

Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate

Margarida Goréte F. do Carmo¹; Fábio M. Correa²; Elizabeth S. Cordeiro³; Aldir de O. de Carvalho¹; Claudia A.V. Rossetto¹

¹UFRRJ, Depto. Fitotecnia, 23890-000 Seropédica-RJ; ²Bolsista iniciação científica CNPq/PIBIC; ³Aluna do Curso de Especialização em Tecnologia de Sementes; E-mail: gorete@ufrrj.br

RESUMO

Comparou-se a eficiência de tratamentos físicos e químicos na erradicação de *X. vesicatoria* em sementes de tomate 'Santa Clara Miss Brasil' e avaliou-se os seus efeitos sobre as qualidades fisiológica e sanitária das mesmas. As sementes foram inoculadas a vácuo com o isolado ENA 4463 de *X. vesicatoria*, e secas em estufa com ventilação à temperatura de 35°C, até atingirem 8% a 9% de teor de água. Compararam-se os tratamentos, HCl a 5%, por 10 minutos, calor seco (70°C/96 horas) e imersão em água a 50°C, durante 25 e 30 minutos, e as testemunhas de sementes não inoculadas e sementes inoculadas. As avaliações foram feitas após 24 horas, 15 e 30 dias de armazenamento em geladeira por meio de testes de germinação, blotter teste e isolamentos em meio semi-seletivo (NAM). O tratamento com HCl a 5% erradicou *X. vesicatoria* das sementes e proporcionou maior velocidade de germinação quando a semeadura foi feita logo após a aplicação do tratamento, porém, foi prejudicial à germinação e ao vigor das plântulas quando as sementes foram armazenadas. O tratamento com calor seco (70°C/96 horas) reduziu significativamente a população da bactéria e a velocidade de germinação, às 24 horas após a aplicação dos tratamentos, porém, manteve a qualidade fisiológica das sementes com o armazenamento. Os tratamentos com água aquecida por 25 e 30 minutos não afetaram a qualidade fisiológica das sementes, porém, não foram eficientes na erradicação nem na redução de *X. vesicatoria*.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*, patologia de sementes, tratamento de semente, mancha-bacteriana, controle.

ABSTRACT

Eradication treatments of *Xanthomonas vesicatoria* and its effect on the quality of tomato seeds

The efficiency of physical and chemical treatments in eradicating *X. vesicatoria* from tomato seeds and their effect on the physiological and sanitary quality of the seeds was evaluated. Seeds of tomato cv. 'Santa Clara Miss Brasil' were inoculated by vacuum with the strain ENA 4463 from *X. vesicatoria*. After the application of the treatment, the seeds were dried in a ventilated hothouse at 35°C to achieve 8 to 9% of water content. The following treatments were used: HCl at 5% for 10 minutes, dry heat (70°C for 96 hours), immersion in hot water at a temperature of 50°C for 25 and 30 minutes, and uninoculated original seeds and seeds solely inoculated as controls. The physiological and sanitary quality of the seeds were evaluated after 24 hours, and then, after 15 and 30 days of storage in a fridge, by means of germination tests, blotter test and isolation in a semi-selective medium (NAM). The treatment with HCl at 5% was efficient in eradicating *X. vesicatoria* from tomato seeds and increased germination speed when seeds were sown immediately after the treatment, but germination and seedling vigor were affected when seeds were stored. The dry heat treatment (70°C for 96 hours) reduced the bacteria population in the seeds significantly and germination speed, in the evaluation carried out 24 hours after the treatment, though the physiological quality of the seeds was not affected by storage. Treatment with hot water for 25 and 30 minutes did not affect the physiological quality of the seeds, but was not efficient in eradicating or reducing *X. vesicatoria*.

Keywords: *Lycopersicon esculentum*, seed pathology, seed treatment, bacterial spot, control.

(Recebido para publicação em 22 de maio de 2003 e aceito em 03 de abril de 2004)

A utilização de semente contaminada por fitobactérias, mesmo em baixas proporções, pode resultar em severas epidemias e perdas no viveiro e no campo, principalmente sob ambiente favorável (Carmo *et al.*, 1996a, 1996b). Um caso típico é *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Vauterin *et al.* (1995), agente da mancha-bacteriana do tomate (Kimura e Carmo, 1996). Carmo *et al.* (1996a), em estudos realizados na UFRRJ, mostraram que a utilização de sementes de pimentão com 0,01% de contaminadas por *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* pode resultar, sob condições

de ambiente favorável, em 100% de mudas contaminadas ao final de 30 dias.

