

Transporte de *Xanthomonas vesicatoria* de sementes para plântulas e mudas de tomate

Débora AG da Silva¹; Aldir de O de Carvalho¹; Maurício B Pereira²; Fábio L Olivares³; Margarida Goréte F do Carmo¹

¹UFRRJ-IA, Depto. Fitotecnia, BR-467 km 07, 23890-000 Seropédica-RJ; deb.gon@globo.com (autor correspondente); gorete@ufrj.br; ²UFRRJ-IB, Depto. Genética; ballesta@ufrj.br; ³UENF-CBB, Lab. Biol. Celular e Tecidual, 28013-602 Campos dos Goytacazes-RJ; fabioliv@uenf.br

RESUMO

O transporte e a transmissão de bactérias do complexo *Xanthomonas vesicatoria* pelas sementes de tomate é um dos principais mecanismos de sobrevivência e disseminação do patógeno para novas áreas. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de elucidar o processo de infecção e colonização das sementes, plântulas e mudas de tomate. Foram realizados experimentos utilizando o isolado ENA 4463 de *X. vesicatoria* e a cultivar Santa Clara Miss Brasil, cujas sementes foram inoculadas a vácuo ou por injeção de suspensão bacteriana na região da placenta de frutos verdes. O semeio foi feito em caixas Gerbox, contendo papel germitest, bandejas de alumínio contendo areia ou bandejas de isopor (128 células), contendo substrato comercial para produção de mudas. As avaliações nos testes em Gerbox foram feitas ao longo de seis dias por isolamentos diretos e indiretos em meio NA para quantificação da população bacteriana associada aos diferentes órgãos das plântulas. Nos testes de emergência em areia e em substrato, foram realizadas avaliações ao longo de 30 dias utilizando os mesmos procedimentos. A fitobactéria foi facilmente reisolada do tegumento ao longo dos primeiros seis dias e da radícula, do hipocótilo e folhas cotiledonares logo após a sua emissão aos dois e três dias do semeio, respectivamente. A máxima população de *X. vesicatoria* foi observada às 48 h após o semeio por ocasião da emissão da radícula. Nos experimentos em areia e em substrato comercial, observou-se que a bactéria, a partir do tegumento, coloniza todos os órgãos da planta à medida que estes são emitidos. A bactéria pode sobreviver como residente na raiz, hipocótilo, folhas cotiledonares e definitivas até pelo menos 30 dias após o semeio, sem necessariamente causar sintomas.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*, mancha bacteriana, patologia de sementes, germinação, epidemiologia.

ABSTRACT

Transport of *Xanthomonas vesicatoria* from seeds to seedlings and to plants of tomato

Transmission of *Xanthomonas vesicatoria* by seeds is one of the major sources of inoculum for development of epidemic bacterial spot. The aim in this work was elucidating the process of infection and colonization of tomato seeds and seedlings by these bacteria. Three experiments were carried out using *X. vesicatoria*, ENA 4463 isolate, and tomato seeds from Santa Clara Miss Brasil cultivar. Seeds were inoculated using vacuum or by injection of bacterial suspension in the region of the placenta of green fruits. Sowing was done in Gerbox boxes, aluminum or Styrofoam trays (128 cells) containing germitest paper, sand or commercial substrate for seedlings, respectively. Seedlings in Gerbox were assessed along six days by the quantification of bacterial population associated to different organs, through direct and indirect isolation on NA medium. In sand and commercial substrate, assessments were carried out until 30 days using the same procedures. Bacteria was easily isolated from the coat along the first six days, and from radicles, hypocotyls and cotyledon leaves just after the organs appearance, at two or three days after sowing, respectively. Maximum population of *Xanthomonas vesicatoria* was observed at 48 hours after sowing at the time of radicle protrusion. In sand and commercial substrate experiments, the bacteria colonized all plant organs and this process occurred as they arose. These bacteria can survive as resident at roots, epicotyls, cotyledon and definitive leaves until, at least, 30 days after sowing, not necessarily causing symptoms.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, bacterial spot, seed pathology, germination, epidemiology.

