

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**REAÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PLANTAS À INFILTRAÇÃO DE  
BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS**

**RENATA LISE SOARES DA ROSA E SILVA**

Monografia apresentada ao Curso de  
Agronomia, da Universidade Federal  
de Uberlândia, para obtenção do  
grau de Engenheiro Agrônomo.

Uberlândia – MG  
Novembro-2000

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**REAÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PLANTAS À INFILTRAÇÃO DE  
BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS**

**RENATA LISE SOARES DA ROSA E SILVA**

**ORIENTADOR: PROF. Dr. ARMANDO TAKATSU**

Monografia apresentada ao Curso de  
Agronomia, da Universidade Federal  
de Uberlândia, para obtenção do  
grau de Engenheiro Agrônomo.

Uberlândia – MG  
Novembro – 2000

**REAÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE PLANTAS À INFILTRAÇÃO DE  
BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS**

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM 23 / 11 / 2000

---

Prof. Dr. Armando Takatsu  
Orientador

---

Prof. Dr. Fernando César Juliatti  
Conselheiro

---

Prof. Dra Marli A. Ranal  
Conselheira

Uberlândia – MG  
Novembro - 2000

## **Dedicatória**

À meu filho VÍTOR SOARES LAZZARINI.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida e oportunidade de realizações.

Ao meu querido esposo Guilherme Lazzarini, que foi graças a sua dedicação e apoio que pude realizar este trabalho.

Aos meus pais Milon e Giselda por estimularem a realização deste trabalho e pelo amor de cada dia, me proporcionando força para continuar seguindo este caminho.

A minha irmã Maira a qual me inspirou esta atividade profissional e ao meu cunhado Ricardo pela atenção e carinho no decorrer dos meus estudos.

A família Lazzarini que me acolheu como filha e me deu grande força durante este tempo.

As minhas avós adotivas Maria e Marina pelo grande carinho e apoio cedidos a mim e a meu filho.

As minhas especiais amigas Lenita Borges e Cristiana Boaventura que estiveram comigo tanto na alegria como nas horas mais difíceis. E também a meus amigos mais recentes e tão presentes, Marcelo Prudêncio Giovanini, Renata Almeida, Tatiana Lourenço, Clyver Quireza e Cristina Kenne que sem eles este 10º período não se tornaria tão prazeroso como esta sendo.

A minha tia Célia por ter sido minha amiga e sempre acreditar em mim.

A Geórgia Teixeira, Gustavo Lazzarini e Cristiana Boaventura pela tradução de textos em inglês permitindo-me incluir neste trabalho assuntos explicativos.

A Dulcimar pela presença constante ao lado de meu filho, me ajudando a concretizar meu sonho como Agrônoma.

Ao pessoal do laboratório LAFIP, Débora, Marlus, Roberto, Simone, Rose, Mário, Cristina, Antônio e Rubens que me ajudaram e torceram por mim na realização desta monografia.

Aos amigos Pereira, Prado e Oswaldo da Horta do Núcleo Servos Maria de Nazaré pela oportunidade de aprender e colocar e praticar meus conhecimentos adquiridos no curso.

Aos funcionários Josi, Joana, Auxiliadora, Aires, Adílio, Carmem, Jane e Joaquim pelo carinho com todos os alunos.

Ao Instituto de Ciências Agrárias e a meus professores que muito fizeram por mim.

Em especial ao meu orientador Armando Takatsu pela sua orientação tão sábia e simples e pela sua amizade que muito me estimulou.

Aos meus conselheiros Marli Ranal e Fernando César Juliatti pelo apoio neste trabalho.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1. Teste de hipersensibilidade.....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1. Isolados de bactérias utilizadas .....	18
3.2. Recuperação dos isolados.....	19.
3.3. Preparo de suspensão bacteriana.....	20
3.4. Infiltração de bactérias.....	20
3.5. Plantas utilizadas.....	21
3.6. Avaliação da reação.....	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>33</b>

## RESUMO

Todas as fitobacterioses são importantes em virtude da gravidade com que atacam culturas de valor econômico uma vez que após seu surgimento é impossível curar a planta infectada. O objetivo do presente trabalho foi encontrar outras plantas além do fumo para serem utilizadas nos testes rápidos de patogenicidade de bactérias isoladas de plantas. Foram testadas 34 espécies de 27 famílias de plantas, com 10 isolados de fitobactérias, englobando 5 gêneros. O teste foi realizado por meio de infiltração da suspensão concentrada de fitobactérias de mais de  $1 \times 10^9$  UFC/ml, sob a epiderme, nos espaços internervais da face inferior das folhas destacadas, mantidas em água. A comprovação de que a bactéria em teste foi fitopatogênica ocorreu pela morte (reação de hipersensibilidade) dos tecidos infiltrados em até 48 horas após a infiltração. Foram selecionadas 16 espécies que apresentaram resultados positivos em pelo menos uma das bactérias testadas. Na seleção dessas plantas foram consideradas também a facilidade de infiltração, estabilidade na condição de folhas destacadas mantidas em água e a disponibilidade da espécie. A identificação de espécies de plantas como cheflera (*Shefflera arboricola*), ligustro (*Ligustrum sinense*) e couve-da-malásia (*Brassica chinensis* . var. *parachinensis*) que



