

Inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomateiro

Fábio Mathias Corrêa^{1*}; Aldir de Oliveira de Carvalho¹; Margarida Goréte Ferreira do Carmo^{1**}

¹Departamento de Fitotecnia, IA, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, CEP.: 23.890-000, Seropédica, RJ, e-mail: gorette@ufrjr.br; *Bolsista de Iniciação Científica CNPq/PIBIC; ** Bolsista do CNPq.
Data de chegada: 27/10/2005. Aceito para publicação em: 11/05/2007

1286

RESUMO

Corrêa, F.M.; Carvalho, A.O.; Carmo, M.G.F. Inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomateiro. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1, p.71-75, 2008

Para avaliar o efeito de métodos de inoculação de *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) (9) em sementes de tomate sobre a qualidade da semente e transmissão da fitobactéria compararam-se os tratamentos: 1) inoculação a vácuo com suspensão de células de *X. vesicatoria* em STP (0,005M, pH 7,4 e NaCl 0,85%); 2) imersão por 24 horas em suspensão de células de *X. vesicatoria* em STP; 3) vácuo em solução STP; 4) imersão por 24 horas em STP; 5) imersão por 5 min. em álcool etílico e 6) semente original. As avaliações foram realizadas por testes de germinação e isolamentos em meio Nutriente Agar Modificado

(NAM) aos 1, 15, 30 e 45 dias após aplicação dos tratamentos. Em seguida, avaliou-se o efeito da umidade (4% e 8%) e o armazenamento das sementes inoculadas e variações de umidade antes da realização dos testes sobre a sobrevivência e recuperação de *X. vesicatoria*. Os métodos de inoculação testados podem ser utilizados em trabalhos de rotina, porém, as sementes devem ser utilizadas até 30 dias após a inoculação a partir de quando ocorre uma redução acentuada na taxa de recuperação da fitobactéria. A umidade das sementes interfere na sobrevivência e na transmissão de *X. vesicatoria* pelas sementes de tomate.

Palavras chave: *Lycopersicon esculentum*; patologia de sementes; flora microbiana.

ABSTRACT

Corrêa, F.M.; Carvalho, A.O.; Carmo, M.G.F. Inoculation and survival of *Xanthomonas vesicatoria* on tomato seeds. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1, p.71-75, 2008

The efficiency of six methods of *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) (9) inoculation on tomato seeds, and their effects on seed quality were tested: 1) vacuum inoculation with *X. vesicatoria* cell suspension in PB (0.005M, pH 7.4 and NaCl 0.85%); 2) immersion for 24 hours in with *X. vesicatoria* cell suspension and PB. 3) vacuum and saline solution in phosphate buffer; 4) immersion in PB for 24 hours; 5) seeds + ethanol; 6) control. Evaluations were performed for germination test and isolation in Modified Agar Nutrient (NAM) at 1, 15, 30 and 45 days after treatments imposition. The moisture effect on the transmission of *X.*

vesicatoria seeds inoculated under vacuum, followed or not by air drying at 30±1 °C, until 4% and 8% moisture were tested. Evaluations were performed as described above, after 24 hours and 30 days after the treatments. The methods of *X. vesicatoria* inoculation in tomato seeds can be used on routine analyses, however, inoculated seeds should be used until 30 days after inoculation. After this period, a large reduction on the recovery of viable cells occurs. The seed water content interferes with *X. vesicatoria* survival and transmission and explains the low percentages of *X. vesicatoria* recovery.

Additional keywords: *Lycopersicon esculentum*; seed pathology, microbial flora;

Sementes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) infectadas por *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) (9), representam uma das principais fontes de inóculo primário para a ocorrência de epidemias da mancha bacteriana. Para estudos de métodos de detecção, de tratamentos e de mecanismos de transmissão é necessário dispor-se de amostras de sementes homogêneas quanto à sua qualidade fisiológica e sanitária que podem ser obtidas por meio de inoculações programadas que resultem no mínimo de danos às sementes (4). Existem diferentes métodos de inoculação de sementes com fitobactérias (1, 6), porém não existem relatos de comparações entre os mesmos quanto à sua eficiência, aos danos causados às sementes e à sobrevivência do patógeno nas sementes armazenadas. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência de métodos de inoculação de sementes de tomate com *X. vesicatoria* e a sobrevivência da fitobactéria nas sementes armazenadas.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Epidemiologia