O controle da doença deve incluir, necessariamente, o uso de sementes saudáveis ou com níveis de contaminação dentro de padrões aceitáveis, obtidos a partir de lavouras livres da doença ou pela aplicação de métodos de tratamento eficientes. Entre os métodos de tratamento de sementes descritos na literatura incluem-se métodos físicos, químicos e biológicos. Entre os métodos físicos, predominam os que preconizam o uso do calor aplicado por meio da exposição das sementes a temperaturas que

sejam letais ao patógeno, porém, que causem o mínimo de danos à viabilidade das sementes. Entre esses, está a imersão de sementes em água aquecida, o uso de calor seco, a corrente de vapor e o tratamento com energia solar (Grondeau e Samson, 1994), procedimentos que requerem precisão, pois a diferença entre a temperatura que inativa o patógeno e a que causa a morte da semente é mínima (Lopes e Quezado-Soares, 1997). Entre os principais relatos de termoterapia para erradicação de *X. vesicatoria* em sementes de tomate ou pimentão estão a imersão da semen-

te em água a 50°C, por 20 minutos (Machado, 2000) e o uso de calor seco a 70°C, por 96 horas (Silva *et al.*, 2002).

O tratamento via calor seco, além de eficiente, é efetivo para espectro amplo de patógenos, no entanto, elimina ou reduz a microflora associada à semente (Kimura, 1991). A ação do calor quase sempre provoca pequenos danos aos tecidos superficiais das sementes, podendo torná-las mais vulneráveis à ação de patógenos presentes no substrato de semeadura (Machado, 2000). A utilização do calor seco tem se mostrado eficiente no controle de fitobactérias em sementes de tomate e de pimentão (Baker, 1962; Kimura, 1991; Silva *et al.*, 2002). O seu princípio básico fundamenta-se na sensibilidade diferencial ao calor do patógeno e da semente, e a possibilidade de sucesso reside na diferença entre a temperatura para inativação da bactéria e da semente (Baker, 1962).

Grondeau *et al.* (1992) verificaram em sementes de ervilha que a temperatura de 65°C por 72 horas proporcionou melhor resultado na erradicação de *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* e preservação da viabilidade das sementes e que a eficiência do tratamento térmico e a melhor combinação temperatura e período de exposição pode variar com o lote e a cultivar.

O tratamento químico de sementes para o controle de fitobacterioses é feito principalmente com substâncias desinfetantes. Essas substâncias, no entanto, podem reduzir a germinação e são menos eficientes no controle de patógenos localizados na parte interna da semente (Lopes e Quezado-Soares, 1997). Entre os principais relatos de tratamento químico para erradicação de *X. vesicatoria* em sementes estão os de Maringoni e Kurozawa (1994). Os autores testaram diferentes substâncias e constataram maior eficiência com a aplicação de ácido clorídrico a 5%.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a eficiência de diferentes métodos de tratamento de sementes descritos para erradicação de *X. vesicatoria* em sementes de tomate e os seus efeitos sobre as qualidades fisiológica e sanitária das sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos na UFRRJ, de dezembro/2001 a junho/

2002. Utilizaram-se sementes de tomate, cultivar Santa Clara Miss Brasil, e o isolado ENA 4463 de *X. vesicatoria* crescido por 36 horas a 28°C em meio Nutriente Ágar-NA (Fahy e Hayward, 1983). As células bacterianas foram suspensas em solução Tampão Fosfato + NaCl (NaCl 0,85% + Tampão fosfato 0,005 N, pH 7,4) e a concentração ajustada para 10⁸ ufc/ml (85% de transmitância a 540 nm). As sementes foram inoculadas pelo método de infiltração a vácuo conforme metodologia descrita por Bashan e Assouline (1983) e secas em estufa a 35°C, por 48 horas ou até atingirem 8% a 9% de teor de água. Em seguida, as sementes foram acondicionadas em frascos hermeticamente fechados e armazenadas em geladeira (±12°C) até a aplicação dos diferentes tratamentos. Foram comparados os tratamentos: tratamento químico com ácido clorídrico a 5%, por 10 minutos (Maringoni e Kurozawa, 1994); tratamento térmico, via calor seco, a temperatura de 70°C durante 96 horas de exposição em estufa com circulação de ar (Silva *et al.*, 2002); tratamento por imersão em água a 50°C, durante 25 e 30 minutos com o auxílio de banho-maria (Reifschneider e Lopes, 1982). Como testemunhas, utilizaram-se dois tratamentos: sementes originais sem inoculação e sementes apenas inoculadas (Xv). Após a aplicação dos tratamentos, as sementes foram secas em estufa com ventilação à temperatura de 35°C, por 48 horas, para a padronização do teor de água até 8% a 9%, determinado conforme Brasil (1992), e acondicionadas em vidros e mantidas por 24 horas, 15 e 30 dias, em geladeira, quando foram submetidas aos testes para avaliação das qualidades fisiológica e sanitária. Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso com seis tratamentos e quatro repetições.

