

# Sobrevivência e Viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em Sementes de Feijão Armazenadas sob Condições Controladas

Abi S. dos A. Marques, Patrícia M. Guimarães, Joalice P. dos Santos & Tatiana M. Vieira

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. Postal 02372, CEP 70770-900, Brasília, DF, Fax (061) 3448-4624, e-mail: amarques@cenargen.embrapa.br

(Aceito para publicação em 12/01/2005)

Autor para correspondência: Abi S. dos A. Marques

MARQUES, A.S.A., GUIMARÃES, P.M., SANTOS, J.P. & VIEIRA, T.M. Sobrevivência e viabilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão armazenadas sob condições controladas. Fitopatologia Brasileira 30:527-531. 2005.

## RESUMO

O estabelecimento de bancos de sementes para conservação *ex situ* de germoplasma vegetal é largamente utilizado, mas a contaminação das mesmas por fitopatógenos pode comprometer sua integridade. Este trabalho teve por objetivo monitorar a sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, em um lote de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. Roxão) submetido a três condições de temperatura, durante 60 meses de armazenamento: -18 e 5 °C, condições preconizadas para a conservação de material genético vegetal a longo e médio prazo, respectivamente, e à temperatura ambiente (20-30 °C). A sobrevivência da bactéria foi avaliada pela percentagem de sementes contaminadas e a viabilidade pela manutenção da patogenicidade dos isolados. A população de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* nas sementes foi quantificada ao final de cinco anos de armazenamento. Os resultados mostraram que a percentagem de sementes contaminadas decresceu de 64 para 36-37% nos primeiros seis meses, para os três tratamentos. A partir de 30 meses observou-se que as sementes conservadas a -18 e 5 °C apresentaram níveis de contaminação (58 e 72%) que diferiram significativamente das conservadas à temperatura ambiente (20%), e aos 60 meses taxas de 46%, 46% e 8%, respectivamente. A temperatura mais propícia à sobrevivência da bactéria foi 5 °C em que se encontrou uma população máxima de  $1,2 \times 10^8$  ufc/semente. Constatou-se, igualmente, a manutenção do poder infetivo dos isolados durante todo o armazenamento. Pode-se concluir que as condições ótimas para a conservação de sementes são as mesmas para a manutenção da longevidade de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

**Palavras-chave adicionais:** crestamento bacteriano comum do feijoeiro, conservação de germoplasma, bactérias transmitidas por sementes.

## ABSTRACT

**Survival and viability of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with bean seeds stored under controlled conditions**

The establishment of seed banks for *ex situ* plant germplasma conservation is widely used. However, seedborne pathogens may affect germplasma integrity when it is regenerated and/or multiplied. The objective of this experiment was to monitor the longevity (survival) and viability (maintenance of infectivity) of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in a contaminated bean (*Phaseolus vulgaris*) seed lot (cv. Roxão), stored at -18 and 5 °C, which are, respectively, the normal temperatures for long and average term conservation of plant germplasma. Another sample was maintained at room temperature. Longevity of the bacteria was evaluated by the percentage of infected seeds, scoring typical colonies onto semi-selective medium, and the viability was determined by the capability of the isolates to reproduce the disease. The population of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* was evaluated in seed stored for five years, by individually isolating the bacteria from seed wash and seedlings. The results showed that the initial contamination rate of 64% dropped to 36-37% for all treatments during the first six months. Final evaluations at 30 and 60 months showed that for seed stored at -18 and 5 °C, the contamination rate was maintained. This differed significantly from seed stored at room temperature. The best temperature for bacteria survival and maintenance was 5 °C. At this temperature, the population level was as high as  $1.2 \times 10^8$  cfu/seed. Maintenance of infectivity after storage was also demonstrated. We concluded that the optimal conditions for seed conservation are the same as those for maintenance of *X. axonopodis* pv. *phaseoli* longevity.