e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia da UFRuralRJ. Foram utilizadas sementes da cultivar Santa Clara Miss Brasil, e suspensão de células do isolado ENA 4463 de *X. vesicatoria*, preservado em água e crescido em meio Nutriente Agar (3) por 48 horas a 28°C. As suspensões foram preparadas em solução tampão fosfato – STP (0,005M, pH 7,4 e NaCl 0,85%) e a concentração ajustada para 10⁸ ufc ml⁻¹ com auxílio de espectrofotômetro (85% de transmitância a 540 nm).

Compararam-se seis tratamentos, incluindo procedimentos usados na inoculação das sementes e testemunhas: 1) inoculação a vácuo com suspensão de células de *X. vesicatoria* em STP (0,005M, pH 7,4 e NaCl 0,85%); 2) imersão por 24 horas em suspensão de células de *X. vesicatoria* em STP; 3) vácuo em solução STP; 4) imersão por 24 horas em STP; 5) imersão por 5 min. em álcool etílico e 6) semente original. Para cada tratamento foram utilizadas 10.000 sementes. As sementes de todos os tratamentos, exceto o último, foram previamente

imersas em álcool (92° G.L. a 95%) por 5 min. Em seguida, foram peneiradas e distribuídas sobre papel germitest e expostas em câmara de fluxo laminar até evaporação completa do álcool. Na inoculação a vácuo, as sementes foram imersas em 120 ml da suspensão bacteriana, contida em erlenmeyers, e após 30 min. de repouso em geladeira, foram submetidas a vácuo de 680 mmHg durante 5 min, seguidos de liberação lenta, em dois ciclos sucessivos (1, 8). Após o término do processo, as sementes foram mantidas em fluxo laminar durante 12 hs para eliminar o excesso de umidade. Em seguida as sementes foram armazenadas em ambiente refrigerado, à temperatura aproximada de 5 °C, até a realização dos testes. Para o método de inoculação por imersão, as sementes foram imersas na suspensão de células bacterianas e levadas à geladeira por 24 hs, quando foram retiradas, distribuídas sobre papel germitest e secas em câmara de fluxo laminar por 12 hs. Em seguida, foram acondicionadas em frascos de plástico e conservadas em geladeira, até a realização dos testes. Antes de se avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a qualidade fisiológica e sanitária das sementes, avaliou-se o teor de umidade das mesmas (2).

As avaliações foram realizadas ao 1, 15, 30 e 45 dias da aplicação dos tratamentos de inoculação através de isolamentos em meio Nutriente Agar Modificado - NAM (6) e de germinação (2). Para isolamento, utilizaram 400 sementes que foram depositadas diretamente sobre o meio de cultura, seguido de incubação por 72 hs a 28 °C. Para o teste de sanidade em gerbox, as sementes foram semeadas sobre papel germitest, umedecido (2,5 x o peso do papel) e mantidas em câmara BOD por 10 dias sob temperatura média de 25°C e 12 horas de fotoperíodo (8). Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições, constituídas por cinco placas de petri contendo 20 sementes cada e quatro caixas gerbox com 25 sementes cada, respectivamente.

Para se determinar o efeito do teor de água na transmissão de *X. vesicatoria* em sementes de tomate, utilizaram-se sementes inoculadas pelo método à vácuo descrito anteriormente (8). Em seguida, diferentes amostras destas sementes foram secas em estufa com circulação forçada de ar, regulada para temperatura de 30±1 °C, até atingirem 4% e 8% de teor de água. Como testemunhas utilizaram-se sementes não inoculadas e inoculadas. Amostras de sementes dos quatro tratamentos foram submetidas a três condições de ambiente antes das avaliações: 1) 90% de UR e 25 °C por 48 h; 2) sobre papel germitest umedecido (2,5 x o peso do papel por 24 h) e 3) testemunha. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições em arranjo fatorial 4x3.