Para a avaliação da qualidade fisiológica, efetuou-se o teste de germinação com observações aos cinco e 14 dias da montagem do teste (Brasil, 1992) e de emergência e desenvolvimento das mudas em condições de viveiro, este apenas 24 horas após a aplicação dos tratamentos. No teste de germinação, em cada uma das três datas, utilizaram-se 100 sementes para cada uma das 24 par-

celas. Amostras de 25 sementes foram distribuídas sobre papel de filtro contido em caixas de plástico tipo Gerbox, tudo devidamente esterilizado. As caixas foram mantidas em câmara BOD por 14 dias com temperatura de 20°C, para o dia, e 30°C para noite, com fotoperíodo de 12 horas.

No teste de emergência e de desempenho dos tratamentos em condições de viveiro utilizaram-se 128 sementes por parcela, composta por uma bandeja de 128 células, totalizando 24 bandejas. A semeadura foi efetuada em bandejas de isopor preenchidas com substrato comercial "Macplant" e mantidas em casa-de-vegetação. Foi avaliado o estande desde o início da emergência completa das plântulas (aparecimento do par de folhas cotiledonares) até o ponto de transplante (pelo menos quatro folhas definitivas). A sanidade foi avaliada por meio da quantificação da incidência de mudas com sintomas visíveis de mancha-bacteriana e pela presença de sintomas causados por outros agentes.

Para a avaliação da sanidade, utilizaram-se três procedimentos: blotter teste às 24 horas, aos 15 dias e 30 dias, após a aplicação dos tratamentos, implante das sementes em meio semi-seletivo e extração, seguida de plaqueamento em meio semi-seletivo, 24 horas após a aplicação dos tratamentos.

No primeiro, amostras de 25 sementes foram distribuídas sobre papel de filtro, autoclavado e umedecido com água destilada e esterilizada, em cada caixa de plástico tipo Gerbox. Cada repetição foi representada por oito caixas, totalizando 200 sementes por parcela e 800 sementes por tratamento. As caixas foram mantidas em BOD sob temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12 horas luz, por dez dias, quando se quantificou o número de plântulas com sintomas de mancha-bacteriana, por meio de observação de sintomas nas folhas cotiledonares ou no eixo cotiledonar e, teste de exsudação em lâmina, seguido de isolamento em meio NA (Fahy e Hayward, 1983) para confirmação da presença da bactéria. Quantificou-se, ainda, o número de plântulas e sementes infectadas por outros agentes, fungos e outras bactérias, e o número de plântulas sadias.

Tabela 1. Porcentagem de plântulas normais de tomate na primeira contagem (vigor) e de germinação e de plântulas anormais na segunda contagem, obtidos de amostras de sementes de tomate inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria* e avaliadas às 24 horas e aos 15 e 30 dias após a aplicação dos tratamentos para erradicação da bactéria. Seropédica, UFRRJ, 2002.

Tratamento	Velocidade (%) ¹			Germinação (%) ²			Plântulas anormais (%) ²		
	24 horas	15 dias	30 dias	24 horas	15 dias	30 dias	24 horas	15 dias	30 dias
Testemunha não inoculada	9,25 b	5,25 bc	23,50 a	63,75 a	53,25 a	53,75 a	22,25 bc	40,25 ab	29,25 c
Testemunha inoculada - Xv	14,00 ab	14,25 abc	22,75 a	67,75 a	62,25 a	53,50 a	19,25 c	28,00 a	31,50 c
Xv + HCl a 5%/ 10 min	14,25 ab	4,00 c	5,75 b	50,00 b	21,00 b	25,00 b	32,00 b	58,00 a	57,00 a
Xv + Água a 50° C/25 min	13,25 ab	19,75 ab	11,75 ab	62,25 ab	43,75 ab	42,25 a	27,25 bc	44,75 ab	49,50 ab
Xv + Água a 50° C/30 min	18,50 a	26,50 a	15,75 ab	56,50 ab	49,00 a	55,25 a	23,00 bc	40,75 ab	38,75 bc
Xv + Calor seco a 70° C/96 h	1,00 c	3,75 c	7,50 ab	27,25 c	60,25 a	53,75 a	45,25 a	28,75 b	33,00 c
CV%	11,66	31,80	31,08	10,58	20,89	14,70	18,48	21,83	16,5

* médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Análise dos dados transformados para ¹ $Y = \arcsen(X/100)^{1/2}$; ² sem transformação.

