

33

Circular  
TécnicaBrasília, DF  
Novembro, 2004

## Desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico do 'fogo selvagem' do fumo, feijão e soja causado por *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci*

A bacteriose causada por *P. syringae* pv. *tabaci*, denominada 'fogo selvagem', pode afetar as culturas de fumo, feijão e soja. Foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos, na Carolina do Norte, em 1917 e atualmente é uma doença largamente distribuída no mundo. Enquanto em algumas regiões ocorre todos os anos e é muito destrutiva, em outras aparece esporadicamente, sendo o nível de danos variável de ano a ano, podendo passar despercebida ou causar grandes perdas. A bactéria afeta a planta em qualquer dos seus estádios de desenvolvimento, fundamentalmente na parte aérea. (AGRIOS, 1997).

### Autores

Elba Alvarez  
Rodriguez

Med. Veterinária, Dr.,  
Centro Nacional de Sanidad  
Agropecuaria (CENSA)  
(Havana, Cuba)

Abi S.A. Marques

Eng. Agr. Dr.,  
Embrapa Recursos Genéticos e  
Biotecnologia  
(Brasília - DF) E-mail:  
amarques@cenargen.embrapa.br



Os sintomas do 'fogo selvagem' aparecem usualmente nas folhas. As lesões se apresentam como manchas de aparência oleosa, começando nos bordos da folha e progredindo na direção do centro. Com a evolução da doença, o centro das lesões, as quais são circundadas por halo verde-amarelado, torna-se marrom, *P. syringae* pv. *tabaci* produz uma toxina denominada 'tabtoxina', que é responsável pela formação do halo clorótico nas folhas, em torno da lesão (BENDER et al., 1999). Em poucos dias, essas lesões, nem sempre circulares, podem alcançar diâmetro de 2 a 3 cm e coalescerem, originando a formação de lesões grandes e

**Embrapa**

irregulares, responsáveis por necrose e morte das folhas (ROBBS et al., 1981)

A bactéria pode sobreviver nas sementes por até dois anos, sendo esta a fonte primária de inóculo. Pode também sobreviver em restos culturais, plantas invasoras ou outros hospedeiros nativos, que servem como fonte de inóculo secundário. A disseminação da bactéria a grandes distâncias se dá por meio de sementes contaminadas e, dentro da cultura, por ação de chuvas e vento. As perdas mais severas ocorrem em anos de chuvas intensas associadas a vento e temperatura elevada (AGRIOS, 1997).

A principal medida de controle preconizada para o 'fogo selvagem' é o uso de sementes sadias. A adoção de medidas quarentenárias para impedir o estabelecimento da doença em áreas indenes deve, entretanto anteceder a todos os demais procedimentos. Existem recomendações para tratamento de sementes, tratamento dos canteiros, rotação de áreas para sementeira, destruição dos restos culturais na proximidade dos canteiros, rotação de culturas com espécies não hospedeiras de *P. syringae* pv. *tabaci*) e, finalmente, a fertilização adequada da cultura, evitando-se excesso de nitrogênio (RIBEIRO et al., 1979).

A certificação de sementes comerciais e a análise oficial em sistemas de quarentena dependem da padronização de métodos diagnósticos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi: estabelecer o padrão do patovar para a obtenção de uma metodologia de diagnóstico do 'fogo selvagem', que possa ser utilizada pelo sistema de vigilância sanitária vegetal em Cuba, para cujo país a enfermidade é exótica, bem como na análise de quaisquer materiais, no que diz respeito à presença de *P. syringae* pv. *tabaci*. Atualmente, em face da disponibilidade de diferentes metodologias de detecção e identificação e de informações sobre a diversidade de fitopatógenos, pressupõe-se a utilização conjunta de métodos selecionados, que permitam um diagnóstico eficiente de uma determinada doença (MARQUES et al., 2000). Neste estudo foram avaliados: métodos bioquímicos (características culturais, fisiológicas e nutricionais), métodos imunológicos e métodos moleculares para o estabelecimento do padrão de diagnóstico do 'fogo selvagem'.