(Recebido para publicação em 3 de novembro de 2011; aceito em 23 de janeiro de 2013)

(Received on November 3, 2011; accepted on January 23, 2013)

A mancha bacteriana do tomateiro pode ser causada por um complexo de espécies pertencentes ao gênero *Xanthomonas*: *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (Jones *et al.*, 2004), todas elas já relatadas no Brasil (Costa *et al.*, 2012); Quezado-Duval *et al.*, 2005). A diferenciação destas, porém, depende

de testes específicos, incluindo técnicas moleculares rep-PCR ou PCR com iniciadores específicos (Pereira *et al.*, 2011).

O transporte e a transmissão de bactérias do complexo *Xanthomonas vesicatoria* (Vauterin *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 2004) pelas sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) é um dos prin-

cipais mecanismos de sobrevivência e disseminação do patógeno para novas áreas de cultivo (Carmo *et al.*, 2004). Bactérias fitopatogênicas, em geral, podem estar associadas às sementes de diferentes formas, aderidas aos tricomas, ao tegumento ou embrião e, ou sob o tegumento e serem eficientemente transmitidas para as plantas em condições de

viveiro ou campo (Schaad, 1982; Goto, 1992; Silva *et al.*, 2002; Romeiro, 2005). Para a associação entre *X. vesicatoria* e sementes de tomate tem sido relatado apenas o transporte superficial, aderida ao tegumento e tricomas, sem que isto implique em danos à qualidade fisiológica das sementes e nem sempre resultando em plantas infectadas. (Silva *et al.*, 2002; Corrêa *et al.*, 2008). A taxa de transmissão de *X. vesicatoria* pelas sementes, assim como de várias outras fitobactérias, é baixa (Schaad, 1989; Carmo *et al.*, 2004), contudo, a utilização de sementes contaminadas pode resultar em plantas infectadas e introdução precoce da doença em viveiros e campos de produção e, sob condições favoráveis de temperatura e umidade, ocorrer rápida disseminação e sérios prejuízos às lavouras (Carmo *et al.*, 1996; Carmo *et al.*, 2004).

Entre as variáveis que mais interferem na eficiência da transmissão no desenvolvimento das fitobacterioses pelas sementes podem-se citar as condições de ambiente como temperatura, umidade e pH, além da flora microbiana presente na semente e no substrato (Romeiro, 2005). Vários estudos têm fornecido evidências de que as sementes abrigam diversificada flora microbiana, tanto em sua superfície como associada aos tecidos internos (Normander & Prosser, 2000; Bacilio-Jimenez *et al.*, 2001), cuja multiplicação é estimulada durante a embebição, no início do processo de germinação (Buyer *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 2001; Nelson, 2004). Minutos após o início da embebição, e nas 12 até 24 horas subsequentes, grandes quantidades de exsudados são liberados através do tegumento rompido (Nelson, 2004) servindo como fonte de nutrientes para a flora microbiana associada à semente, ou presente no substrato ao seu redor, estimulando o seu rápido crescimento e a colonização da semente e da região da espermosfera (Hadar *et al.*, 1983; Nelson, 2004).

A elucidação dos eventos iniciais e da interação entre flora microbiana e semente em processo de germinação e, conseqüentemente, da infecção e transmissão de fitobactérias, é muito importante para uma série de estudos na área de patologia de sementes. O

seu entendimento poderá vir a auxiliar no desenvolvimento de técnicas de detecção e de métodos mais eficientes de tratamento das sementes e controle das doenças de etiologia bacteriana. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de elucidar o mecanismo de transporte e sobrevivência de *X. vesicatoria* em sementes de tomate incluindo a colonização do tegumento e órgãos de plântulas e mudas de tomate durante o processo de embebição, germinação e desenvolvimento inicial das plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Três experimentos (EXP1, EXP2 e EXP3) foram realizados em laboratório da UFRRJ, entre os meses de junho de 2007 e fevereiro de 2008, utilizando-se sementes, sem tratamento prévio com fungicidas, da cultivar Santa Clara Miss Brasil, doadas pela empresa Agristar do Brasil. A sanidade das sementes, inclusive em relação a infecções bacterianas, foi confirmada por isolamentos indiretos em meio Nutriente Ágar (NA), a partir de amostras contendo cerca de 1500 sementes.

