

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

OCORRÊNCIA DE *PSEUDOMONAS CICHORII* EM
TOMATEIRO NO ESTADO DE SÃO PAULOT.A.F. Silva Júnior¹, L.O.S. Beriam¹, S.M. Azevedo², R. Gioria³, I.M.G. Almeida², A.C. Maringoni¹¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, CP 237, CEP 18603-970, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: tafsjr@uol.com.br

RESUMO

Recentemente, em dois campos comerciais de tomateiro dos tipos Salada e Italiano, localizados em Bragança Paulista e Mogi Guaçu, SP, foram observados sintomas de queima generalizada nas folhas. Em observações, ao microscópio óptico, de tecidos infectados, foi constatada a presença de exsudação bacteriana. Desses tecidos, foram isoladas bactérias em formato bastonete, Gram-negativas, com colônias de coloração branca e produtoras de pigmento fluorescente em meio B de King. Isolados bacterianos foram submetidos aos testes LOPAT, sendo enquadrados no grupo III (- + - - +) e, portanto, identificados como sendo *Pseudomonas cichorii*. Esses resultados foram corroborados por testes serológicos de imunofluorescência indireta, com antissoros produzidos para linhagem tipo de *P. cichorii*. Esta bactéria causa doença em várias culturas de importância econômica e ainda não havia sido constatada no Brasil na cultura de tomateiro. Os isolados bacterianos foram depositados na Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico, sob os números de acesso IBSBF 2309 e IBSBF 2323.

PALAVRAS-CHAVE: *Lycopersicon esculentum*, queima de folhas, testes LOPAT.

ABSTRACT

OCCURRENCE OF *PSEUDOMONAS CICHORII* ON TOMATOES IN SÃO PAULO STATE, BRAZIL. Recently, generalized blight symptoms were observed in tomato leaves of the types Salad and Italian, at two commercial fields located in Bragança Paulista and Mogi Guaçu, SP, Brazil. The presence of bacterial exudation was verified in observations of infected tissues under an optical microscope. Isolation attempts allowed the recovery of rod-shaped, Gram-negative bacteria, in white colonies that produced fluorescent pigment in King's B medium. Bacterial isolates were submitted to LOPAT tests and classified into group III (- + - - +); consequently, they were identified as *Pseudomonas cichorii*. These results were corroborated by indirect immunofluorescence tests, using antisera produced for the type strain of *P. cichorii*. This bacterium causes diseases in several crops of economic importance, and had not yet been observed on tomatoes in Brazil. Bacterial isolates have been deposited with the Phytobacteria Culture Collection of the Instituto Biológico, under accession numbers IBSBF 2309 and IBSBF 2323.

KEY WORDS: *Lycopersicon esculentum*, leaf blight, LOPAT tests.

A cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) está sujeita a várias doenças que podem limitar sua produção. Dentre as principais doenças da cultura, estão as de etiologia bacteriana causadas pelo gênero *Pseudomonas*. De acordo com KUROZAWA; PAVAN (2005), a principal bacteriose que ataca a parte aérea do tomateiro, cujo patógeno pertence a este gênero, é a pinta bacteriana ou mancha bacteriana pequena, sendo o agente causal *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye & Paula Wilkie 1978. Já a queima bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae*

pv. *syringae* van Hall 1902, é uma doença pouco conhecida e de ocorrência esporádica. Sua ocorrência foi constatada na região de Pato de Minas, MG, em 1993, no início do inverno (ALMEIDA *et al.*, 1994; MARINGONI *et al.*, 1994). Há relatos na da ocorrência de *Pseudomonas cichorii* em tomateiro, Austrália e em Cuba, porém até a presente data não tenha sido constatada no país.