As avaliações foram realizadas 24 h e 30 dias após a aplicação dos tratamentos de secagem seguindo procedimentos descritos anteriormente. Os teores de água das sementes foram verificados, antes da inoculação, após a inoculação, após a secagem em estufa e após exposição às diferentes condições de ambiente (2). Os dados obtidos nos dois ensaios foram submetidos à análise de variância e teste Scott-Knot a 5% de probabilidade.

Não houve diferença significativa entre os métodos de inoculação à vácuo e por imersão quanto à porcentagem de sementes infectadas por *X. vesicatoria* avaliado por meio de isolamentos em meio NAM, às 24 horas e 15 dias após a inoculação (Figura 1 A). Porém, na recuperação da fitobactéria nas plântulas crescidas em gerbox, a ocorrência maior de *X. vesicatoria* ocorreu nas sementes inoculadas por imersão (Figura 1B). Este fato pode estar relacionado ao maior tempo de exposição da semente com a fitobactéria e do maior teor de água nas sementes, uma vez que a água livre na semente promove um maior desenvolvimento da fitobactéria (5). Observou-se, porém, a partir dos 30 dias uma queda acentuada e, altamente significativa, na

incidência de plântulas infectadas e de recuperação de *X. vesicatoria* a partir das sementes (Figura 1A e B). Mesmo sob condições ótimas para infecção, a taxa de transmissão da bactéria das sementes para as plântulas foi baixa, 15 a 17% (Figura 1A), semelhante ao descrito por Silva (8), embora se tenha constatado nos isolamentos em plântulas a presença da fitobactéria em 43% e 78% das sementes inoculadas à vácuo e por imersão, respectivamente (Figura 1B). Estes resultados podem estar associados ao favorecimento da flora microbiana originalmente presentes nas sementes ou que se estabeleceram ao longo dos procedimentos utilizados. O método de inoculação por imersão favoreceu o desenvolvimento de fungos como *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., enquanto que o método de inoculação a vácuo favoreceu o desenvolvimento de *Rhizopus* sp.. A presença de *Pectobacterium* sp. nas sementes inoculadas, tanto por imersão quanto a vácuo e semeadas em meio NAM, pode ter contribuído para a redução da incidência de *X. vesicatoria*, ao longo do armazenamento principalmente para as sementes inoculadas por imersão, que apresentaram uma tendência de aumento da ocorrência de *Pectobacterium* sp (Figura 1C), durante o armazenamento. Em todos os tratamentos, para a avaliação em gerbox, observou-se a presença de *Pectobacterium* sp. (Figura 1D). Os procedimentos utilizados para inoculação das sementes bem como a fitobactéria, de modo geral, não afetaram a qualidade fisiológica das sementes, medidas pela germinação aos 14 dias, mesmo com o armazenamento das sementes até 45 dias (Figura 1E).

Observou-se o efeito significativo da interação entre os procedimentos de inoculação, secagem e das condições de ambiente antes da montagem dos testes sobre a recuperação e sobrevivência de *X. vesicatoria* e da flora microbiana das sementes de tomate. Observou-se uma redução significativa da recuperação de *X. vesicatoria* em meio NAM a partir das sementes de tomate, quando estas foram submetidas à incubação por 48 hs em ambiente com 90% de UR e por 24 hs em papel umedecido, tanto no teste realizado às 24 hs como 30 dias após a aplicação dos tratamentos (Figura 2 A e D). Simultaneamente, observou-se uma elevação no percentual de recuperação de *Pectobacterium* sp. principalmente quando as sementes foram armazenadas por 30 dias (Figura 2 B e E), e em menor intensidade de bactérias fluorescentes, observada na avaliação realizada logo após a aplicação dos tratamentos, principalmente naquele submetido a 24 h de incubação em papel umedecido (Figura 2 C). Na avaliação realizada após 30 dias não houve diferenças entre os tratamentos quanto à recuperação de bactérias fluorescentes (Figura 2 F). Embora não se tenham observado diferenças significativas entre os tratamentos de inoculação sem secagem, e aqueles em que as sementes foram secas até 4% e 8% de umidade, na avaliação realizada logo após a aplicação dos tratamentos, foi observado efeito benéfico da secagem sobre a sobrevivência da fitobactéria, principalmente até 4% de umidade (Figuras 2 A e D). Este resultado pode estar associado à redução da população inicial de *Pectobacterium* sp. com a secagem até 4% de umidade, como observado nas avaliações realizadas às 24 horas e 30 dias após a aplicação dos tratamentos, seja no tratamento testemunha como no de incubação por 48 horas sob ambiente com 90% de UR (Figuras 2 B e E). O efeito benéfico da secagem sobre a sobrevivência de *X. vesicatoria*, porém, foi eliminado durante o processo de embebição das sementes, pois a exposição destas por 24 hs em papel umedecido resultou em redução acentuada na porcentagem de recuperação da fitobactéria e aumento acentuado na recuperação de *Pectobacterium* sp., em todos os tratamentos (Figura 2 A, B, D e E).