**Additional keywords:** bacterial blight of common bean, germplasma conservation, seed-borne bacteria.

A conservação dos recursos genéticos das plantas cultivadas deve receber esforço suficiente à sua viabilização, por ser essencial à sobrevivência humana. É necessário torná-los disponíveis para programas de melhoramento que visem

o desenvolvimento de variedades com as quais se possa contar no futuro. Diversos métodos de conservação são usados e se dividem em duas categorias principais: *ex situ*, onde as plantas são conservadas fora do seu habitat natural e *in situ*,

dentro dos habitats naturais. Um dos métodos para a conservação *ex situ* é o estabelecimento de bancos de sementes, pois a semente é considerada a parte da planta mais apropriada para o armazenamento.

As sementes podem ser efetivas fontes de inóculo primário de doenças e, assim, é necessário conhecer a capacidade de sobrevivência, manutenção de poder infetivo e longevidade de patógenos transmitidos por sementes, quando se tem por objetivo a conservação *ex situ* de germoplasma vegetal. Essas informações subsidiariam o monitoramento das coleções de germoplasma, tornando a ocasião de multiplicação em oportunidade de se aplicar medidas de controle dos patógenos associados às sementes armazenadas. A contaminação de germoplasma por fitopatógenos pode mascarar a expressão de suas características e comprometer sua integridade (Siddiqui & Mathur, 1988).

A sobrevivência de bactérias, fungos e nematóides em sementes por diferentes períodos e sob diferentes condições têm sido objeto de estudos conclusivos: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones sobreviveu por 25 anos em sementes infetadas e estocadas a temperatura ambiente (Burkholder, 1945); *Fusarium moniliforme* Sheldon sobreviveu melhor em sementes de milho (*Zea mays* L.) conservadas por 12 meses em câmara fria (Tanaka, 2001); sob temperatura e umidade controladas, nas condições estabelecidas para a conservação de germoplasma, o nematóide *Aphelencooides besseyi* Christie sobreviveu em sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) por três anos (Tenente *et al.*, 1994).

O crestamento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, é uma bacteriose largamente distribuída e que provoca redução na colheita de 10 a 70% em condições de ataque natural, e o agente pode ser transmitido por sementes com alta eficiência (Diaz, 2000). Basu & Wallen (1966) compararam dados de sobrevivência de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* Vauterin, Hoste, Kersters & Swings em sementes e em meio de cultura, observando que culturas mantidas em agar perderam a sua viabilidade nas temperaturas mais altas e por mais tempo de estocagem, enquanto que os isolados oriundos diretamente das sementes se mantiveram virulentos. A avaliação da longevidade nas sementes levou em conta a temperatura, a aeração e o período de armazenamento sobre a viabilidade, virulência e caracteres fisiológicos, mas não as combinações de temperatura e umidade relativa, definida para a conservação de germoplasma a médio e longo prazo.

Visando monitorar a longevidade (capacidade de sobrevivência) e a manutenção da virulência (poder infetivo) de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em um lote de sementes de feijoeiro contaminado, armazenado sob condições controladas de umidade e temperatura, experimentos foram realizados ao longo de 60 meses, avaliando-se a recuperação e a viabilidade da bactéria nas condições ótimas para a conservação

das sementes em banco de germoplasma vegetal *ex situ*.

Cento e oitenta plantas de feijoeiro cv. Roxão foram conduzidas em vasos e em condições de telado desde seu estabelecimento até a fase de maturação. As plantas foram submetidas à inoculação com uma suspensão de células da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* na concentração de  $10^7$  ufc/ml, na fase de floração, por pulverização em flores expandidas (Marques *et al.*, 1994). Das sementes colhidas, aproximadamente 3900 foram utilizadas nas diferentes etapas de execução do presente trabalho. Depois que atingiram valores de unidade relativa (UR) entre 4 a 6%, o lote de sementes foi subdividido e as sub-amostras acondicionadas em sacos de papel aluminizado e armazenadas em câmaras de conservação a  $-18$  °C, a  $5$  °C e em laboratório à temperatura ambiente (20 a 30 °C). Foi avaliada a taxa inicial de contaminação do lote de sementes, através do plantio das mesmas em agar-água, e isolamento da bactéria em meio semi-seletivo MXP (Clafin *et al.*, 1987), a partir das folhas primárias, sintomáticas ou não (Marques *et al.*, 1994).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições (25 sementes por repetição) para cada etapa de avaliação e por condição de armazenamento e 200 sementes por etapa, para poder germinativo.