No Brasil, *P. cichorii* é um patógeno de grande importância econômica, sua ocorrência foi descrita em culturas de diferentes espécies botânicas, tais

²Instituto Biológico, Centro Experimental Central, Campinas, SP, Brasil.³Sakata Seed Sudamerica, Bragança Paulista, SP, Brasil.

como almeirão, açafrão, berinjela, beterraba, brócolis, calêndula, cebola, cenoura, couve, corda de viola, crisântemo, dahlia, escarola, eucalipto, falsa-serralha, feijão, fumo, gérbera, inhame, mamona, manjeriço, pimentão, quiabo, rabanete, salsa, salsão e violeta. (MALAVOLTA JUNIOR *et al.*, 2008).

Em tomateiro, WILKIE; DYE (1973) relataram a ocorrência de *P. cichorii* colonizando caules de plantas, tanto em campo, como em cultivo protegido, em algumas regiões da Nova Zelândia e PEREZ, 1984 relatou pela primeira vez a ocorrência de *P. cichorii* em plantas de tomateiro em Cuba. Os sintomas da doença consistiam em manchas pequenas, escuras, quase negras, com formato irregular, que se encontravam em grande número sobre as folhas mais velhas, em plantas de aproximadamente um mês de idade.

P. cichorii se diferencia da espécie *P. syringae* por se tratar de uma bactéria fluorescente do Grupo IrRNA; é Gram-negativa, de formato bastonete, com um tufo de flagelos polares; não ocorre a formação de levan em meio de cultura NSA e a hidrólise de arginina e reação em discos de batata são negativos; a oxidase e reação de hipersensibilidade em folhas de fumo são positivos, colocando este organismo no Grupo III de Lelliot (BRADBURY, 1986).

SCHAAD *et al.* (2001) relataram os testes bioquímicos e nutricionais para identificação das espécies fitopatogênicas do gênero *Pseudomonas*. A identificação das espécies é principalmente baseada nos testes LOPAT, que incluem produção de "levan" em meio com sacarose, reação de oxidase, atividade pectinolítica em discos de batata, atividade de arginina dihidrolase, e reação de hipersensibilidade em folhas de fumo. O isolado tipo de *P. cichorii* caracteriza-se pela produção de pigmento fluorescente difusível e não produção de pigmento não difusível. Nos testes LOPAT, a bactéria é "levan" negativa, reage positivamente no teste de oxidase e de hipersensibilidade em folhas de fumo e negativamente para arginina dihidrolase e atividade pectinolítica. *P. cichorii* não cresce a 37° C, não reduz nitrato a nitrito e não utiliza gelatina. Utiliza 2-ketogluconato, manitol, meso-tartarato, D(-)-aspartato e não utiliza geraniol, benzoato, cellobiose, sorbitol, trehalose, sacarose, D(-)-tartarato, D-arabinose e L-rhamnose. É negativa para nucleação de gelo e produção de IAA.

Recentemente, foi observada em dois campos comerciais de tomateiro dos tipos Salada e Italiano, em Bragança Paulista e Mogi Guaçu, SP, respectivamente, a ocorrência de uma doença que causava queima generalizada nas folhas, que não se enquadrava nos sintomas de doenças bacterianas típicos causados por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Em observações microscópicas de tecidos infectados foi constatada a presença consistente de exsudação de células bacterianas que,

após coloração diferencial de Gram, revelaram ser bastonetes Gram-negativos. Nos isolamentos efetuados obteve-se bactérias de formato bastonete, Gram-negativos, com colônias de coloração branca e produção de pigmento fluorescente em meio B de King.

A constatação desta bactéria como patogênica às plantas de tomateiro motivou o presente trabalho que teve como objetivo caracterizar os isolados bacterianos originários do tomateiro por meio de testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e sorológicos.