Os dois métodos de inoculação avaliados foram eficientes e podem ser utilizados em trabalhos de rotina pois não interferem na viabilidade

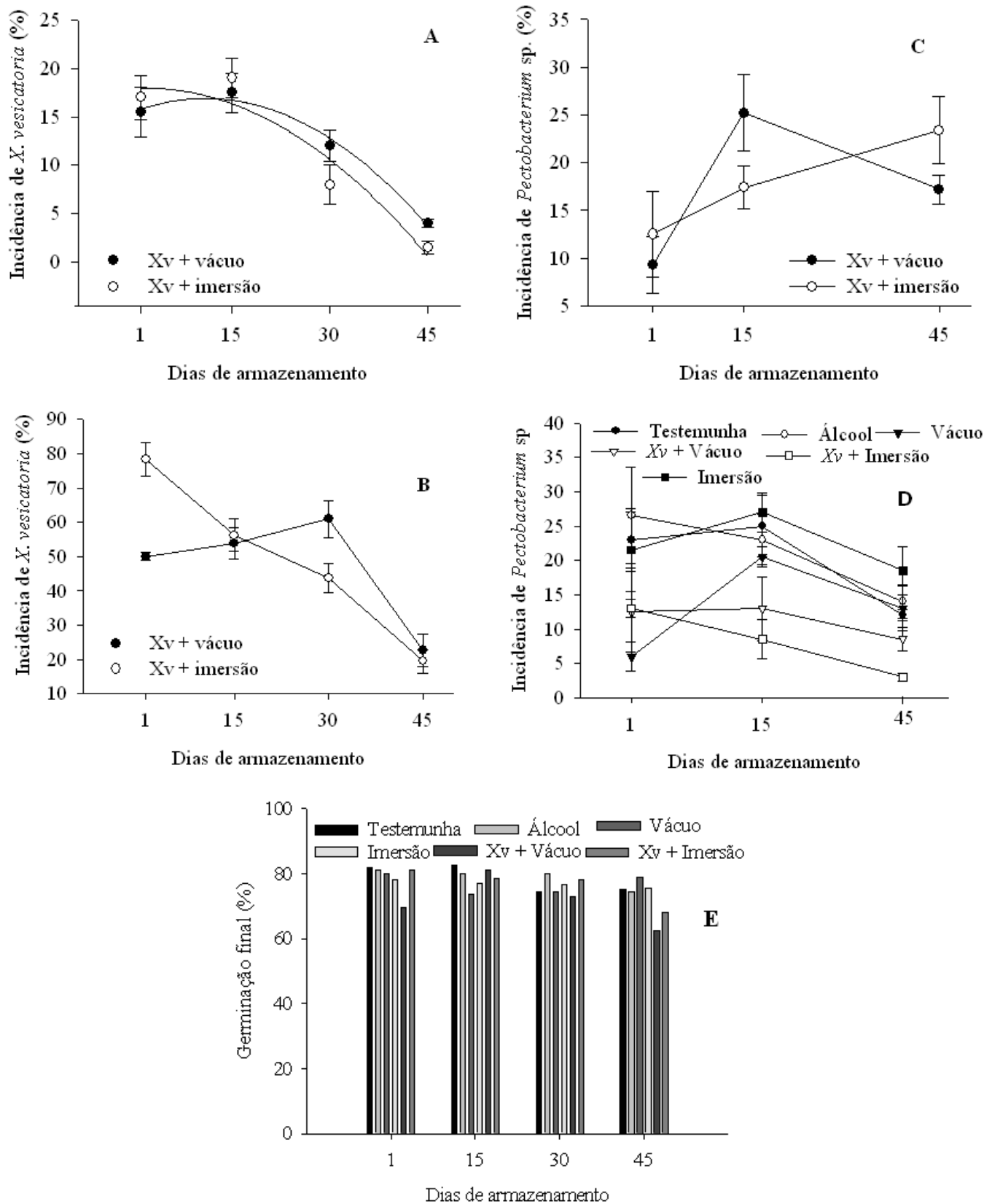


Figura 1 - Eficiência da inoculação de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomate, cv. Miss Brasil, pelos métodos a vácuo e por imersão, expressa pela incidência de plântulas infectadas por *Xanthomonas vesicatoria* ($Y_{xv+v\u00e1cuo} = 15,55 + 0,2468x - 0,01131x^2$ ($R^2=0,98$) e $Y_{xv+imers\u00e3o} = 17,92 + 0,03331x - 0,009267x^2$ ($R^2=0,92$) em meio NAM (A); em testes de crescimento em caixas pl\u00e1sticas tipo gerbox (B); Incid\u00eancia de sementes com *Pectobacterium* sp. em meio NAM (C); Incid\u00eancia de pl\u00e1ntulas com *Pectobacterium* sp. em teste de crescimento (D) e percentual de germina\u00e7\u00e3o aos 14 dias ap\u00f3s semeio em gerbox, durante o per\u00edodo de armazenamento (E).