apresentaram reação de hipersensibilidade a fitopatógenos como *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* e patovares de *Xanthomonas campestris* que dificilmente induzem reação em fumo foi o resultado mais significativo deste trabalho, pois vem facilitar e agilizar o trabalho de diagnose daquelas fitobactérias sem ter que recorrer ao teste de patogenicidade em planta hospedeira suscetível, onde a bactéria *Xanthomonas campestris* p.v. *visicatoria* foi a que apresentou resposta à reação de hipersensibilidade a um maior número de plantas.

## 1 - INTRODUÇÃO

As bactérias são importantes patógenos de plantas em virtude da gravidade com que atacam culturas de valor econômico, pela facilidade com que se disseminam e também pela dificuldade de controle.

No Brasil, as doenças causadas por bactérias são inúmeras e todas as fitopatogênicas possuem forma de bastonetes, não formam esporos, são aeróbias estritas (com exceção de espécies do gênero *Erwinia* que podem ser anaeróbias facultativas), preferem pH neutro e a temperatura ideal de crescimento está entre 25° - 30° C.

A identificação de bactérias é feita em função de grande número de caracteres fisiológicos, bioquímicos e estruturais e não pelos morfológicos como é na maioria dos seres vivos. Assim sendo, é fundamental que a bactéria a ser identificada seja isolada primeiramente em cultura pura para que aqueles caracteres possam ser examinados.

Nos trabalhos de isolamento, entretanto, é regra e não exceção, o crescimento de mais de um tipo de bactéria. Isto porque as bactérias são componentes da flora natural de plantas, animais e de toda a estrutura do Globo terrestre onde habitam seres vivos. Assim sendo, quando se pretende isolar bactérias patogênicas das lesões de plantas, é fundamental

que se faça o teste de patogenicidade logo após o desenvolvimento das colônias para separar as patogênicas das demais bactérias isoladas. Somente depois de identificadas

como fitopatogênica, as demais características serão definidas para a identificação até espécie, subespécie ou patovar.

Em trabalhos de diagnose de rotina, em que o produtor necessita urgentemente do laudo da diagnose para tomar as medidas apropriadas de controle da doença que está ameaçando a sua cultura, este teste deve ser aquele que apresente o resultado em tempo mais curto possível.

Os testes rápidos utilizados rotineiramente em trabalhos de diagnose de doenças bacterianas de plantas são o de infiltração da suspensão da bactéria em folha de fumo, conhecido também como teste de hipersensibilidade (Klement, Farkas & Lovreckovich, 1964), e o de podridão mole em fatias de batata sob condição de câmara úmida, nos quais os resultados são obtidos em 24 horas e excepcionalmente em 48 horas. O primeiro pode ser feito em folhas destacadas e mantidas em copo com água e é utilizado para fitobactérias que causam necrose nos tecidos das plantas e o segundo para as que causam a podridão mole.

A reação de hipersensibilidade é um fenômeno comum e bem conhecido e é produzido no hospedeiro como uma resposta à infecção de bactérias, fungos e vírus. Esta reação baseia-se no fato de que muitas bactérias fitopatogênicas são capazes de causar necrose rápida (10 a 24 horas) em tecido de folha de fumo, desde que não sejam patógenos desta planta (Klement, 1963; Klement, Farkas & Lovreckovich, 1964), quando inoculadas com suspensão aquosa em concentração elevada, com cerca de  $10^8$  u.f.c (unidades formadoras de colônia) por mililitro, enquanto que as bactérias saprófitas não causam nenhuma reação neste período de tempo. Esta reação em folhas de fumo tem se tornado um

teste padrão para teste de patogenicidade de isolados de bactérias em plantas (Klement & Lovrekovich, 1961) e normalmente vem sendo utilizada para estudos de vários gêneros de bactérias.

Praticamente todas as bactérias que causam a podridão mole, de diferentes plantas hospedeiras, apresentam reação positiva em teste de batata. Entretanto, não ocorre o mesmo com as bactérias que causam lesões necróticas, quando infiltradas em folha de fumo. Muitas espécies, especialmente as *Xanthomonas* e *Clavibacter* estão neste grupo. Por este motivo, os testes de patogenicidade destas bactérias são feitos em respectivas plantas hospedeiras suscetíveis, o que retarda a emissão de laudo nos trabalhos de diagnose.