Dois isolados bacterianos (IBSBF 2309 e IBSBF 2323) foram obtidos a partir de folhas de tomate com sintomas de queima bacteriana das folhas oriundas de dois campos comerciais de tomateiro dos tipos Salada e Italiano, em Bragança Paulista e Mogi Guaçu, SP, respectivamente. Os tecidos infectados foram submetidos a observações microscópicas e constatou-se a presença consistente de exsudação de células bacterianas. Em seguida, as folhas foram cortadas em pequenos pedaços, desinfestadas superficialmente em álcool 70%, por 30 segundos, e, depois, em hipoclorito de sódio 2%, por 1 minuto. Estes foram lavados em água destilada esterilizada e transferidos para um fundo de placa de Petri, onde foram triturados com o auxílio de um bastão de vidro previamente flambado e 5 mL de água destilada esterilizada. A suspensão foi repicada em placas de Petri contendo meio de cultura B de King (proteose peptona - 20 g, K₂HPO₄ - 1,5 g, MgSO₄.7H₂O - 1,5 g, glicerol - 10 g, ágar - 15 g, água destilada - 1.000 mL). As placas foram incubadas em estufa à temperatura de 28° C durante 48h. Após esse período, foi possível obter colônias de coloração branca e produtoras de pigmento fluorescente em meio B de King, Gram-negativos e em formato de bastonetes.

Os dois isolados foram preservados em frascos de penicilina contendo água destilada esterilizada e em tubos de ensaio contendo meio de cultura B de King inclinado com óleo mineral esterilizado e liofilizados (TUIE, 1969).

Para o teste de patogenicidade, os isolados bacterianos foram inoculados em plantas de tomateiro da cultivar Santa Clara, mantidas em casa de vegetação. As plantas de tomateiro foram submetidas a câmara úmida 24h antes e após a inoculação, para favorecer a penetração da bactéria no tecido da planta. O inóculo foi obtido pelo cultivo dos isolados em meio de cultura nutriente-líquido (NL) a 28° C, durante 48h, e posteriormente diluído em água destilada para se obter a concentração de 10⁷ UFC.mL⁻¹, empregando-se a escala turbidimétrica de Macfarland (LIMA *et al.*, 1997). A inoculação foi feita por pulverização da suspensão bacteriana nas faces abaxial e adaxial das folhas até o início de escorrimento em plantas de tomateiro no estágio de dois pares de folhas verdadei-

ras. O tratamento testemunha foi representado pela pulverização das plantas com água destilada e a avaliação realizada três dias após a inoculação.

Os isolados bacterianos obtidos foram submetidos a uma série de testes para a caracterização. As metodologias foram baseadas em MARINGONI (1995) e SCHAAD *et al.* (2001). Os seguintes testes morfológicos, fisiológicos e/ou bioquímicos foram empregados para caracterização dos isolados: teste de coloração diferencial de Gram; teste de solubilidade em hidróxido de potássio; testes de LOPAT (levan, oxidase, podridão de discos de batata, arginina dihidrolase e reação de hipersensibilidade em folhas de fumo) (LELLIOTT *et al.*, 1966); teste de hidrólise de gelatina, redução de nitrato a nitrito, aerobiose, caracterização das culturas em meio de cultura YDC, produção de fluoresceína em meio de cultura B de King. Para se verificar a produção de ácidos de carboidratos, foi utilizado o meio de cultura líquido de sais minerais de AYERS *et al.* (1919) e as fontes de carboidrato foram citrato, D-arabinose, D-celobiose, D-tartarato, D+trelose, glicerol, gluconato, L-tartarato, manitol, oxalato, rafinose, ramnose, sacarose, salicina e succinato.

Também foi realizado o teste de imunofluorescência indireta, empregando-se a metodologia utilizada por DEZORDI (2006). Foram utilizados dois antissoros policlonais obtidos a partir do isolado tipo de *P. cichorii* IBSBF 1784 de chicória (título 1:16) e do isolado IBSBF 2309 obtido de plantas de tomateiro (título 1:16). Os antígenos utilizados nas reações foram preparados a partir dos isolados IBSBF 2309 e IBSBF 2323 provenientes de tomateiro e os isolados tipo de *P. cichorii*, IBSBF 1784, de chicória, e GIR-1, de girassol. Presença de células bacterianas que emitiam fluorescência intensa de cor verde sob luz UV, em microscópio de epifluorescência, munido de lâmpada de vapor de mercúrio de 100 W, indicou reação

positiva. Como controle negativo foram utilizadas água destilada esterilizada e soro-normal (título 1:16) ao invés dos antissoros obtidos para *P. cichorii*.

