium that gives rise to clear, opaque, regular, elevated and shining colonies. Inoculations tests rendered HR in leaves of coffee, tobacco, bean and passion fruit as well as typical disease symptoms in tomato leaves. The bacterium is a single, regular, straight, Gram-negative, strictly aerobic rod, unable to use asparagine as sole C and N source, unable to produce xanthomonadins, does not induce hypertrophic growth in the host, produces a blue fluorescent pigment, grows easily in routine culture media and was positioned in the genus *Pseudomonas*, fluorescent group. Biochemical, staining and biological tests indicate the pathogen belongs to the species *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

## LITERATURA CITADA

1. ACKERMAN-BROWN, A. M. *General Microbiology Manual - Microbiology 602*, 2nd.ed. Columbus, Ohio State University, Department of Microbiology, 1978. 130p.
2. BRADBURY, J. F. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. Ferry Lane, CAB International Mycological Institute, 1986. 332p.
3. CHAVES, G. M.; CARVALHO, M. G; CRUZ FILHO, J & ROMEIRO, R. S. *Roteiro de Aulas Práticas de Fitopatologia*. Viçosa, U.F.V., 1973. 58p.
4. FAHY, P. C & PERSLEY, G. J. *Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide*. Sidney, Academic Press, 1983. 393p.
5. KADO, C. I & HESKETT, M. G. Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. *Phytopathology*, 60: 969-979, 1970.
6. KING, E. O.; WARD, M. K. & RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44:301-307, 1954.
7. KIRALY, Z.; KLEMENT, A; SOLIMOSY, F. & VOROS, J. *Methods in Plant Pathology*. Budapest, Akad. Kiadó, 1970. 509p.
8. KLEMENT, Z.; RULDOPH, K. & SANDS, D. C. (eds.). *Methods in Phytobacteriology*. Budapest, Akadémiai Kiadó, 1990. 568p.
9. KRIEG, N. R & HOLT, J. G. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.I. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. 660p.

10. LELLIOTT, R. A. & STEAD, D. E. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease*. Oxford, Blakwell Scientific Publications, 1987. 216p.
11. ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J.; RIBEIRO, R. L. D. & KIMURA, O. A Commented list of bacterial plant pathogens occurring in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF PLANT PATHOGENS BACTERIA, 5, Cali, Colômbia, 1981. Proceedings, Cali, Colômbia, CIAT, 1981, p 601-613.
12. ROMEIRO, R. S. *Métodos em Bacteriologia de Plantas III - Isolamento de bactérias fitopatogênicas*. Viçosa, MG, Departamento de Fitopatologia da U.F.V., 1991. 55p. (Mimeografado).
13. ROMEIRO, R. S. *Identificação de Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa, U.F.V., 1976. 92p.
14. ROMEIRO, R. S. *Fundamentos de Bacteriologia de Plantas*. Viçosa, U.F.V., 1988. 50p.
15. SAETTLER, A. W.; SCHAAD, N. W. & ROTH, D. A.. *Detection of bacteria in seed - and other planting material*. Minneapolis, APS, 1989. 122p.
16. SCHAAD, N. W.(ed). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 2nd. ed. St. Paul, American Phytopathological Society, 1988. 158p.
17. STARR, M. P. The genus *Xanthomonas*. In: STARR, M. P. *et alii* (ed.). *The Prokaryotes*. Berlin, Springer-Verlag, 1981. p. 742-763.