A inoculação das sementes foi efetuada utilizando-se o isolado ENA 4463 de *Xanthomonas* obtido de plantas de tomate colhidas em 1997 em Campo Grande-RJ, preservada em água e mantidas na coleção do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ. Este isolado foi escolhido após testes de patogenicidade em plantas de tomate seguido de re-isolamento em cultura pura (Fahy & Hayward, 1983). O isolado foi caracterizado conforme Jones *et al.* (2004). Além disso, foi feito o seqüenciamento da subunidade 16S do RNA ribossomal, a partir do PCR de colônia utilizando-se o par de primers For (GGAACCGT-GAGACAGGTGCT) e Rev (CCGGG-TTCCCCATTCGGAT). Com a seqüência efetuou-se o alinhamento e o agrupamento por similaridade no banco internacional das seqüências de DNA. A indicação da espécie mais próxima foi feita por similaridade de seqüências utilizando o BLASTn contra a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A análise

constatou uma similaridade de 99% para *Xanthomonas vesicatoria*.

Nos três experimentos foram utilizadas suspensões de células do referido isolado com 36 a 48 h de crescimento em meio NA a 28°C, em solução salina (NaCl a 0,85%) (Fahy & Hayward, 1983). A concentração das suspensões foi ajustada para 10^8 UFC mL⁻¹ com auxílio de espectrofotômetro (Micronal - B442) com leituras de 85% de transmitância, calibradas previamente pela contagem do número de células viáveis em diluições e riscagens em placas de Petri contendo o meio NA.

Dois métodos foram testados para a obtenção de sementes infectadas: inoculação a vácuo de amostras de sementes (Bashan & Assouline, 1983), inoculação de frutos verdes previamente marcados (18 a 25 dias após antese). A inoculação a vácuo foi feita pela imersão das sementes em frasco Erlenmeyer contendo 20 mL de suspensão bacteriana seguido da aplicação de vácuo (680 mm de Hg) utilizando dessecador acoplado a uma bomba de vácuo em três ciclos de cinco minutos, com liberação lenta do vácuo, vedando-se a passagem do ar antes do desligamento da bomba e após, abertura da válvula de escape lentamente, com repouso de três minutos. A inoculação, via injeção de frutos verdes, previamente desinfestados com hipoclorito de sódio (NaClO 0,5%), foi feita com a injeção da suspensão de células, utilizando seringa hipodérmica esterilizada de 1,0 mL diretamente na região da placenta. A colheita dos frutos foi feita quando esses estavam completamente maduros, correspondendo ao período de 38 a 45 dias após a antese. A extração das sementes foi feita de frutos íntegros, com e sem sintomas aparentes de mancha bacteriana, após a sua lavagem com detergente e desinfestação com NaClO a 0,5%.

EXP 1: Efeito da inoculação a vácuo de sementes na infecção por *X. vesicatoria* em diferentes órgãos de plântulas de tomate

Três amostras de sementes de 'Santa Clara Miss Brasil', do mesmo lote comercial e originalmente sem a fitobactéria, foram utilizadas considerando os seguintes tratamentos: a) sementes inoculadas à vácuo com suspensão de células de *X. vesicatoria* em solução

salina; b) sementes inoculadas à vácuo somente com solução salina, e c) sementes originais, não tratadas. Após esse procedimento as sementes oriundas dos diferentes tratamentos foram semeadas em caixas gerbox contendo três folhas de papel germitest umedecidos com água esterilizada (2,5 x peso do papel) (Brasil, 2009). As caixas foram acondicionadas em germinadores regulados para 25°C, 90% de umidade relativa e 12 h de fotoperíodo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e 30 repetições sendo a parcela constituída por uma caixa gerbox contendo 25 sementes cada.