No teste de patogenicidade, foi possível observar os sintomas da doença nas folhas inoculadas. Os sintomas iniciais foram lesões irregulares encharcadas que evoluíram para necrose irregular do limbo foliar, com ausência de halo clorótico ao redor das lesões (Fig. 1). Os sintomas observados assemelham-se em parte com os descritos por WILKIE; DYE (1973) e por PEREZ (1984), em tomateiro, e com aqueles provenientes das folhas coletadas em campo provenientes de Bragança Paulista e Mogi Guaçu. As bactérias foram re-isoladas dos tecidos das plantas de tomateiro utilizadas neste teste.



Fig. 1 - Sintomas de queima bacteriana em tomateiro cv. Santa Clara três dias após inoculação com o isolado IBSBF 2323.

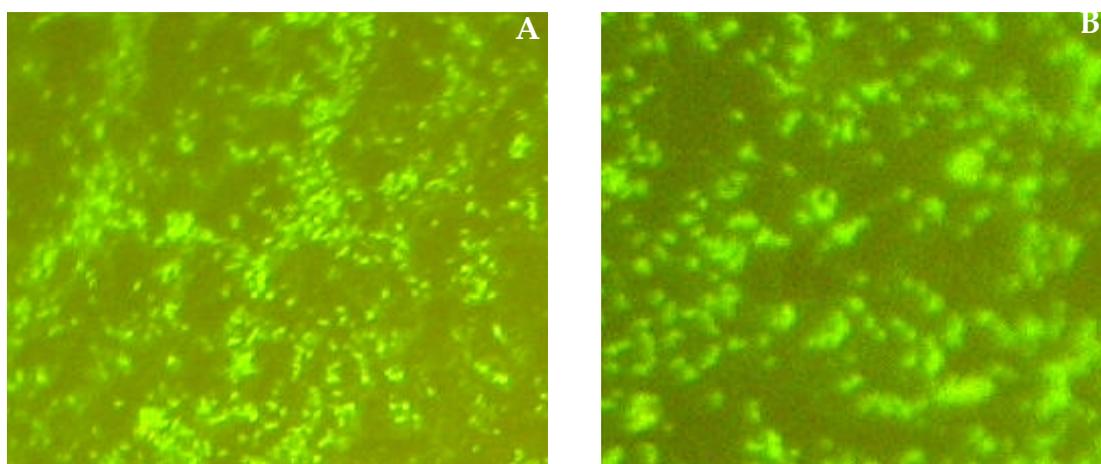


Fig. 2 - Reações dos isolados IBSBF 2309 (A) e IBSBF 2323 (B) de tomateiro com o antissoro policlonal do isolado tipo de *Pseudomonas cichorii* de chicória (IBSBF 1784).