• **Métodos bioquímicos (características culturais, fisiológicas e nutricionais de *P. syringae* pv. *tabaci*)**

- a) Características culturais – Em meio agar-nutriente, as colônias de *P. syringae* pv. *tabaci* são semi-transparentes de cor branco-cinza, circulares e de tamanho pequeno a médio. Suas células têm forma de bacilos e são móveis pela presença de flagelos polares, em número de até seis.
- b) Características fisiológicas e nutricionais – *P. syringae* pv. *tabaci* é uma bactéria aeróbica e Gram-negativa. A classificação de *Pseudomonas* spp., por sua resposta à presença de Levan, Oxidase, atividade pectinolítica (Pectinolise), Arginina dihidrolase e hipersensibilidade em fumo (“Tobacco”) é importante na separação entre espécies patogênicas e saprófitas, pois as patogênicas estão nos Grupos LOPAT I, II, III e IV, enquanto as do Grupo V são todas saprófitas. *P. syringae* pv. *tabaci* se enquadra no **Grupo LOPAT I A**. Características que diferenciam o pv. *tabaci* de outras pseudomonas fluorescentes desse grupo encontram-se na Tabela 1 (LELLIOTT et al., 1966; BRADBURY, 1986; SCHAAD, et al., 2001). Além dos testes constantes na Tabela 1, é necessária a realização de testes que confirmem a identificação ao nível de gênero e espécie, como: teste O/F (oxidação/fermentação), produção de pigmento fluorescente no meio B de King, catalase, redução de nitrato a nitrito e utilização dos seguintes carboidratos no meio básico ARJ: celobiose, manitol, sacarose e trealose (LELLIOTT e STEAD, 1987; GARDAN et al., 1999).
- c) Características biológicas – Essas características são avaliadas pela realização de teste de patogenicidade, visando à reação de hipersensibilidade em folhas de fumo, pela infiltração de suspensão na concentração de  $10^8$  ufc/ml, nos espaços internervares, com leitura feita 24 h após a inoculação, para a presença de necrose total da zona infiltrada (ROMEIRO, 2001). Realizam-se, também, teste de patogenicidade em espécies hospedeiras. Neste estudo foram usadas: feijão (*Phaseolus vulgaris*, cv. Roxão), soja (*Glycine max*, cv. Celeste) e fumo (*Nicotiana*

*tabaccum*, cv. TNN), em condições de casa de vegetação. As plantas de feijão e soja foram inoculadas 15 dias após o plantio e o fumo, dois meses após o plantio. A inoculação foi feita pela aplicação de suspensão bacteriana na concentração de  $10^7$  ufc/ml, preparada a partir de uma cultura de 48 h, na face abaxial das folhas, por fricção com gaze embebida na referida suspensão para o feijão e por pulverização para soja e fumo, tendo em vista resultados de ensaio preliminar. Foram utilizados os seguintes isolados: Emb.D134 (proveniente de feijão), Emb.D133 (*Áster*), Emb.D205 (soja) e Emb.D207 (fumo, isolado tipo). Os quatro isolados foram inoculados nos três hospedeiros e as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 h. As leituras foram realizadas diariamente durante 14 dias, observando-se o aparecimento dos sintomas. Ao final do experimento, foi feito reisolamento e identificação da bactéria.

Tabela 1 – Testes bioquímicos para a diferenciação de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* de outras espécies fluorescentes do gênero *Pseudomonas* \*.

Bactérias	Testes								
	HR	Arginina dihidrolase	Oxidase	Pectinase	Levan	Sorbitol	Eritritol	L-tartarato	Polipectato pH 5,0
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>helianthi</i>	+	-	-	-	+	+	+	v	-
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>delphinii</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	+	-	-	-	+	+	v	-	
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	+	-	-	-	+	+	-		
<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	+	-	-	-	+	-			
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	+	-	-	-	+	-			
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	+	-	-	-	+	-			
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	+	-	-	-	-	v			
<i>P. viridiflava</i>	v	-	-	+	-	+			
<i>P. cichorii</i>	+	-	+	-	-	-			
<i>P. fluorescens</i> IV	-	+	+	+	v	+			
<i>P. putida</i>	-	+	+	-	-	v			

\* Anotação das diferenças:

Reação de hipersensibilidade em fumo e arginina dihidrolase – *P. fluorescens* IV e *P. putida*

Oxidase – *P. cichorii*

Peptinase – *P. viridiflava*

Levan – *P. savastanoi* pv. *savastanoi*

Sorbitol – *P. savastanoi* pv. *glycinea*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, e *P. syringae* pv. *morsprunorum*.