No segundo procedimento, 16 sementes foram depositadas por placas de Petri contendo o meio semi-seletivo Nutriente Ágar Modificado (NAM) (Maringoni, 1993), seguido de incubação em BOD por 96 horas, à temperatura de 28°C. Utilizaram-se 18 placas por parcela, totalizando 288 sementes. A avaliação foi feita com base na presença ou não de colônias típicas de *X. vesicatoria* no referido meio e confirmação em teste de motilidade e de Gram.

No terceiro procedimento, tomaram-se amostras de 1000 sementes por parcela, as quais foram submetidas ao processo de extração, conforme Bashan e Assouline (1983). Cada amostra de 1000 sementes foi colocada em Erlenmeyer contendo 30 ml de solução tampão fosfato 0,005 M, pH 7,4 + 0,85% de NaCl (Silva *et al.*, 2002) (STP), seguido de repouso por 1 hora a 4°C. Após esse período, aplicaram-se à mistura dois ciclos consecutivos de vácuo de 680 mm Hg por 5 min., seguido de liberação rápida. Em seguida, as sementes foram peneiradas e o extrato obtido de cada amostra foi submetido à centrifugação a 14.000 rpm, por 30 minutos, à temperatura de 5°C. O “pellet” formado foi ressuspenso em 2 ml de solução salina seguido de diluição seriada (série 1:10), também em solução salina, e plaqueamento em meio semi-seletivo NAM. As avaliações foram feitas após quatro dias, verificando-se a presença de colônias típicas de *X. vesicatoria*, e observando seus movimentos ao microscópio ótico e teste de Gram. Os dados foram expressos pelo

número de unidade formadora de colônia (ufc) por 1.000 sementes.

Os dados, expressos em porcentagem, foram transformados para $\arcsen(X/100)^{1/2}$, na primeira contagem do teste de germinação, para $(X+1)^{1/2}$, para a ocorrência de fungos e bactérias nos testes de sanidade, e para $\log(X+1)$, para a contagem do número de ufc no teste indireto de detecção. Foram submetidos à análise de variância, com médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto a inoculação como os tratamentos aplicados às sementes interferiram no teor de água das mesmas. A inoculação a vácuo, apesar de ser entre os procedimentos descritos na literatura o mais rápido, promoveu elevação no teor de umidade das sementes de 16% para, em média 37% de água. Quanto aos tratamentos de erradicação, a imersão em água aquecida, por 25 e 30 minutos, elevou o teor de umidade para 67% e 73% de água, respectivamente, o tratamento com HCl a 5% elevou para 47% de água, e o tratamento térmico via calor seco, reduziu para 3% de água. Após o processo de secagem por 48 horas a 35°C, o teor de água das sementes ficou entre 8% e 9%, exceto para as sementes submetidas ao tratamento via calor seco, que se estabilizou em 4%.

Quanto à qualidade fisiológica das sementes, observou-se, em geral, variação entre os tratamentos, nas três datas de avaliação (Tabela 1). O tratamento de inoculação (Xv) não afetou a veloci-

dade e a porcentagem de germinação, em nenhuma das três datas de avaliação, tendo apresentado desempenho igual estatisticamente ou superior ao tratamento testemunha sem inoculação (Tabela 1) o que comprova que a fitobactéria não afeta a qualidade fisiológica das sementes de tomate. Na avaliação realizada após 24 horas, as sementes que foram apenas inoculadas e aquelas que foram submetidas ao tratamento com HCl a 5% e água aquecida, apresentaram maior velocidade de germinação, avaliado pelo teste de primeira contagem, e as que foram submetidas ao calor seco (70°C/96 horas) apresentaram menor velocidade e menor porcentagem de germinação, em relação aos demais tratamentos e maior porcentagem de plântulas anormais (caracterizadas como danificadas ou deformadas) (Tabela 1). Esse efeito deve-se, provavelmente, ao reduzido teor de água das sementes submetidas a esse tratamento, 4% após a padronização.