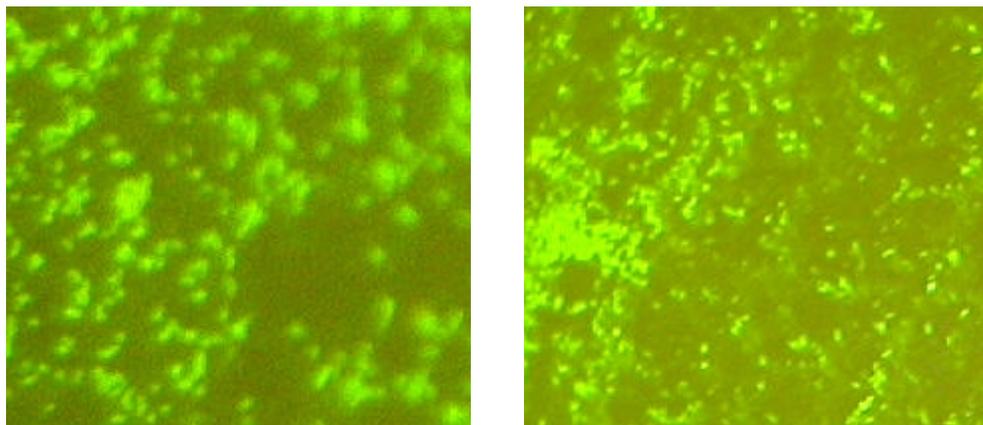


Fig. 3 - Reações dos isolados IBSBF 1784 (A) e GIR-1 (B) com o antissoro policlonal do isolado tipo de *Pseudomonas cichorii* de chicória (IBSBF 1784).

Os resultados dos testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos encontram-se descritos nas Tabelas 1 e 2, e revelaram consistência no resultados quando comparados com os descritos por WILKIE; DYE (1973) e SCHAAD *et al.* (2001), para *P. cichorii*. Os isolados foram Gram-negativos, com células em formato de bastonete; estritamente aeróbias, com colônias de coloração branca e produziu pigmento fluorescente em meio B de King. Houve a produção de ácido, em 14 dias, a partir de citrato, D tartarato, glicerol, gluconato, L tartarato, manitol, ramnose e succinato. Não foi produzido ácido, em 14 dias, a partir de D-arabinose, D-celobiose, D+trealose, oxalato, rafinose, sacarose

e salicina. Nenhum isolado reduziu nitrato a nitrito ou hidrolisou gelatina. No testes LOPAT, as culturas apresentaram resultados positivos para oxidase e hipersensibilidade em folhas de fumo, sendo negativos para a produção de levan, arginina dihidrolase e podridão em discos de batata.

Nos testes sorológicos de imunofluorescência indireta, foram obtidas reações positivas para os antígenos dos isolados IBSBF 2309, IBSBF 2323, AS 1784 e GIR-1 frente aos dois antissoros policlonais utilizados (Figs. 2 e 3). Os controles negativos foram caracterizados pela não emissão de fluorescência pelas células bacterianas tratadas com antissoro normal e com o conjugado.

Tabela 1 - Caracterização morfológica, cultural, bioquímica e fisiológica dos isolados IBSBF 2309 e IBSBF 2323 de *Pseudomonas cichorii* obtidos de tomateiro.

Testes	IBSBF 2309	IBSBF 2323	<i>P. cichorii</i> ¹
Morfologia	Bastonete	Bastonete	Bastonete
Coloração de Gram	Gram-negativo	Gram-negativo	Gram-negativo
Solubilidade em KOH	+	+	+
Coloração de colônia em meio B de King (BK)	Branca	Branca	Branca
Pigmento fluorescente em BK	+	+	+
Aerobiose	Aeróbica restrita	Aeróbica restrita	Aeróbica restrita
Hidrólise de gelatina	-	-	-
Colônias mucóide em meio YDC a 30° C	-	-	-
Testes LOPAT			
Levan	-	-	-
Oxidase	+	+	+
Podridão em discos de batata	-	-	-
Arginina dihidrolase	-	-	-
HR em folhas de fumo	+	+	+
Podridão em discos de batata	-	-	-
Redução de nitrato	-	-	-

¹Dados obtidos em SCHAAD *et al.* (2001).

+ reação positiva; - reação negativa.

Tabela 2 - Avaliação da produção de ácidos de várias fontes de carboidratos para os isolados IBSBF 2309 e IBSBF 2323 de *Pseudomonas cichorii* isolados de tomateiro.

Produção de ácidos a partir de	IBSBF 2309	IBSBF 2323	<i>P. cichorii</i> ¹
Citrato	+	+	+
D-arabinose	-	-	-
D-celobiose	-	-	-
D tartarato	+	+	+
D+trealose	-	-	-
Glicerol	+	+	+
Gluconato	+	+	+
L tartarato	+	+	+
Manitol	+	+	+
Oxalato	-	-	-
Rafinose	-	-	-
Ramnose	+	+	+
Sacarose	-	-	-
Salicina	-	-	-
Succinato	+	+	+

¹Dados obtidos em SCHAAD *et al.* (2001).