Para a avaliação da sobrevivência e da viabilidade da bactéria, as sementes, armazenadas nas condições acima descritas, foram analisadas individualmente: pelo isolamento da bactéria (1) a partir de plântulas oriundas da germinação em tubos de ensaio, com meio agar-água (1,5%) e (2) a partir do líquido resultante da maceração das sementes em água esterilizada. A primeira técnica foi utilizada para as avaliações semestrais até o final de 30 meses, enquanto que a avaliação final aos 60 meses foi feita pelos dois métodos. No último caso a população bacteriana foi quantificada 72 h após o plaqueamento de alíquota do líquido de maceração em meio semi-seletivo.

A sobrevivência foi avaliada em função do crescimento de colônias típicas de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* no meio MXP sólido. Os isolados obtidos nas diferentes etapas de avaliação tiveram sua identificação confirmada por caracteres nutricionais (Schaad *et al.*, 2001), sorologia (ID e DAS-ELISA) (Van Vuurde *et al.*, 1983) e PCR com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos (Audy *et al.*, 1994; Halfeld-Vieira *et al.*, 2001). O anti-soro utilizado foi produzido e testado no próprio laboratório, enquanto os oligonucleotídeos X4c (GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG) e X4e (CGC CGG AAG CAC GAT CCT CGA AG) foram aqueles descritos por Audy *et al.* (1994), seguindo-se, para a amplificação, o protocolo modificado e descrito por Halfeld-Vieira *et al.* (2001).

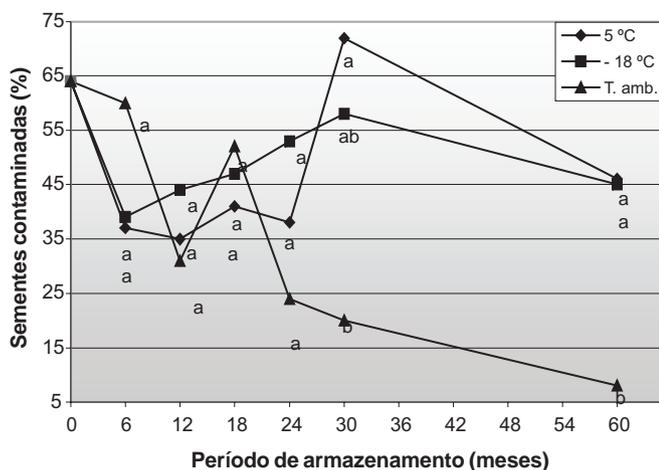
A viabilidade foi avaliada através da inoculação da bactéria recuperada, na forma de suspensão em água esterilizada a  $10^8$  ufc/ml, por fricção com gaze embebida, na primeira folha trifoliada (estádio V2) de plantas de feijoeiro cv. Roxão (hospedeiro suscetível), em função do aparecimento de sintomas da bacteriose e reisolamento do patógeno (Valarini & Menten, 1991).

Nas mesmas épocas de avaliação do patógeno foi avaliado o poder germinativo das sementes armazenadas, através da contagem daquelas que apresentaram emissão de radícula (Brasil, 1980).

Obteve-se, através da inoculação de flores, um lote de sementes de feijoeiro cuja taxa de contaminação por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi de 64%, com poder germinativo de 99%. Este método de obtenção de sementes contaminadas foi escolhido em detrimento da inoculação direta na semente (por imersão em suspensão ou infiltração a vácuo), por simular as condições naturais de infecção (Robeson *et al.*, 1989) além de apresentar altas taxas de infecção.

No que diz respeito à sobrevivência da bactéria, os resultados mostraram que a taxa de contaminação inicial foi reduzida em seis meses (Figura 1). Nos três períodos subsequentes (12, 18 e 24 meses), não houve diferença significativa entre os tratamentos, mas a taxa de sobrevivência da bactéria no lote conservado à temperatura ambiente manteve uma tendência decrescente, enquanto que para 5 e -18 °C mostrou ligeira tendência à elevação. Na avaliação aos 30 meses observou-se que as sementes conservadas a -18 e 5 °C apresentaram taxas de contaminação de 58 e 72%, respectivamente, diferindo significativamente de 20% à temperatura ambiente. Aos 60 meses, embora tenha havido queda na taxa de sobrevivência para todos os tratamentos, a diferença entre temperatura ambiente (8%) e -18 e 5 °C (46% em ambos) foi mantida. A análise das taxas de sobrevivência indica que 5 e -18 °C foram as temperaturas mais propícias à sobrevivência da bactéria. Mary *et al.* (2001) também observaram que houve uma redução significativa na sobrevivência de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em sementes de arroz estocadas a temperatura ambiente, com o aumento do período de infecção.