Encontrar alguma espécie de planta que seja hipersensível à infiltração destas bactérias é um passo importante para permitir a diagnose mais rápida das doenças causadas por estas bactérias.

As plantas de fumo têm também a inconveniência da necessidade de renovação a cada dois a três meses. Uma planta ideal seria uma espécie perene para se ter folhas disponíveis para teste por longo tempo, sem a necessidade de renovação da planta. É preciso também ser facilmente infiltrada, podendo ser cultivada em vasos ou em canteiros. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo encontrar uma planta que apresente reação de hipersensibilidade à maior gama de bactérias fitopatogênicas, que possa ser infiltrada com facilidade, que apresente folhas disponíveis para teste por maior período de tempo e que seja facilmente cultivada em condição de vaso ou de canteiro.

## 2 – REVISAO DE LITERATURA

### 2.1. Teste de hipersensibilidade

A reação de hipersensibilidade (HR) em resposta a bactérias patogênicas de plantas foi primeiramente reconhecida por Klement et al. (1964) Uma técnica de inoculação desenvolvida por Klement, 1963 possibilitou uma fácil penetração nos tecidos de plantas com uma concentração conhecida de bactéria e foi de suma importância na demonstração de bactérias patogênicas de plantas induz a hipersensibilidade em resposta a um hospedeiro resistente e à planta não hospedeira (Goodman, Kirali, & Zaitlin 1967).

Klement, Farkas & Lovrekovich (1964) testaram 22 diferentes espécies de pseudomonas e ou seus patovares, incluindo o patógeno do fumo (compatível) - *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* e cinco espécies saprofíticas no tecido da folha de fumo. A expressão de sintomas a partir do inóculo contendo  $10^6$  células por ml foi a seguinte 1) Quando *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* foi usada, os sintomas apareceram aproximadamente em três - cinco dias depois da inoculação, porque com o avanço do tempo a bactéria se espalhou dentro dos tecidos inoculados causando o desenvolvimento vagaroso, ampliando progressivamente as lesões necróticas típicas de doenças bacterianas. 2) Outras bactérias fitopatogênicas induziram um colapso celular (reação hipersensitiva)

em nove horas e subseqüentemente, a dessecação do tecido infiltrado. 3) As pseudomonas saprófitas não apresentaram nenhum sintoma visível.

A interrupção da multiplicação das bactérias fitopatogênicas dentro de um período de 24 horas, aparentemente foi devido ao colapso do tecido hospedeiro infectado, pois uma vez que o patógeno tenha sido introduzido na planta, ocorre sua multiplicação no espaço intercelular no tecido do hospedeiro e neste espaço o patógeno se estabiliza, degradando o meio intercelular e o material da parede da célula, causando o sintoma típico da doença ou é suprimido pela defesa natural do hospedeiro. A condição usual de manifestação é mais forte quando a combinação patógeno-hospedeiro é incompatível e também este método de infiltração em folha de fumo é utilizado somente para bactérias que causam manchas e lesões nas partes aéreas (folhas, frutos, hastes) das plantas, assim como as que causam infecções vasculares.

Nas horas seguintes após a inoculação, havendo uma indução da reação de hipersensibilidade pelo patógeno (dependendo da umidade relativa ao redor), os tecidos facilmente crescem, enquanto o turgor (rigidez de células de plantas) é perdido. O tecido murcha e dentro de 24 horas colapsa completamente . A população bacteriana declina e a bactéria sobrevivente permanece confinada no local de inoculação. Somente tecido inoculado com bactéria viva incompatível provoca morte celular e conseqüentemente dos tecidos. Esse necrosamento da área infiltrada é geralmente devido à reação da planta à bactéria infiltrada através da produção de compostos orgânicos tóxicos que matam as bactérias e o tecido próximo. Em alguns casos, o necrosamento se dá também por toxinas ou enzimas produzidas pela bactéria. Em qualquer um dos casos, comprova-se que a

bactéria testada é fitopatogênica, pois nenhuma bactéria saprófita causa reação dentro deste período (12 a 48 horas). Entretanto, quando o resultado é negativo, não se pode concluir nada, pois existem bactérias fitopatogênicas que não induzem reação rápida em folhas de fumo, mesmo sendo a interação planta-bactéria incompatível. Cada patovar bacteriano pode causar doença em um ou em poucos hospedeiros de relacionado; no entanto, a patogenicidade bacteriana é altamente específica. Isto pode-se desenvolver em qualquer momento que a patovar bacteriano esteja em contato físico com células de um hospedeiro incompatível ou de planta não hospedeira (Klement, 1982) e o nível final da população bacteriana depende do número de células que iniciaram a infecção e da sua compatibilidade com o hospedeiro. Uma vez que os sintomas da reação de hipersensibilidade são manifestados somente por plantas inoculadas por bactérias fitopatogênicas e não por saprófitas, a reação de hipersensibilidade em folhas de fumo ou outros tecidos, vagem por exemplo (Klement & Lovrekovich, 1961), tem-se tornado um teste padrão para patogenicidade de bactérias isoladas.