As avaliações iniciaram-se no momento do semeio (zero hora) e foram conduzidas nos intervalos de 12, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 h após o semeio, por meio de isolamentos diretos e indiretos em meio NA a partir das sementes e de diferentes órgãos das plântulas (tegumento, radícula, hipocótilo e folhas cotiledonares), à medida que estes eram emitidos.

Os isolamentos diretos foram realizados de duas formas: a) deposição de 15 sementes, ou 15 órgãos das plântulas, diretamente sobre o meio de cultura, sem tratamento prévio de assepsia; b) tratamento prévio das sementes ou órgãos das plântulas em álcool 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% (1 minuto) e três lavagens em água esterilizada seguido de deposição sobre o meio de cultura.

Nos isolamentos indiretos, utilizaram-se extratos obtidos de cinco sementes e, ou, cinco órgãos das plântulas. As amostras foram previamente desinfestadas, ou não, seguindo o procedimento descrito anteriormente, e em seguida transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina (NaCl a 0,85%) esterilizada. Após repouso de 20 minutos, os tubos foram agitados e alíquotas de 0,1 mL foram retiradas e distribuídas em três placas de Petri contendo meio NA (Mariano, 2000).

As placas contendo os isolamentos diretos e indiretos foram acondicionadas em câmara de crescimento, regulada para temperatura de 28±2°C, por 48 h quando foram feitas as avaliações. Nos isolamentos diretos, quantificou-se o número de sementes ou órgãos das

plântulas que apresentavam crescimento da fitobactéria e os dados expressos em porcentagem de sementes ou órgão infectados. Nos isolamentos indiretos, procedeu-se à contagem do número de unidades formadoras de colônia da fitobactéria (UFC) por placa e os dados transformados para log (UFC+1), por unidade amostral, semente ou órgão da plântula.

EXP 2: Efeito da inoculação de frutos verdes na infecção por *X. vesicatoria* em sementes e plântulas de tomate

Para quantificar a eficiência da infecção de *X. vesicatoria* em sementes extraídas de frutos infectados foram realizados dois ensaios. Em ambos utilizaram-se sementes extraídas de frutos verdes inoculados (aos 18 a 25 dias após a antese) por meio de injeção de suspensão bacteriana na região da placenta e as sementes extraídas aos 20 dias após a inoculação. A eficiência da inoculação e a presença da fitobactéria foram determinadas em isolamentos diretos a partir do líquido placentário e de amostras de sementes de todos os frutos, logo após a extração.

No primeiro ensaio, quantificou-se através de isolamentos indiretos a população de *X. vesicatoria* associada ao tegumento das sementes, desde o semeio em caixas gerbox, e às 36, 48 e 72 horas subsequentes. Para tanto, amostras de cerca de 60 sementes de seis frutos foram distribuídas em caixas tipo gerbox contendo quatro folhas de papel germitest esterilizado e umedecido com água esterilizada (2,5 x o peso do papel) (Brasil 2009). As caixas foram acondicionadas em câmara de crescimento a 25°C, 70% de umidade relativa e 12 h de fotoperíodo. Os isolamentos indiretos foram feitos conforme descrito no EXP 1. Para cada fruto foram avaliadas oito sementes em isolamentos indiretos e 20 sementes em isolamentos diretos.

No segundo ensaio, quantificou-se a população da fitobactéria no tegumento desde o semeio (zero hora) e às 24, 48, 96, 120, 144 e 168 horas subsequentes, e nos órgãos da plântula, radícula, hipocótilo e folhas cotiledonares, desde a sua emissão, às 96 horas, e às 120 e 144 horas após o semeio. Para tanto, foram utilizadas amostras de sementes de seis

frutos e os mesmos procedimentos descritos acima.