A população bacteriana nas sementes também foi



**FIG. 1** - Efeito da temperatura de armazenamento sobre a taxa de contaminação de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, durante cinco anos sob três temperaturas de armazenamento. Médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

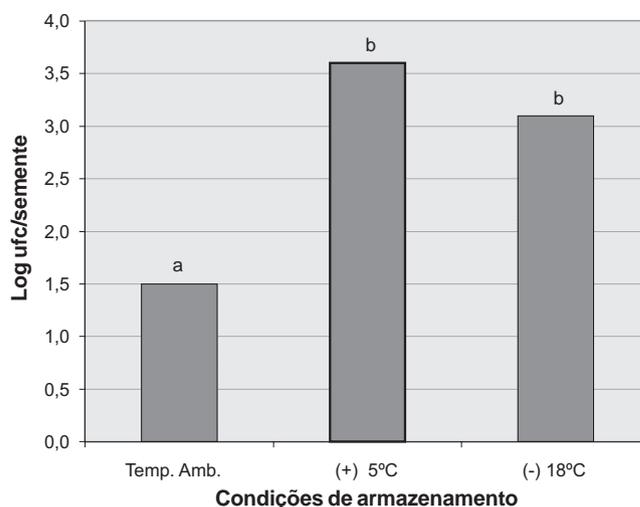
afetada pela temperatura de armazenamento (Figura 2). Uma população de mesma ordem de grandeza sobreviveu nos lotes de 5 e -18 °C com médias de  $10^3$  ufc/semente (log ufc/semente de 3,1 e 3,6) e houve uma queda acentuada para o lote armazenado à temperatura ambiente (10 ufc/semente, log ufc/semente de 1,5). Essa população, no seu valor máximo, foi de  $1,2 \times 10^8$  ufc/semente em amostra armazenada a -18 °C. Isso também foi observado para *X. translucens* pv. *cerealis* (Hagborg) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings, cuja população foi apenas reduzida nos primeiros dois anos, mas que desapareceu aos 42 meses, quando as sementes contaminadas foram mantidas à temperatura ambiente (Malavolta *et al.*, 2000).

O poder germinativo do lote de sementes, de 99% no início do experimento, teve queda acentuada nos seis primeiros meses para 38%, mantendo-se no mesmo patamar até o final, sem diferença significativa entre os tratamentos.