Uma vez que o patógeno tenha sido introduzido na planta, ocorre sua multiplicação, sem exceção, no espaço intercelular no tecido do hospedeiro, neste espaço o patógeno se estabiliza, degradando o meio intercelular e o material da parede da célula, causando o sintoma típico da doença, ou é suprimido pela defesa natural do hospedeiro. Após a invasão da bactéria, ela não pode fazer contato direto com a membrana da célula da planta viva, pois a parede da célula é o contato mais próximo possível. Todos os sinais entre a bactéria e as células do hospedeiro precisam passar através da parede celular, através do apoplasto onde ocorre a condução de água e solutos. Estes tem a função de nutrir tanto a

célula vegetal como a bactéria que está colonizando o meio, pois os solutos que passam pelos plasmodesmos são toda a fonte de difusão de nutrientes que passa através da parede celular.

Os patógenos bacterianos após a infiltração na folha começam se a multiplicar e colonizar o espaço intercelular de seus respectivos hospedeiros. O fluído intercelular pode suportar o crescimento de bactéria saprofíticas, tanto quanto da bactéria patogênica, independentemente de compatibilidade e incompatibilidade com o hospedeiro dado. Entretanto, a bactéria pode usar essas condições nutricionais favoráveis somente quando elas estão numa situação compatível.



### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da UFU em Uberlândia – MG, utilizando-se bactérias de várias espécies, de diferentes gêneros, da Coleção de Bactérias Fitopatogênicas da UFU, preservada por dessecação em papel de filtro (Takatsu, 1980).

#### 3.1. Isolados de bactérias utilizados

Foram utilizadas as bactérias atualmente disponíveis na Coleção de Bactérias Fitopatogênicas do Laboratório de Fitopatologia da UFU, listadas a seguir: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*, agente causal do cancro bacteriano do tomateiro e do pimentão, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye & Wilkie, agente causal da pinta bacteriana do tomateiro, *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp, agente causal da mancha zonada da alface e da chicória, *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye, agente causal da bacteriose do maracujazeiro, *X. campestris* pv. *manihotis* (Bondar) Dye, agente causal da bacteriose da mandioca, *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, agente causal da mancha bacteriana do tomateiro e do pimentão, *X. campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye, agente causal do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, *Ralstonia solanacearum* agente causal da murcha

bacteriana da batata e do tomateiro, *Erwinia chrysanthemi* Burkholder, Mcfadden & Dimok, causa podridão mole em grande número de espécies hospedeiras, tanto no campo como também em pós-colheita; na batata causa também a doença conhecida como canela preta e em tomateiro, o talo oco, e *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, que causa a bacteriose da videira.

### **3.2. Recuperação dos isolados**

As bactérias preservadas por dessecação em tiras de papel de filtro foram recuperadas transferindo-se um pedaço de papel sobre o meio de cultura (meio 523) em placa de Petri e incubando-as a 25-30<sup>0</sup>C , por dois a três dias.

O meio de cultura 523 é preparado com a seguinte composição para o volume de 1 litro: 10g de dextrose ou sacarose, 8g de caseína hidrolisada, 4g de extrato de levedura, 2g de fosfato de potássio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 300 mg de sulfato de magnésio, e 20g de agar.

### **3.3. Preparo de suspensão bacteriana**

A suspensão bacteriana foi preparada em água destilada e esterilizada contendo cada uma das culturas puras a serem testadas (10 ml em tubo de ensaio), utilizando-se somente culturas novas em desenvolvimento (culturas de dois a três dias a 28 - 30<sup>0</sup> C). A concentração da suspensão foi ajustada em função da turvação equivalente à escala 7 de McFarland (Király et al., 1974), o que equiivale a uma concentração de 1 a 3 x 10<sup>9</sup> UFC/ml.

Para o preparo da escala 7 de turvação de McFarland em tubo de ensaio foram utilizadas as seguintes soluções: Ácido sulfúrico 1% 9,6 ml e Cloreto de bário a 1% 0,4 ml. Nesta mistura forma-se um precipitado branco insolúvel de sulfato de bário. O tubo é

lacrado hermeticamente para impedir a evaporação e deve ser agitado antes do uso. Esta é a solução padrão para comparação da turvação da suspensão bacteriana para os testes de infiltração.