+ reação positiva; - reação negativa.

De acordo com os resultados obtidos, os isolados IBSBF 2309 e IBSBF 2323 foram identificados como *Pseudomonas cichorii*, sendo este o primeiro relato desta bactéria em tomateiro no Estado de São Paulo e possivelmente no país.

Não se conhece a origem do inóculo deste patógeno para a cultura do tomateiro. Entretanto, pode-se aferir a provável disseminação desta bactéria por sementes, uma vez que esta é uma das principais formas de disseminação em Cuba (AMAR; GARCIA, 1997), ou pela adaptação patogênica de *P. cichorii* ao tomateiro, visto que esta bactéria ocorre em inúmeras hospedeiras no Brasil (MALAVOLTA JÚNIOR *et al.*, 2008). Dependendo do grau de suscetibilidade da cultivar e das condições climáticas predominantes na cultura, este patógeno poderá se tornar importante juntamente com outros patógenos bacterianos que causam doença na parte aérea, uma vez que as medidas rotineiras de controle na cultura, principalmente o químico, com pulverizações de fungicidas cúpricos ou misturas cupro-carbamatos ou antibióticos, não têm apresentado resultados satisfatórios (McMANUS *et al.*, 2002; QUEZADO-DURVAL *et al.*, 2003).

REFERÊNCIAS

- 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.). *Summa Phytopathologica*, v.20, n.1, p.47, 1994.
- AMAR, Z.; GARCIA, A. Utilización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta em la detección de *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp em semillas de tomate y pimienta. *Fitosanidad*, v.1, n.1/4, p.4-9, 1997.
- AYERS, S. H.; RUPP, P.; JOHNSON, W. T. *A study of the alkali-forming bacteria in milk*. Washington D.C.: U. S. Department of Agriculture, 1919. (Bull 782).
- BRADBURY, J.F. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Kew: International Mycological Institute, 1986. 332p.
- DEZORDI, C. *Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para a detecção de Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum em sementes de algodão (Gossypium hirsutum L.)*. 2006. Dissertação (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2006.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.607-626.
- LELLIOTT, R.A.; BILLING, E.; HAYWARD, A.C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, v.29, p.470-489, 1966.
- LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J.R. *Métodos laboratoriais aplicados à clínica*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 669p.
- MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; BERIAM, L.O.S.; ALMEIDA, I.M.G.; RODRIGUES NETO, J.; ROBBES, C.F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1-87, 2008.
- MARINGONI, A.C.; KUROZAWA, C.; BARBOSA, V. Ocorrência de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em tomateiro na região de Pato de Minas, MG. *Summa Phytopathologica*, v.20, n.1, p.49, 1994.
- MARINGONI, A.C. *Apontamentos de técnicas em fitobacteriologia*. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 1995. 29p. (Boletim Didático, 8).
- McMANUS, P.S.; STOCKWELL, V.O.; SUNDIN, G.W.; JONES, A.L. Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, v.40, p.443-465, 2002.
- PEREZ, R.L. El tomate, Nuevo hospedante de *Pseudomonas cichorii* en Cuba. *Protección de Plantas*, v.7, n.2, p.27-35, 1984.

QUEZADO-DURVAL, A.M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R.P.; CAMARGO, L.E.A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. as-sociadas à mancha bacteriana do tomate para proces-samento industrial. *Horticultura Brasileira*, v.21, n.4, p.670-675, 2003.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. *Plant pathogen bacterias*. 3 ed. Saint Paul: APS Press, 2001. 373p.

TUITTE, J. *Plant Pathological methods – fungi and bacteria*. Lafayette: Burgess Publishing Company, 1969, 239p.

WILKIE, J.P.; DYE, D. W. *Pseudomonas cichorii* causing tomato and celery diseases in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.17, p123-130, 1973.

Recebido em 10/9/07

Aceito em 16/2/09