Eritritol – *P. syringae* pv. *tomato*

L-tartarato – *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *psii*, *P. savastanoi* pv. *delphinii*

Polipectato pH 5,0 – *P. syringae* pv. *helianthi*

---

## • Métodos imunológicos

- a) Produção de antissoro – O antissoro específico para *P. syringae* pv. *tabaci* foi produzido através da injeção intravenosa de suspensão bacteriana ( $10^8$  ufc/mL), do isolado tipo da bactéria (gentilmente cedido pela Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, CFBP, Centre d'Angers, França), fixada com formol na proporção de 0,5%, em coelhos adultos da raça Nova Zelândia. Duas injeções semanais foram feitas na veia marginal da orelha dos coelhos por três semanas. Seis dias após a última injeção, uma alíquota de sangue foi retirada para avaliação do título do antissoro. Houve necessidade de uma imunização suplementar, repetindo-se o protocolo completo, pois o título não estava satisfatório logo após o primeiro esquema de imunização. Esse esquema de imunização intravenosa apresentou resultado satisfatório, obtendo-se título de anticorpos de 1:32, por imunodifusão dupla, quando se utilizou o antígeno (ag) obtido por ruptura celular com SDS e calor, que permitiu a observação de bandas mais nítidas, entre os três antígenos avaliados.
- b) Titulação do antissoro – Esse procedimento foi conduzido em camada de agarose a 1% em tampão PBS, em lâminas microscópicas, colocando-se o antígeno no orifício central e as diluições do antissoro, até 1:64, nos orifícios externos. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e a leitura se fez 24, 48 e 72 h após, por observação de bandas de precipitação entre os orifícios correspondentes ao antígeno e o antissoro.
- c) Determinação da especificidade – Após a determinação do título do antissoro, foi verificada a especificidade do mesmo frente às seguintes

bactérias: *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *coronafaciens*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas campestris* pv. *glycinea* e *Erwinia carotovora*. Não se observaram reações cruzadas com as espécies do gênero *Pseudomonas* avaliadas, nem com outros gêneros de bactérias fitopatogênicas. O antissoro reconheceu todos os isolados de *P. syringae* pv. *tabaci*, independentemente da planta hospedeira de onde foram obtidos. Assim, essa técnica pode ser adotada para a identificação de *P. syringae* pv. *tabaci*, pois além da comprovada eficiência e especificidade, é de simples execução.

d) Aplicação da técnica da imunodifusão dupla – Para a padronização dessa técnica, foram utilizados os antígenos obtidos a partir de *P. syringae* pv. *tabaci* (isolado tipo) aplicando-se os seguintes tratamentos:

- 1) calor a 100 °C/1 hora, em água;
- 2) calor a 100 °C/1 hora, em solução contendo 0,34 mL de HCl, 0,5 mL de mercapto etanol, 10 mL de água destilada e 0,14 mL de SDS a 10%;
- 3) calor a 100 °C/1 hora, em solução de SDS a 10%;
- 4) ruptura das células por ultra-som, três ciclos de 3 min;
- 5) uso de células inteiras em concentração superior a 10<sup>9</sup> ufc/ml, em água destilada estéril.

O tratamento com calor a 100 °C/1 hora, em solução de SDS a 10% foi o que apresentou melhor resultado, quando se observaram bandas mais nítidas.

e) Aplicação da técnica ELISA – Para a padronização dessa técnica, foram purificadas as imunoglobulinas, por precipitação com sulfato de amônio. Utilizou-se a técnica ELISA indireta e foram avaliados dois protocolos (CROWTHER, 1995). No processo de otimização do teste, foram avaliadas as seguintes diluições das gamaglobulinas: 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000. Avaliaram-se, também, as diluições do conjugado (Sigma A - 0418 anti-Rabbit) marcado com fosfatase alcalina: 1:1200, 1:1500 e 1:200.