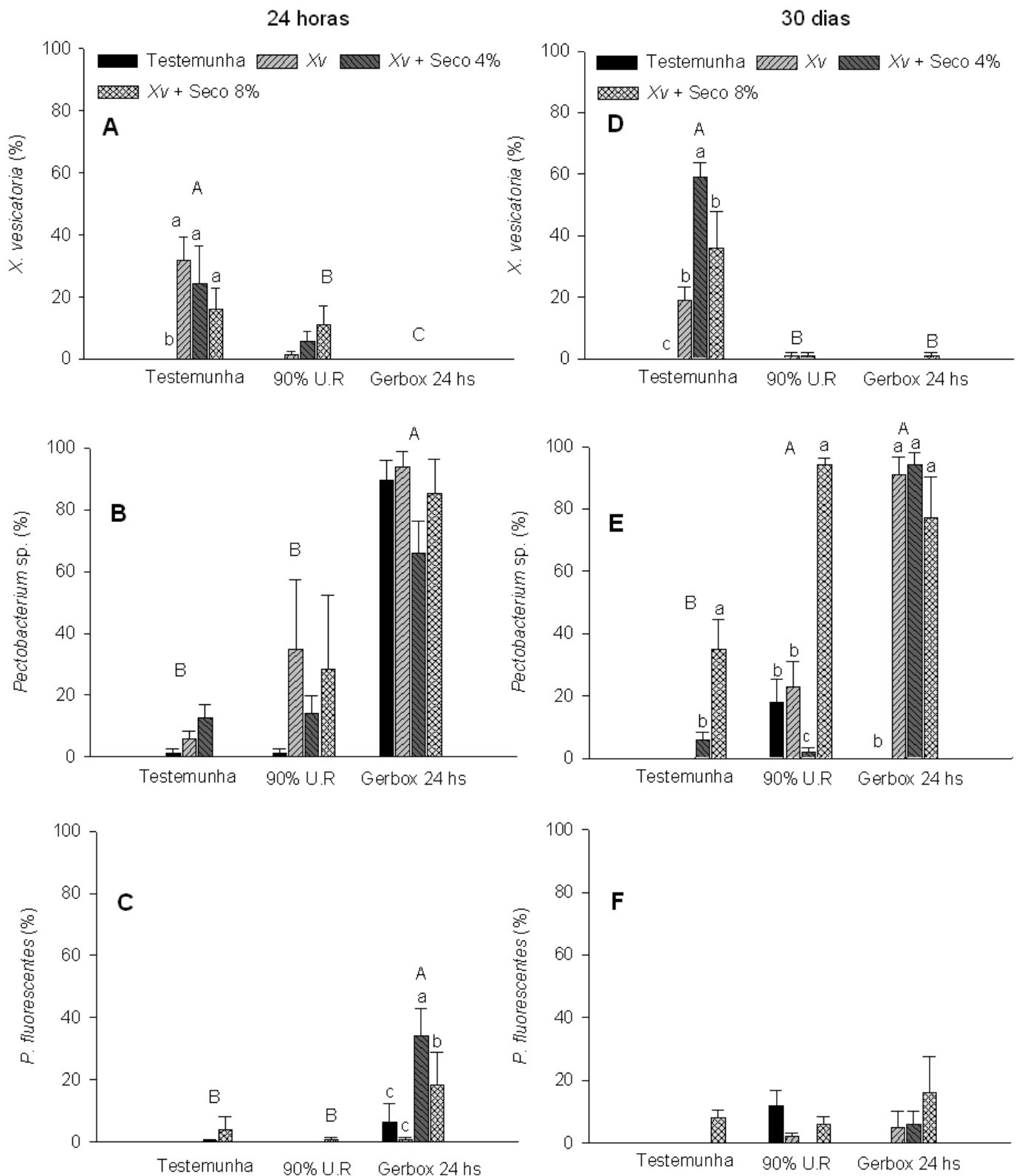


Figura 2 - Efeito da secagem das sementes de tomate inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria* e de tratamentos aplicados às mesmas (testemunha; exposição à ambiente com 90% U.R. e 30° C por 24 horas; embebição em papel germitest por 24 horas) sobre a recuperação da fitobactéria e desenvolvimento da flora microbiana, *Pectobacterium* sp. e bactérias fluorescentes, após 24 horas (A, B e C) e 30 dias da inoculação (D, E e F). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre grupos e minúsculas dentro dos grupos, não diferem estatisticamente teste de Scott-Knot ($P < 0,05$).

e qualidade das sementes. As sementes, porém, devem ser utilizadas até 30 dias após a inoculação, a partir de quando ocorre uma redução acentuada na taxa de recuperação de células viáveis, principalmente no método por imersão. O teor de água das sementes interfere na sobrevivência e na transmissão de *X vesicatoria* pelas sementes de tomate. Durante o processo de embebição, que ocorre naturalmente na fase inicial da germinação das sementes, ocorre rápida proliferação de bactérias saprófitas, incluindo *Pectobacterium* sp., que inibem o desenvolvimento de *X. vesicatoria* e podem explicar os baixos percentuais de recuperação e de transmissão da fitobactéria da semente para a plântula nos testes de crescimento em gerbox.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica do primeiro autor e à empresa Agristar pelo fornecimento das sementes de tomate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bashan, Y.; Assouline, I. Complementary bacterial enrichment techniques for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in infested tomato and pepper seeds. *Phytoparasitica*, v.11, p.187-193, 1983.