Nas avaliações realizadas aos 15 e 30 dias de armazenamento, foram observadas menores velocidade e porcentagem de germinação e maior porcentagem de plântulas anormais nas sementes tratadas com HCl a 5% (Tabela 1), embora não tenha diferido de outros tratamentos, indicando que ocorreu prejuízo à qualidade das sementes e concordando com o relato de Fatmi e Schaad (1991).

Nas avaliações realizadas aos 15 e 30 dias após armazenamento, foi observada maior porcentagem de germinação das sementes submetidas ao calor seco (70°C/96 horas) (Tabela 1), devido, provavel-

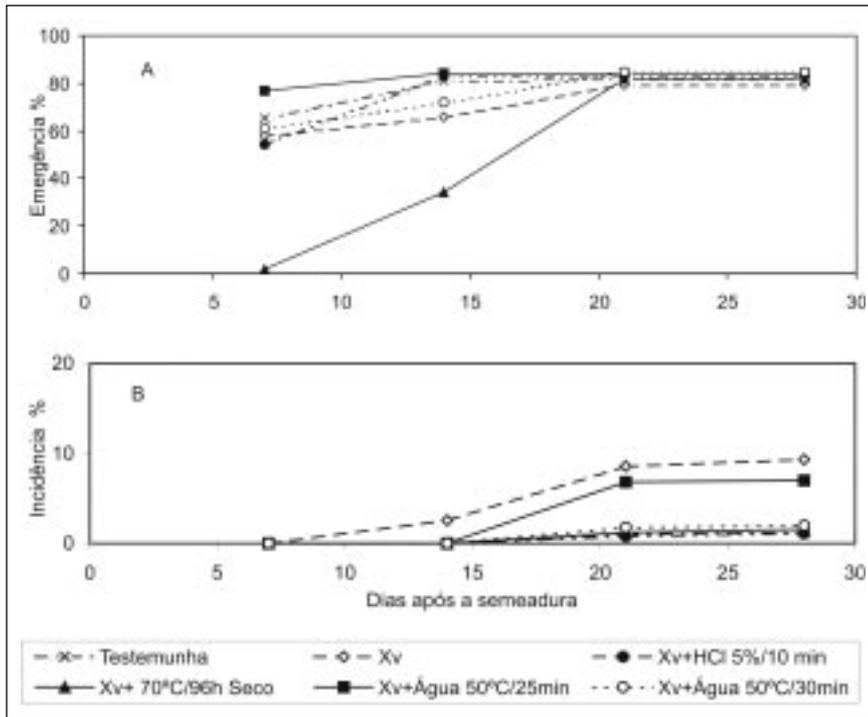


Figura 1. Emergência de plântulas de tomate (A), oriundas de sementes inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria* (Xv) e de sementes inoculadas e tratadas com HCl a 5% por 10 minutos, via calor seco a 70°C por 96 horas e com água a 50°C por 25 e por 30 minutos e testemunha e, incidência de mudas com sintomas de mancha bacteriana (B), nos respectivos tratamentos. Seropédica, UFRRJ, 2002.

Tabela 2. Porcentagem de sementes saudas e de recuperação de *Xanthomonas vesicatoria* e de outras bactérias a partir de sementes de tomate, cv. Santa Clara Miss Brasil, inoculadas a vácuo e submetidas a diferentes tratamentos, avaliadas em meio semi-seletivo NAM pelo implante direto das sementes ou cultivo a partir de extrato de 1.000 sementes, exposto pelo número de unidades formadoras de colônia por 1.000 sementes. Seropédica, UFRRJ, 2002.

Tratamento	Implante direto em NAM %			UFC/1000 sementes ²
	Saudas ¹	X. vesicatoria ¹	Bactérias ¹	
Testemunha não inoculada	99,3 a	0,0 c	0,6 cd	0,0 b
Testemunha inoculada - Xv	40,0 bc	46,0 a	14,0 b	3152,0 a
Xv + HCl a 5%/ 10 min	100,0 a	0,0 c	0,0 d	0,0 b
Xv + Água a 50° C/25 min	29,3 c	31,3 ab	39,3 a	680,0 a
Xv + Água a 50° C/30 min	76,6 ab	14,0 b	9,3 bc	645,3 a
Xv + Calor seco a 70° C/96 h	100,0 a	0,0 c	0,0 d	184,0 b
CV%	10,4	22,6	26,1	37,32

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. ¹ Análise de dados sem transformação e de ² dados transformados para $Y=\log(X+1)$.

mente, à uniformização do teor de água das sementes durante o armazenamento. Já o tratamento com água aquecida, por 30 minutos, favoreceu as maiores velocidades e porcentagens de germinação e as maiores porcentagens de plântulas anormais, embora não diferindo estatisticamente de outros tratamentos (Tabela 1).