### **3.4. Infiltração de bactérias**

Galhos com folhas de diferentes espécies de plantas foram coletados e mantidos em vasos com água. A infiltração da suspensão bacteriana foi efetuada sob a epiderme, no espaço internerval da face inferior da folha, por meio de uma seringa de 3 ml sem agulha, mas antes deve-se fazer um pequeno furo com agulha no centro do espaço internerval, ajustar a seringa neste furo apoiando-se com o dedo pelo lado oposto da folha e infiltrar lentamente a suspensão até formar uma área encharcada de aproximadamente 1 cm de lado. A área infiltrada toma um aspecto encharcado, adquirindo coloração verde mais escuro que o normal, que desaparece quando a água é absorvida pelos tecidos da folha, dentro de 20 a 30 minutos.

Os testes de infiltração foram feitos com cinco repetições. Em caso de dúvidas, os testes foram repetidos.

### **3.5. Plantas utilizadas**

Foram utilizadas no teste 34 espécies de plantas, a maioria ornamentais, pertencentes a 27 famílias. Os nomes populares, nomes científicos, famílias e a morfologia externa estão na Tabela 1.

Tabela 1. Identidade e características morfológicas externas das plantas utilizadas no teste.

Nome popular	Nome científico	Família	Morfologia externa da folha
Antúrio	<i>Anthurium andraeanum</i> Lind.	Araceae	Fortemente coriácea
Araruta	<i>Marantha arundinacea</i> L.	Marantaceae	Coriácea
Azaléia	<i>Rhododendron x simsii</i> Planch.	Ericaceae	Membranosa, pilosa
Begônia metálica	<i>Begonia aconitifolia</i> A.DC.	Begoniaceae	Levemente suculenta
Bela-emília	<i>Plumbago capensis</i> Thunb.	Plumbagina-ceae	Membranácea
Beldroega	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Portulacaceae	Suculenta
Bico-de-papagaio	<i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd.ex Klot.	Euphorbiaceae	Membranácea leitosa
Café-de-salão-dourado	<i>Aglaonema pseudo-bracteatum</i> Hort.	Araceae	Fortemente coriácea
Cambará	<i>Lantana-camara</i> L.	Verbenaceae	Membranácea, pilosa
Cheflera	<i>Shefflera arboricola</i> (Hay.) Merr.	Araliaceae	Fortemente coriácea
Cordiline	<i>Cordilyne terminalis</i> Kunth.	Liliaceae	Fortemente coriácea
Costela-de-adão	<i>Mostera deliciosa</i> Liebm	Araceae	Fortemente coriácea
Couve-da-malásia	<i>Brassica chinensis</i> L. var. <i>parachinensis</i> (Bailey) Sinskaja.	Brassicaceae	Membranácea
Cróton	<i>Cordiaum variegatum</i> Blume	Euphorbiaceae	Fortemente coriácea
Flor- de- cera	<i>Hoya carnososa</i> R.Br.	Asclepiadaceae	Espessa e cerosa
Flor de maio	<i>Schlumbergera truncata</i> (Haw.) Mor.	Cactaceae	Suculenta
Fumo	<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	Membranosa pilosa

...continua...

Tabela 1, Cont.

Nome popular	Nome científico	Família	Morfologia externa da folha
Gemgibre-vermelho	<i>Alpinia purpurata</i> K.Schum.	Zingiberaceae	Fortemente coriácea
Helicônia	<i>Heliconia rostrata</i> Ruiz et Pav.	Musaceae	Coriácea
Ixora	<i>Ixora coccinea</i> L.	Rubiaceae	Fortemente coriácea
Jibóia	<i>Scindapsus aureus</i> Engl.	Araceae	Coriácea cerosa
Léia	<i>Leea coccinea</i> Planch.	Vitaceae	Levemente coriácea
Ligustro	<i>Ligustrum sinense</i> Lour.	Oleaceae	Membranácea
Lírio-da-paz	<i>Spatiphyllum wallisii</i> Regel	Araceae	Levemente coriácea
Lírio-do-Amazonas	<i>Eucharis x grandiflora</i> Planch & Lind	Amaryllidaceae	Fortemente coriácea
Manjerição	<i>Ocimum basilicum</i>	Labiatae	Membranosa
Maria-sem-vergonha	<i>Impatiens valeriana</i> Hook. F.	Balsaminaceae	Levemente succulenta
Pingo de ouro	<i>Durantha repens</i> L. var. aurea Hort.	Verbenaceae	Membranácea
Primavera	<i>Bougainvillea spectabilis</i> Willd.	Nyctaginaceae	Membranácea
Quaresmeira	<i>Tibouchina granulosa</i> Cogn.	Melastomaceae	Coriácea, pilosa
Singônio	<i>Syngonium podophyllum</i> Schott.	Araceae	Levemente coriácea
Tradescantia	<i>Tradescantia pallida</i> (Rose) Hunt. Cv. "purpurea" Boom	Commelinaceae	Fortemente succulenta
Trombeta-de-anjo	<i>Datura- suaveolens</i>	Solanaceae	Membranácea, pilosa
Violeta	<i>Saintpaulia ionantha</i> Wendl.	Gesneriaceae	Levemente succulenta, pilosa

### **3.6. Avaliação da reação**

A avaliação da reação de hipersensibilidade foi considerada positiva quando a área infiltrada se necrosou dentro de 24 e 48 h.