Os dados do primeiro ensaio foram transformados para log (UFC+1) e os do segundo ensaio para log (UFC+2) e submetidos à análise de variância, com aplicação do teste F e as médias dos órgãos ao longo dos tempos comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

EXP 3: Recuperação de *X. vesicatoria* em sementes inoculadas de tomate em testes de emergência em areia e em substrato para mudas

O terceiro experimento foi realizado com o objetivo de estudar o transporte de *X. vesicatoria* e a colonização epífita em sementes e mudas de tomateiro. Para isto foram realizados dois ensaios, sendo um de emergência em areia, em condições de câmara de crescimento, e outro em substrato próprio para produção de mudas de hortaliças, em condições de casa de vegetação.

No ensaio de emergência em areia, foram avaliados três tratamentos: 1) sementes extraídas de frutos inoculados por injeção na placenta, conforme descrito para o EXP2; 2) sementes extraídas de frutos não inoculados seguido de inoculação pelo método à vácuo, conforme descrito para o EXP1; 3) testemunha composta por sementes extraídas dos frutos não inoculados. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com três tratamentos e quatro repetições. Cada parcela era composta por 50 sementes semeadas em bandeja de alumínio (28 x 18 x 3,5 cm) contendo areia autoclavada e umedecida até 70% da capacidade de campo (Tebaldi *et al.*, 2007). As bandejas foram acondicionadas em câmara de crescimento regulada para temperatura diurna de 23±2°C e temperatura noturna de 20±2°C, 90% de umidade relativa e 12 h de fotoperíodo, seguindo metodologia descrita por Ji *et al.* (2006).

As plantas foram conduzidas até 30 dias após o semeio (DAS) e as avaliações qualitativas para a presença da fitobactéria foram realizadas no momento do semeio (zero hora) e às 72, 96 e 144 horas após o semeio. Para tanto, foram realizados isolamentos indiretos a partir do tegumento, raiz, hipocótilo, folhas cotiledonares em meio NA. A identificação de *X. vesicatoria* foi feita tendo como

base características morfológicas das colônias e das células, teste de Gram e movimento em água, além de testes bioquímicos e de patogenicidade em tomate (Schaad *et al.*, 2001). Posteriormente, aos 14 dias após o semeio, efetuaram-se isolamentos indiretos a partir da raiz, hipocótilo e folhas cotiledonares de cinco mudas por parcela. Para isso, fragmentos destes órgãos foram colocados em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e mantidos em repouso por 20 min. Em seguida, os tubos foram agitados e alíquotas de 0,1 mL foram distribuídas em três placas de Petri contendo o meio nutriente agar e incubadas a 28°C por 48 h quando foram feitas as observações e contagem do número de UFC de *X. vesicatoria* por placa. Os dados foram transformados para log (UFC+2) e submetidos à análise da variância, com aplicação do teste F e as médias dos órgãos comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

Aos 30 dias, foram coletadas amostras de folhas definitivas apresentando sintomas típicos de mancha bacteriana que foram submetidas a testes de exsudação, movimento em água e coloração de Gram. Para a coloração, tomaram-se as lâminas contendo o exsudado bacteriano. Em seguida efetuou-se o isolamento em cultura pura para confirmação da identidade do agente causal. Os dados foram expressos de forma qualitativa para a presença ou ausência da bactéria em cada muda coletada.

No segundo ensaio, foram utilizadas sementes comerciais, inoculadas ou não com suspensão de células da fitobactéria (10^8 UFC mL⁻¹) pelo método a vácuo, em um total de dois tratamentos com quatro repetições por tratamento. Utilizaram-se bandejas de isopor e o substrato comercial Plantmax® e um total de 50 células por parcela e três sementes por célula. As bandejas foram acondicionadas em casa de vegetação, com nebulização durante 8 h por noite.