Em condições de viveiro, observou-se o mesmo comportamento. O trata-

mento a 70°C/96 horas retardou a emergência, tendo apresentado número de plantas significativamente menor que em todos os demais tratamentos, até 14 dias após a semeadura, igualando aos demais, aos 21 dias da semeadura (Figura 1A).

Apesar dos tratamentos água aquecida por 25 e 30 minutos, serem, entre os quatro procedimentos testados,

os que menos danos causaram às sementes (Tabela 1) não foram eficientes na erradicação de *X. vesicatoria* (Tabelas 2 e 3). No teste pelo implante de sementes no meio seletivo, o tratamento com água aquecida por 25 minutos permitiu a recuperação da fitobactéria em 31% das sementes, igual estatisticamente ao tratamento inoculado (Xv) com 46%. O tratamento por imersão em água aquecida por 30 minutos foi superior estatisticamente à testemunha e ao mesmo tratamento, com exposição de 25 minutos, porém, ainda assim, com uma alta taxa de recuperação da fitobactéria, 14% (Tabela 2). O tratamento com água aquecida por 25 minutos, além da alta porcentagem de recuperação de *X. vesicatoria*, apresentou alta porcentagem de ocorrência de outras bactérias (*Erwinia* sp. e *Bacillus* sp.) seguido do mesmo tratamento com exposição de 30 minutos e da testemunha inoculada (Tabela 2). Por outro lado, os tratamentos com HCl a 5% e calor seco (70°C/96 horas) apresentaram 100% das sementes isentas de qualquer contaminação no referido meio. Observou-se, ainda, alta taxa de recuperação da fitobactéria nestes dois tratamentos, água aquecida por 25 e 30 minutos, no teste indireto (extração seguida de plaqueamento em meio semi-seletivo) igual estatisticamente à testemunha inoculada (Xv) (Tabela 2). Humaydan *et al.* (1980), ao contrário, observaram erradicação de *X. campestris* pv. *campestris* em sementes de brássicas com tratamento semelhante, porém com redução na germinação e no vigor das sementes em oito das onze cultivares testadas.

O tratamento com ácido clorídrico a 5% durante 10 minutos foi eficiente na erradicação de *X. vesicatoria* (Tabela 2), porém, afetou a qualidade das sementes (Tabela 1). Maringoni e Kurozawa (1994) observaram erradicação da bactéria apenas com exposição das sementes ao HCl a 5% por cinco horas, com pequena redução na emergência das plântulas em relação às sementes não tratadas. Essa diferença pode, em parte, ser explicada por variações na sensibilidade do teste e nos tamanhos da amostra, conforme discutido por Silva *et al.* (2002).

Quanto ao tratamento com calor seco (70°C/96 horas), houve redução

Tabela 3. Porcentagem de plântulas de tomate sadias e lesionadas (sintomas de necrose e anasarca) e de ocorrência de *Xanthomonas vesicatoria* e de *Erwinia* sp. nas plântulas e de *Aspergillus* sp. nas sementes, em amostras de sementes inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria* (ENA 4463) e submetidas a diversos tratamentos e avaliadas em teste de sanidade em caixas plásticas tipo Gerbox, às 24 horas, 15 e 30 dias após aplicação dos tratamentos. Seropédica, UFRRJ, 2002.

Tratamento	Plântulas sadias % ¹		Plântulas lesionadas% ²		<i>X. vesicatoria</i> ³		<i>Erwinia</i> sp. ³	<i>Aspergillus</i> sp. ³
	15 dias	30 dias	24 horas	30 dias	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias
Testemunha não inoculada	89,3 a	87,3 a	0,0 b	0,0 b	0,00 c	0,00 a	10,65 c	1,32 ab
Testemunha inoculada - Xv	79,3 abc	77,0 ab	5,3 a	4,3 a	7,49 a	3,04 a	12,49 bc	0,00 b
Xv+ HCl a 5%/ 10 min	73,6 c	80,5 a	1,3 b	0,7 ab	2,99 bc	0,50 a	22,99 a	1,83 ab
Xv+ Água a 50° C/25 min	71,7 c	36,0 d	2,9 ab	3,6 ab	6,65 ab	3,70 a	19,66 ab	5,33 ab
Xv+ Água a 50° C/30 min	76,7 bc	60,3 c	2,1 ab	3,6 ab	4,99 ab	5,19 a	17,98 abc	4,99 ab
Xv+ Calor seco a 70° C/96 h	86,0 ab	65,3 bc	1,4 b	1,2 ab	1,33 c	0,71 a	12,32 bc	6,32 a
CV%	5,9	8,9	50,9	53,1	20,31	36,82	12,16	33,81

* médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Análise dos dados transformados para ¹ $Y = \arcsen(X/100)^{1/2}$; ² sem transformação; ³ $\text{raiz}(x+1)^{1/2}$.

acentuada na população de *X. vesicatoria* das sementes, porém não erradicação (Tabela 2), concordando com os resultados de Silva *et al.* (2002). Fourest *et al.* (1990) observaram que o tratamento térmico a 71°C, por quatro dias, e 84°C, por 11 dias, via calor seco, erradicou *X. campestris* pv. *translucens* em sementes de cevada moderada e severamente contaminadas, respectivamente, porém com redução na taxa de germinação das sementes.

No teste de sanidade em caixas plásticas tipo Gerbox realizado a 24 horas, em quase todos os tratamentos, exceto na testemunha, constatou-se a presença de plântulas com sintomas visíveis de necrose e anasarca, causados por *X. vesicatoria* e *Erwinia* sp., com maiores percentuais na testemunha inoculada (Xv) e naqueles onde as sementes foram imersas em água aquecida, por 25 e 30 minutos (Tabela 3). É importante salientar que nesse teste não foi feita a quantificação exclusiva para a presença de *X. vesicatoria* devido à expressão significativa de plântulas com sintomas causados por *Erwinia*, passíveis de ser confundidos com os da mancha-bacteriana em plântulas. Ainda, analisando a porcentagem de plântulas sadias, sem sintoma visível mesmo após observação em microscópio estereoscópico, não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos no teste montado com 24 horas. Esse mesmo resultado foi observado em condições de viveiro, onde não houve diferença significativa entre os tratamentos para a ocorrência de tombamento e morte das plântulas. Nos tes-

tes realizados aos 15 e 30 dias, observaram-se, em geral, menores percentuais de plântulas sadias nos tratamentos por imersão em água a 50°C, por 25 e 30 minutos, e em HCl a 5%. Aos 30 dias, os dois tratamentos com água aquecida apresentaram os menores percentuais de plântulas sadias seguido do tratamento com calor seco e, em geral, não houve diferenças entre os tratamentos para a porcentagem de plântulas lesionadas (Tabela 3).

Essa variação nos resultados com o armazenamento pode, entre outros fatores, estar associada ao efeito dos tratamentos sobre a integridade do tegumento das sementes e sobre a flora microbiana das mesmas. Observou-se, com o armazenamento, redução na ocorrência de plântulas infectadas por *X. vesicatoria* e aumento da ocorrência de *Erwinia* sp. e de fungos como *Penicillium* sp., *Curvularia* sp., *Rhizopus* sp., *Monilia* sp. e, principalmente, *Aspergillus* sp. Os resultados para a presença de *X. vesicatoria* nas plântulas aos 15 dias estão de acordo com os encontrados nos testes em meio seletivo, porém, com taxa de recuperação muito menor, indicando a baixa sensibilidade do teste para a fitobactéria. Aos 30 dias, apesar de numericamente ser observada a mesma tendência, não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, provavelmente, pelo aumento na ocorrência de outros microrganismos, principalmente *Erwinia* sp. (Tabela 3). Essa ocorrência foi significativamente maior nos tratamentos com HCl a 5% e com água

aquecida por 25 e 30 minutos na avaliação de 15 dias enquanto que a de *Aspergillus* sp. foi maior nos tratamentos com calor seco (70°C/96 horas) seguido dos tratamentos com água aquecida, mesmo não tendo diferido estatisticamente dos demais (Tabela 3). Em geral, a frequência de fungos variou entre os tratamentos e com o armazenamento, tendo-se observado uma tendência para o aumento deles, nas sementes tratadas com calor, e de *Erwinia* sp. nas sementes submetidas a tratamentos com imersão, em água aquecida ou em ácido.