Para a seleção das plantas, foi considerada, entre as que apresentaram reação positiva com maior número de espécies de fitobactérias, a facilidade de infiltração, disponibilidade e a estabilidade das folhas destacadas em água.

Quanto à facilidade de infiltração, foi quantificada em: 3=muito fácil; 2=fácil; 1=difícil e 0=impossível infiltrar. A disponibilidade foi quantificada como: 3 = facilmente disponível em viveiros de plantas ornamentais, nos jardins públicos e residenciais; 2 = intermediária e 1 = pouco disponíveis (difícil de ser encontrado). Quanto à estabilidade da folha destacada, foi resumida em: 3 = muito estável (por vários dias); 2 = estável; 1 = instável (a folha infiltrada se destaca rapidamente da haste) e 0 = não mantém a turgidez (murcha rapidamente).

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste bio-ensaio foram utilizadas 34 espécies de plantas, onde 16 espécies tiveram dificuldades de serem infiltradas, talvez podendo ser explicado pelo tipo de enervação (tanto pela disposição das nervuras como pelo calibre das mesmas), consistência ou superfície da folha. Foram elas: alpínia, araruta, azaléia, bela-emília, bico-de-papagaio, cambará, cordiline, flor de cera, helicônia, ixora, maria-sem-vergonha, pingo-de-ouro, primavera, tradescantia, t trombeta-de-anjo, quaresmeira.

Folhas muito finas, membranosas (bico-de-papagaio, pingo-de-ouro, bela-emília, primavera), fazem com que a agulha atravesse a folha, dificultando muito a infiltração, já as muito espessas (flor-de-cera) e as fortemente rígidas (quaresmeira) dificultam a penetração e/ou colonização do patógeno (Tabela 2).

As folhas de textura intermediária e possuindo nervuras sem relevo e as levemente suculentas fazem com que haja uma melhor distribuição do fluxo bacteriano, mas isso não quer dizer que ter uma boa infiltração ocorrerá a reação de hipersensibilidade e sim se a interação patógeno-planta for incompatível, sendo esta interpretada, biologicamente, como sendo uma resposta ativa da planta à infecção. Um exemplo deste fato é que as plantas levemente suculentas como a beldroega e a flor de maio tem uma ótima infiltração, sendo

observado nitidamente o fluxo correr dentro da folha, mas nem por isso ocorreu a reação de hipersensibilidade e sim uma leve clorose. Outras plantas apresentaram facilidade de infiltração mas não apresentaram reação de hipersensibilidade como o antúrio, alpínia e cróton (Tabela 2).

Em relação ao tipo de enervação e a disposição das mesmas, folhas monocotiledonares (araruta, helicônia, cordiline) tem uma dificuldade maior de infiltração devido suas nervuras secundárias terem disposição paralela a nervura principal ocupando uma menor área de infiltração em relação as dicotiledonares onde elas absorvem maior suspensão devido suas nervuras secundárias apresentarem uma maior distância entre elas, possibilitando uma melhor distribuição dentro da folha, além do calibre das nervuras influenciarem bastante na distribuição do fluxo, sendo isto perceptível ao olho nu.

As plantas que apresentaram reação de hipersensibilidade positiva totalizaram 16, sendo elas: begônia, bico-de-papagaio, café-de-salão-dourado, cheflera, Singônio, costela-de-Adão, couve-da-malásia, fumo, jibóia, léia, ligustro, , lírio-da-paz, lírio-do-amazonas, lanjeriço, pingo-de-ouro, violeta.