As avaliações foram feitas por meio de isolamentos indiretos a partir de fragmentos dos diferentes órgãos de duas plântulas ou mudas de cada parcela, raiz, hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas. Os valores médios do número de UFC contabilizados a partir dos isolamentos de cada órgão, realiza-

dos aos sete, 14 e 21 dias após o semeio, foram transformados para log (UFC+2) e submetidos à análise de variância com aplicação do teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXP 1: Efeito da inoculação a vácuo de sementes na infecção por *X. vesicatoria* em diferentes órgãos de plântulas de tomate

A recuperação de *X. vesicatoria* nos isolamentos diretos e indiretos ocorreu apenas a partir das amostras de sementes inoculadas confirmando a ausência

da fitobactéria nas demais amostras, sementes comerciais não inoculadas e sementes extraídas de frutos não inoculados. A assepsia prévia das sementes eliminou a flora microbiana associada ao tegumento e aos órgãos das plântulas, porém, interferiu nos resultados e reduziu a porcentagem de recuperação de *X. vesicatoria* nos isolamentos diretos (Figura 1A e 1B). O tratamento das sementes e dos órgãos das plântulas com NaClO antes dos isolamentos reduziu drasticamente a população da fitobactéria no tegumento e somente permitiu a sua detecção a partir de 24 h do semeio no tegumento e de 48 horas na radícula (Figura 1A). Nas amostras