Utilizou-se o substrato Pnpp (Sigma Fast™ Pnpp, Soluble Alkaline Phosphatase Substrate, p-Nitrophenyl Phosphate). Na padronização da técnica ELISA, a diluição ótima da IgG foi de 1:400 e a do conjugado, de 1:1200. O esquema que melhor funcionou foi aquele onde se utilizou a solução da amostra em tampão carbonato e o bloqueio da placa com BSA, após aplicação da amostra. Nestas condições, foi possível detectar positividade em nível de concentração bacteriana na suspensão de  $10^4$  ufc/ml, sem a presença de reações cruzadas com as demais bactérias usadas como controle, fluorescentes ou não. Da mesma forma, a coloração nos poços com tampão (controle negativo) foi totalmente transparente, sem ocorrência de fundo que interferisse na interpretação dos resultados.

#### • Métodos moleculares

- a) PCR com primers específicos – Em 2001 foram desenvolvidos primers específicos, a partir do gen que codifica a tabtoxina, para isolados de *P. syringae* produtores de tabtoxina, entre os quais *P. syringae* pv. *tabaci* (LYDON e PATTERSON, 2001). Os primers amplificaram um fragmento de 829 pb de todos os isolados testados, completando assim o conjunto de técnicas disponíveis para detecção e identificação de *P. syringae* pv. *tabaci*.

#### Referências Bibliográficas

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 803 p.

BENDER, C. L.; ALARCÓN, C. F.; GROSS, D. C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington-DC, v. 63, p. 266-292, 1999.

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Wallingford: C.A.B INTERNACIONAL MYCOLOGICAL INSTITUTE, 1986. 332 p.

CROWTHER, R. J. **Methods in molecular biology**: ELISA theoría and practice. [S.I.]: Humma Press, 1995. v. 42.

GARDAN, L.; SHAFIK, H.; BELOUIN, S.; BROSCHE, R.; GRIMONT, P.; GRIMONT, P. A. D. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex. Sutic and

Dowson 1959). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington-DC, v. 49, p. 469-478, 1999.

LELLIOTT, R. A.; BILLING, E.; HAYWARD, A. C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 29, p. 470-489, 1966.

LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. **Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987. 216 p.

LYDON, J.; PATTERSON, C. D. Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 32, p. 166-170, 2001.

MARQUES, A. S. A.; CORBIERE, R.; GARDAN, L.; TOURTE, C.; MANCEAU, C.; TAYLOR, J. D. ; SAMSON, R. Multiphasic approach for the identification of the different classification levels of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, p. 715-734, 2000.

RIBEIRO, R. L. D.; HAGEDORN, D. J.; DURBIN, R. D.; UCHYTIL, T. F. Characterization of the bacterium inciting bean wilfire in Brasil. **Phytopathology**, St.Paul, v. 69, p. 208, 1979.

ROBBS, C. F.; RODRIGUES NETO, J.; RIBEIRO, R. L. D. Annotated list of bacterial plant pathogens. In: BRASIL. INT. CONT. PLANT. BACT., 5., 1981, Cali. **Proceedings...** [S.l.: s.n], 1981. p. 602-612.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2001. 279 p.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Plant pathogenic bacteria**. 3. ed. St. Paul:

<p>Circular, Técnica 33</p> <p>Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento</p>	<p>Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Serviço de Atendimento ao Cidadão Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) – Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624 <a href="http://www.cenargen.embrapa.br">http://www.cenargen.embrapa.br</a> e.mail:sac@cenargen.embrapa.br</p> <p>1ª edição 1ª impressão (2004): 150 unidades</p>	<p>Comitê de Publicações</p> <p>Expediente</p>	<p><b>Presidente:</b> <i>Maria Isabel de Oliveira Penteado</i> <b>Secretário-Executivo:</b> <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i> <b>Membros:</b> Arthur da Silva Mariente Maria Alice Bianchi Maria da Graça S. P. Negrão Maria de Fátima Batista Maria Isabel de O. Penteado Maurício Machain Franco Regina Maria Dechechi</p> <p>Carneiro Sueli Correa Marques de Mello Vera Tavares de Campos</p> <p>Carneiro</p> <p><b>Supervisor editorial:</b> <i>Maria da Graça Simões Pires Negrão</i> Normalização Bibliográfica: <i>Maria Alice Bianchi</i> <b>Editoração eletrônica:</b> <i>Altevir de Carvalho Freitas</i></p>
--	--	--	---