**Tabela 2: Características desejáveis para seleção de plantas a serem utilizadas nos testes de infiltração de fitobactérias**

Nome popular	Facilidade de infiltração (a)	Disponibilidade (b)	Estabilidade das folhas destacadas(c)	Reação de Hipersensibilidade
Antúrio	3	3	3	-
Araruta	1	3	2	-
Azaléia	1	3	3	-
Begônia-metálica	3	2	2	+
Bela-emília	1	3	2	-
Beldroega	3	3	2	-
Bico-de-papagaio	2	3	1	+
Café-de-salão-dourado	3	3	2	+
Cambará	1	3	0	-
Cheflera	3	3	3	+
Costela-de-adão	3	3	3	+
Cordiline	1	3	2	-
Couve-da-malásia	2	1	1	+
Cróton	3	3	3	-
Flor de cera	0	2	3	-
Flor de maio	3	3	3	-
Fumo	3	1	3	+
Gengibre vermelho	1	3	2	-
Heliconia	1	3	2	-
Ixora	1	3	3	-
Jibóia	3	3	3	+
Léia	2	3	2	+
Ligustro	3	3	1	+
Lírio-da-paz	3	3	2	+
Lírio-do-amazonas	3	2	3	+
Manjerição	3	3	2	+
Maria-sem-vergonha	1	3	0	-
Pingo-de-ouro	1	3	1	+
Primavera	1	3	0	-
Quaresmeira	0	3	0	-
Trapoeira-roxa	1	3	3	-
Trombeta-de-anjo	1	2	1	-
Violeta	3	3	3	+

(a): 3 = muito fácil; 2=fácil; 1=difícil e 0=impossível infiltrar

(b): 3 = facilmente disponível em viveiros de plantas ornamentais, nos jardins públicos e residenciais; 1 = pouco disponível (difícil de ser encontrado)

(c): 3 = muito estável (por vários dias); 2 = estável; 1 = instável (a folha infiltrada se destaca rapidamente da haste) 0 = não mantém a turgidez (murcha rapidamente).

(+): Apresenta reação de Hipersensibilidade/ (-) Não apresenta a reação.

As plantas que apresentaram reação de hipersensibilidade positiva totalizaram 16, sendo elas: begônia, bico-de-papagaio, café-de-salão-dourado cheflera, couve-da-malásia, costela-de-adão, fumo, jibóia, léia, lírio-da-paz, lírio-do-amazonas, ligustro, manjerição, pingo-de-ouro , singônio, violeta, mostradas na Tabela 2.

Algumas plantas não resistiram ao teste, devido à dificuldade de permanecerem vivas na água em condição de folha ou ramo com folhas destacadas. Foram elas: bico-de-papagaio, cambará, maria-sem-vergonha, primavera e quaresmeira.

Ainda não existe explicação clara e convincente do porquê da ocorrência da reação de hipersensibilidade. Sabe-se que o patógeno penetra e, como consequência, as células do hospedeiro morrem rapidamente no local da penetração. As células do patógeno também morrem, e a infecção não progride. Romeiro (1995).

As melhores plantas que responderam positivamente ao teste de hipersensibilidade para diferentes bactérias foram a begônia-metálica, cheflera, costela-de-adão, couve-da-malásia, léia, ligustro, manjerição, e violeta (Tabela 3).

Todas as plantas que apresentaram a reação de hipersensibilidade são plantas dicotiledôneas, apresentando uma melhor distribuição do fluxo bacteriano dentro da folha, o que possivelmente explicaria uma melhor resposta e também devido ao fato de não apresentarem nenhuma barreira física que impede a entrada do patógeno na folha.

A reação de hipersensibilidade em folhas de fumo, mesmo sendo esta espécie considerada como teste padrão, não é tão eficaz por não apresentar reação para todas as *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Erwinia* e também para nem todas as estirpes de *Ralstonia*.

Um fato interessante é que, pela dificuldade de mostrar sintomas da reação à hipersensibilidade em relação à bactéria *Clavibacter*, duas espécies obtiveram uma boa resposta, o ligustro num período de 24h e a violeta num período de 48h.

Ao contrário do que normalmente se observa em plantas de fumo, a reação de hipersensibilidade ocorreu para a bactéria *Erwinia chrysanthemi* em todas as cinco repetições em folhas desta espécie, o que normalmente não acontece para a *Erwinia carotovora* não servindo como teste padrão para este gênero de bactéria.

A cheflera é uma ótima planta para infiltração, apresentado resposta à uma grande gama de bactérias além de fácil acesso para obtenção de suas folhas, com o inconveniente de apresentar a resposta a algumas bactérias num período de 48 h contra 24 h no fumo.

O gênero *Xanthomonas* é muito importante para estudos científicos pois causa vários danos econômicos a diversas culturas, mas a reação de hipersensibilidade para a maioria das espécies não é manifestada em plantas de fumo e neste trabalho foi possível descobrir algumas espécies de plantas que mostraram bons resultados, por exemplo a couve-da-malásia que apresentou resposta a uma maior quantidade de espécies desta bactéria. Outras espécies também mostram ótimos resultados, mas a uma menor gama de bactérias.