2. Brasil. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Brasília, SNDA / DNDV / CLAV, 1992. 365p.
3. Fahy, P.C.; Hayward, A. C. Media and methods for isolation and diagnostic test. In: Fahy, P. C.; Persley, G. J. (Ed.) **Plant bacterial diseases: a diagnostic guide**. Sydney: Academic Press, 1983. p. 337-338.
4. Galli, J.A.; Panizzi, R.C.; Sader, R.; Camargo, M. Efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* na germinação de sementes de couve-flor e eficiência de meios de cultura na detecção do patógeno em sementes de repolho. **Revista Brasileira de Sementes, Brasília**, v.23, n.2, p. 171-176, 2001.
5. Leben, C. Multiplication of *Xanthomonas vesicatoria* on tomato seedlings. **Phytopathology** v. 53, p.778-781, 1963
6. Maringoni, A.C. **Deteção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye em sementes de feijoeiro e conseqüências epidemiológicas**. 1993. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba.
7. Oliveira, J. R. de. **Deteção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro**. 1995. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal de Viçosa. Viçosa
8. Silva, A.M.S. **Deteção, erradicação e localização de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*)**. 1999 Tese (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica.
9. Vauterin, L.; Hoste, B.; Kersters, K.; Swing, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n.45, p.472-489, 1995.