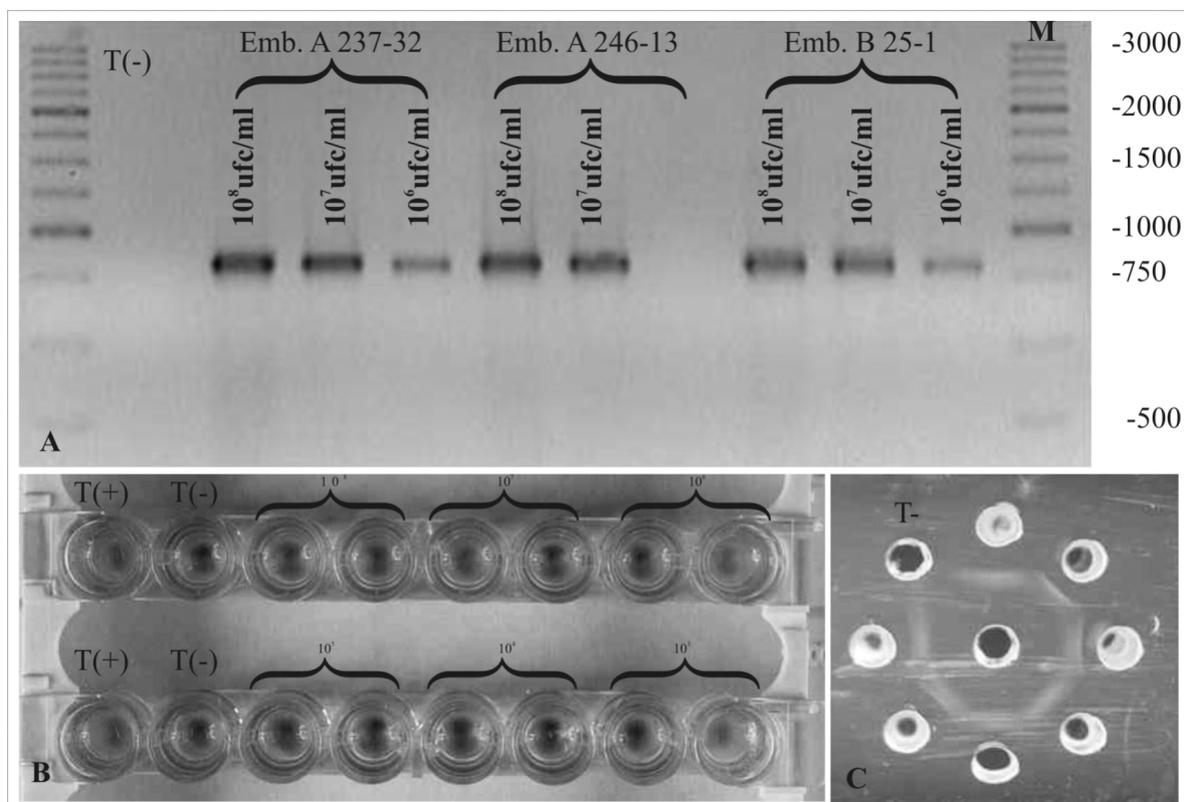
Constatou-se, por inoculação em feijoeiro, a manutenção da capacidade de causar infecção dos isolados após o armazenamento, em todas as condições, indistintamente. Os sintomas se apresentaram como pequenas manchas encharcadas na face abaxial da folha, cinco dias após a inoculação, as quais evoluíram para início de necrose com a formação do halo e manchas necróticas com estreito halo amarelado, o que coincide com a descrição de sintomas para essa doença.

A identificação dos isolados oriundos das sementes armazenadas foi confirmada por sua caracterização nutricional (dados não apresentados), ELISA, ID e PCR (Figura 3).

Nas condições adequadas para a conservação de material genético vegetal a médio e longo prazo, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* conserva-se viável em sementes de feijoeiro, mantendo-se em populações elevadas e sendo capaz de causar doença em plântulas emergentes. Basu & Wallen



**FIG. 2** - População de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), após cinco anos sob três temperaturas de armazenamento. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**FIG. 3** - Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* por: **A)** PCR, onde Emb.A 237-32, Emb.A 246-13 e Emb.B 25-1 correspondem a isolados representativos daqueles obtidos das sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) armazenadas, cada um deles amplificado três vezes, em soluções concentradas de  $10^8$ ,  $10^7$  e  $10^6$  ufc/ml, com os primers X4c e X4e. M = marcador molecular de 250 pb; **B)** DAS-ELISA, onde T(+) = controle positivo, T(-) = controle negativo e os demais orifícios correspondendo a diferentes concentrações ( $10^8$  a  $10^3$  ufc/ml) do mesmo isolado (Emb.A 246-13); **C)** imunodifusão dupla em agarose 1,0%, sendo que o anti-soro Cenargen nº 2 foi colocado no orifício central, tampão no orifício testemunha (T-) e nos demais, suspensões dos isolados Emb.A 237-32, Emb.A 246-13, Emb.B 25-1, Emb.B 25-15, Emb.B 89-8, Emb.B 91-9 e Emb.B 309-7.

(1966) relatam resultados semelhantes, em que temperaturas de  $-20$  a  $35$  °C não afetaram a viabilidade e a virulência do patógeno protegido pela semente durante três anos. A bactéria produz uma matriz viscosa (heteropolissacarídeo) em meio com certos açúcares, similar ao exsudato produzido em plantas naturalmente infetadas. Células bacterianas sobreviveram por mais de três anos estocadas nesse exsudato à temperatura de  $-25$  °C e UR de 51% evidenciando-se a capacidade de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* de sobreviver em condições de dessecação e baixas temperaturas (Leach *et al.*, 1957).