Estes resultados mostram que muitas espécies de plantas reagem na forma de hipersensibilidade à infiltração de apenas algumas fitobactérias. Quando isto ocorre com bactérias que não causam reação de hipersensibilidade em fumo, pode se considerar como uma descoberta muito significativa, pois vem facilitar e agilizar o trabalho de diagnose daquela fitobactéria sem ter que recorrer ao teste de patogenicidade em planta hospedeira

suscetível. Em laboratórios de Fitopatologia/bacteriologia, diagnose de doenças bacterianas de plantas, poderá ser selecionado um conjunto de espécies de plantas testes, inclusive o fumo, de maneira a abranger o maior número possível de fitobactérias.

Todas as plantas selecionadas na tabela 3 se enquadram nesta categoria e constituem um resultado bastante significativo. É necessário entretanto continuar os estudos com maior número de fitopatógenos como também nas condições de folhas não destacadas.

Tabela 3: Resultados da infiltração de fitobactérias em folhas destacadas de diferentes espécies de plantas - Uberlândia UFU 2000.

Nome popular Das plantas	Isolados de fitobactérias da coleção da UFU									
	29-Pc		37-Xcm		39-Pst		40-Xcvit		42-1cves	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Cheflera	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
Singônio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jibóia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Begônia	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Lírio da Paz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lírio do Amazonas	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ligustro	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Costela de Adão	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Manjerição	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Léia	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Pingo de ouro	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Café de salão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dourado										
Couve da Malásia	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Bico de Papagaio	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Violeta	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Fumo	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+

**29-Pc:** *Pseudomonas cichorii*, **37-Xcm:** *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, **39-Pst:** *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, **40-Xcv:** *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, **42-Xcv:** *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*,

( + ) – Apresenta reação de hipersensibilidade.

( - ) – Não apresenta reação de hipersensibilidade.

Continuação da Tabela 3

Nome popular Das plantas	Isolados de fitobactérias da coleção da UFU									
	45-Cmm		49-Ech		54-1cph		56-1cp		58-Rs	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Cheflera	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Singônio	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Jibóia	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Begônia	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Lírio da Paz	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Lírio do Amazonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ligustro	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Costela de Adão	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Manjerição	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Léia	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Pingo de ouro	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Café de salão dourado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Couve da Malásia	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Bico de Papagaio	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
Violeta	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Fumo	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

**45-Cmm:** *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*, **49-Ech:** *Erwinia chrisantemi*, **54-Xcph:** *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, **56-Xcp:** *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, **58-Rs:** *Ralstonia solanacearum*.

( + ) – Apresenta reação de hipersensibilidade.

( - ) – Não apresenta reação de hipersensibilidade.

## 5. CONCLUSÕES

Na busca de outras espécies de plantas além do fumo, que apresentam reação de hipersensibilidade a fitobactérias, dezesseis espécies apresentaram reação positiva a pelo menos uma das bactérias fitopatogênicas testadas,

A identificação de espécies de plantas que apresentaram reação de hipersensibilidade a fitopatógenos como *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* e patovares de *Xanthomonas campestris* que dificilmente induzem reação em fumo é o resultado mais significativo deste trabalho, sendo cheflera, ligustro e couve-da-malásia são as mais importantes,

Com o uso de um conjunto de plantas testes identificadas neste trabalho, será possível distinguir maior gama de isolados de fitobactérias das saprófitas nos trabalhos de isolamento, sem ter que recorrer a testes de patogenicidade em plantas hospedeiras suscetíveis.

A bactéria que apresentou resposta de reação de hipersensibilidade a um maior número de plantas foi a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- GOODMAN, R.N., KIRÁLI, Z. & ZAITLIN, M. **The biochemistry and physiology of infectious plant disease.** D.van Nostrand Co. London. 354 pp. 1967.
- KIRÁLY, Z., KLEMENT, Z., SOLYMOSY, F. & VÖRÖS, J. **Methods in Plant Pathology.** Academic Press. 509pp. 1974.
- KLEMENT, Z. **Method for the rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads.** Nature 199: 299-300, 1963
- KLEMENT, Z. **Hypersensitivity.** In: **Mount, M.S. & Lacy, G.H.** (Editors). **Phytopathogenic Prokaryotes**, Vol. 1: 149-177. Academic Press, New York, 1982.
- KLEMENT, Z., FARKAS, G.L. & LOVRECKOVICH, L. **Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf.** Phytopathology 54: 474-477, 1964
- KLEMENT, Z. & LOVRECKOVICH, L. **Studies on host parasite relations in bean pods infected with bacteria.** Phytopathol. Zeitschrift, 45: 81-88, 1961.

- ROMEIRO, R. da S. **Fundamentos de fisiologia do parasitismo em Fitopatologia**, Universidade Federal de Viçosa, ed. imprensa universitária, Viçosa M.G. 1 ed., 32p.1995
- TAKATSU, A. **Preservação de bactérias fitopatogênicas pelo método de dessecação**. Fitopatologia Brasileira, 5(2): 461, 1980.