No ensaio em condições de viveiro, observaram-se sintomas da mancha bacteriana em 2,4% das mudas originadas de sementes inoculadas (Xv) aos 14 dias da semeadura e nenhum sintoma nas mudas originadas de sementes dos demais tratamentos (Figura 1B). Aos 21 dias, por sua vez, foram constatados 8,6% e 6,8% de incidência da mancha bacteriana, em mudas originadas das sementes inoculadas e das tratadas com água aquecida por 25 minutos, respectivamente. Nessa mesma data, foram observadas mudas sintomáticas nos demais tratamentos, porém em baixa incidência e igual estatisticamente ao observado no tratamento testemunha. Deve-se considerar, no entanto, que muitas dessas infecções, provavelmente, se desenvolveram a partir de dispersão secundária de inóculo, conforme relatado por Carmo *et al.* (1996b).

Os métodos físicos de tratamento de sementes, água aquecida ou calor seco afetam a flora microbiana das sementes

e não têm ação residual, o que sugere a necessidade do uso complementar de fungicidas protetores ou de alguma técnica de microbiolização para proteção contra reinfestação por patógenos de armazenamento e proteção contra patógenos habituais do solo. A alteração na microflora da semente pelos tratamentos pôde também ser observada nos isolamentos no meio seletivo. Observou-se o desenvolvimento de *Rhizopus* sp. apenas nos tratamentos testemunha e inoculação apenas (Xv) e maior frequência de bactérias no tratamento com imersão em água aquecida, por 25 minutos.

Com base nos resultados, pode-se apontar para a recomendação do tratamento com HCl apenas para semeio imediato enquanto o uso do tratamento via calor seco (70°C por 96 horas) para armazenamento das sementes antes da semeadura.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento do projeto e à empresa Agristar do Brasil Ltda. pelo fornecimento das sementes de tomate.

LITERATURA CITADA

- BAKER, K.F. Thermotherapy of planting material. *Phytopathology*, v.52, p.1244, 1962.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. *Regras para Análise de Sementes*. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365 p.
- CARMO, M.G.F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L.A.; CARVALHO, A.O. Determinação do nível de tolerância de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, n.2, p.336-341, 1996a.
- CARMO, M.G.F.; MAFFIA, L.A.; KIMURA, O.; CARVALHO, A.O. Disseminação da pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, em condições de viveiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.20, n.1, p.85-93, 1996b.
- FAHY, P.C.; HAYWARD, A.C. Media and methods for isolation and diagnostic test. In: FAHY, P.C.; PRESLEY, G.J. (Ed.) *Plant Bacterial Diseases: a diagnostic guide*. Sidney: Academic Press, 1983. p.337-338.
- FATMI, M.; SCHAAD, N.W. Seed treatment for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plant Disease*, v.75, p.383-385, 1991.
- FOUREST, E.; REHMS, L.D.; SANDS, D.C.; BJARKO, M.; LUND, R.E. Eradication of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from barley seed with dry heat treatments. *Plant Disease*, v.74, n.10, p.816-818, 1990.
- GRONDEAU, C.; LADONNE, F.; FOURMOND, A. Attempt to eradicate *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from pea seeds with heat treatments. *Seed Science & Technology*, v.20, p.515-525, 1992.
- GRONDEAU, C.; SAMSON, R. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.13, n.1, p.57-75, 1994.
- HUMAYDAN, H.S.; HARMAN, G.E.; NEDROW, B.L.; DENNITTO, L.V. Eradication of *Xanthomonas campestris*, the causal agent of black rot from Brassica seeds with antibiotics and sodium hypochlorite. *Phytopathology*, v.70, n.1, p.127-131, 1980.
- KIMURA, O. Controle de fitobactérias em hortaliças através do tratamento térmico de sementes. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.6, n.3, p.8, 1991.
- KIMURA, O.; CARMO, M.G.F. Enfermidades bacterianas do pimentão. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.18, p.66-73, 1996.
- LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. *Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle*. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1997. 70 p.
- MACHADO, J.C. *Tratamento de sementes no controle de doenças*. Lavras: UFLA, 2000. 138p.
- MARINGONI, A.C. *Deteção de Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye em sementes de feijoeiro e conseqüências epidemiológicas. 1993. 79 p. (Tese doutorado), ESALQ, USP, Piracicaba.
- MARINGONI, A.C.; KUROSZAWA, C. Erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. *Revista Brasileira de Sementes*, v.16, n.2, p.191-194, 1994.
- REIFSCHNEIDER, F.J.B.; LOPES, C.A. *Tratamento de sementes de hortaliças para o controle de doenças*. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1982. 6 p. (Instruções técnicas, 3).
- SILVA, A.M.S.; CARMO, M.G.F.; OLIVARES, F.L.; PEREIRA, A.J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, n.4, p.586-593, 2002.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWING, J. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, n.45, p.472-489, 1995.