Essas informações indicam claramente a necessidade do monitoramento permanente das coleções de germoplasma.

#### AGRADECIMENTOS

À equipe do Laboratório de Conservação de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo auxílio e valiosas sugestões na instalação, condução e avaliação do experimento. A Marcus Vinícius S. Coelho pela colaboração na análise estatística.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUDY, P., LAROCHE, A., SAINDON, G., HUANG, H.C. & GILBERTSON, R.L. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c.* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 84:1185-1192. 1994.
- BASU, P.K. & WALLEN, V.R. Influence of temperature on the viability, virulence, and physiologic characteristics of *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in vivo and in vitro. *Canadian Journal of Botany* 44:1239-1245. 1966.
- BRASIL. Regras para Análise de Sementes. Brasília. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. 1980.
- BURKHOLDER, W. H. The longevity of the pathogen causing the wilt of the common bean. *Phytopathology* 35: 743-744. 1945.
- CLAFIN, L.E., VIDAVER, A.K. & SASSER, M. MXP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Phytopathology* 77:730-734. 1987.
- DIAZ, C.G. Avaliação de danos causados por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). (Tese de Doutorado). Piracicaba. Universidade de São Paulo, ESALQ. 2000.

- HALFELD-VIEIRA, B.A., SOUZA, R.M., FIGUEIRA, A.R. & BOARI, A.J. Identificação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* através da técnica de PCR. *Fitopatologia Brasileira* 26:737-740. 2001.
- LEACH, J.G., LILLY, V.G., WILSON, H.A. & PURVIS Jr., M.R. Bacterial polysaccharides: the nature and function of the exudate produced by *Xanthomonas phaseoli*. *Phytopatology* 47:113-120. 1957.
- MALAVOLTA, V.A. Jr. & OLIVEIRA, M.A.R. Identificação e sobrevivência de *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* em sementes e em restos culturais de trigo. *Summa Phytopathologica* 26:20-23. 2000.
- MARQUES, A.S.A., PARENTE, P.M.G., MACHADO, F.O.C. & SANTANA, C.R. Avaliação de métodos de inoculação na produção de sementes de feijão contaminadas por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* para fins experimentais. *Fitopatologia Brasileira* 19:178-182. 1994.
- MARY, C.A., NAIR, S.K. & SARASWATHI, P. Survival of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama 1922), Swings *et al.* 1990. *Journal of Tropical Agriculture* 39:76-78. 2001.
- ROBESON, D.J., BRETSCHEIDER, K.E. & GONELLA, M.P. A hydatode inoculation technique for the simulation of natural rot infection of cabbage by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Annals of Applied Biology* 115:455-459. 1989.
- SCHAAD, N.W., JONES, J.B. & CHUN, W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3<sup>rd</sup> ed. St. Paul, Minnesota. APS Press. 2001.
- SIDDIQUI, M.R. & MATHUR, S.B. Survival of *Septoria nodorum* Berk. in wheat seed stored at 5 °C. *Plant Genetic Resources Newsletter* 75/76:7-8. 1988.
- TANAKA, M.A.S. Sobrevivência de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho mantidas em duas condições de armazenamento. *Fitopatologia Brasileira* 26:60-64. 2001.
- TENENTE, R.C.V., WETZEL, M.M.V.S., COSTA MANSO, E.S.B.G & MARQUES, A.S.A. Survival of *Aphelenchoides besseyi* in infested rice seeds stored under controlled conditions. *Nematologia Brasileira* 18:85-92. 1994.
- VALARINI, P.J. & MENTEN, J.O. Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e seu efeito sobre a qualidade sanitária e germinação. *Summa Phytopathologica* 17:227-231. 1991.
- VAN VUURDE, J.W.L., VAN DEN BOVENKAMP, G.W. & BIRNBAUM, Y. Immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay as potential routine tests for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seed. *Seed Science and Technology* 11:547-559. 1983.