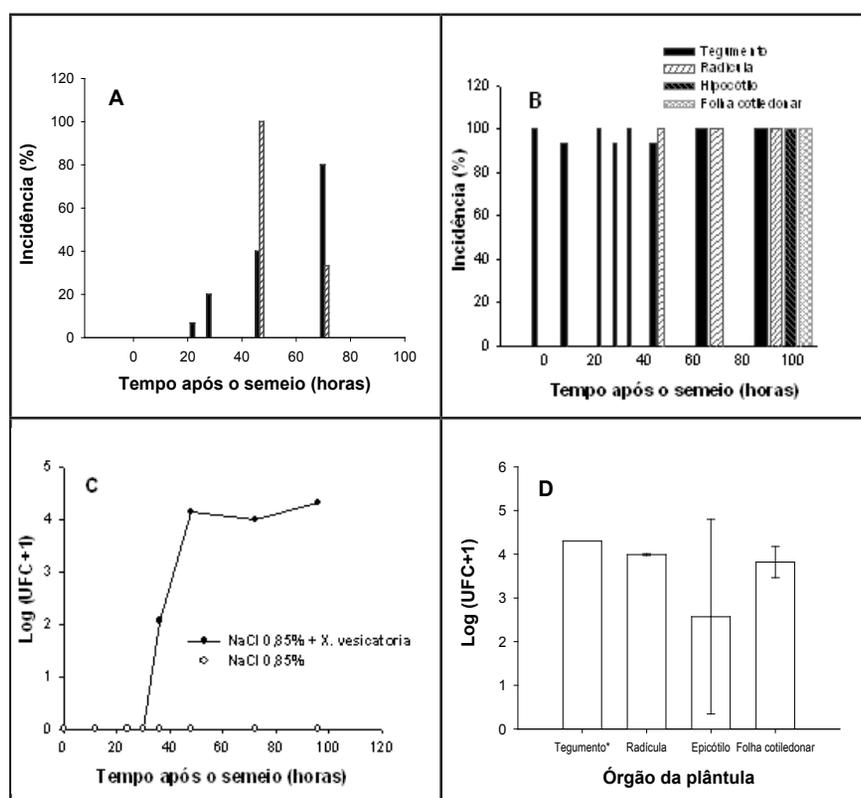


Figura 1. Incidência de *Xanthomonas vesicatoria* em tegumento, radícula, hipocótilo e folhas cotiledonares de plântulas de tomateiro, oriundas de sementes inoculadas a vácuo e germinadas em caixas Gerbox a 25°C por até 96 h, determinadas em isolamentos com assepsia (NACIO a 0,5%) (A) ou não (B), e população da fitobactéria (log UFC+1) em sementes de tomate inoculadas a vácuo (10^8 UFC em NaCl a 0,85%), e na testemunha, ao longo de 96 horas após o semeio em caixas Gerbox incubadas a 25°C (C) e nos diferentes órgãos, tegumento, radícula, hipocótilo e folhas cotiledonares, às 96 horas após o semeio (D). Determinada por isolamentos diretos e indiretos em meio nutriente agar (incidence of *Xanthomonas vesicatoria* seeds' coat, radicle, hypocotyls and cotyledon leaves of tomato seedlings, from seeds inoculated in vacuum and germinated in Gerbox at 25°C for 96 h, determined in isolations under asepsis (NACIO 0,5%) (A) or not (B), and population of the phyto-bacteria (log CFU+1) in vacuum inoculated tomato seeds (10^8 CFU at NaCl 0,85%) and in the control treatment during a period of 96 hours after sowing in Gerbox (incubation at 25°C) (C) and in different organs, seed coat, radicle, hypocotyl and cotyledon leaves at 96 hours after sowing (D). Determined by direct and indirect isolations in the nutrient agar medium). Seropédica, UFRRJ, 2008.

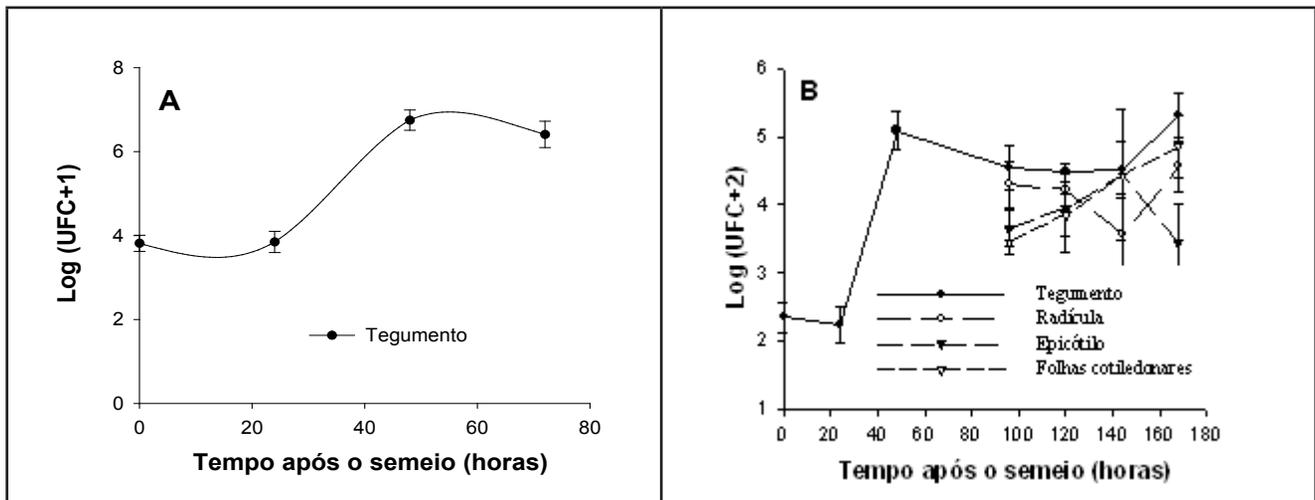


Figura 2. População de *Xanthomonas vesicatoria* (log UFC+1) em sementes de tomateiro extraídas de frutos inoculados por injeção na região da placenta e em órgãos das plântulas desenvolvidas em caixas Gerbox incubadas a 25°C: avaliada no tegumento ao longo de 72 horas após o semeio (A); avaliada no tegumento, radícula, hipocótilo e folhas cotiledonares formados ao longo de 168 horas após o semeio (B). Determinada por isolamentos indiretos em meio nutriente agar (population of *Xanthomonas vesicatoria* (log CFU+1) in tomato seeds extracted from fruits inoculated by injection on the region of placenta and in organs from seedlings grown inside Gerbox boxes incubated at 25°C: evaluated in the seed coat over 72 hours after sowing (A); evaluated in the seed coat, radicle, hypocotyl and cotyledon leaves formed during 168 hours after sowing (B). Determined by indirect isolations in agar nutrient medium). Seropédica, UFRRJ, 2008.

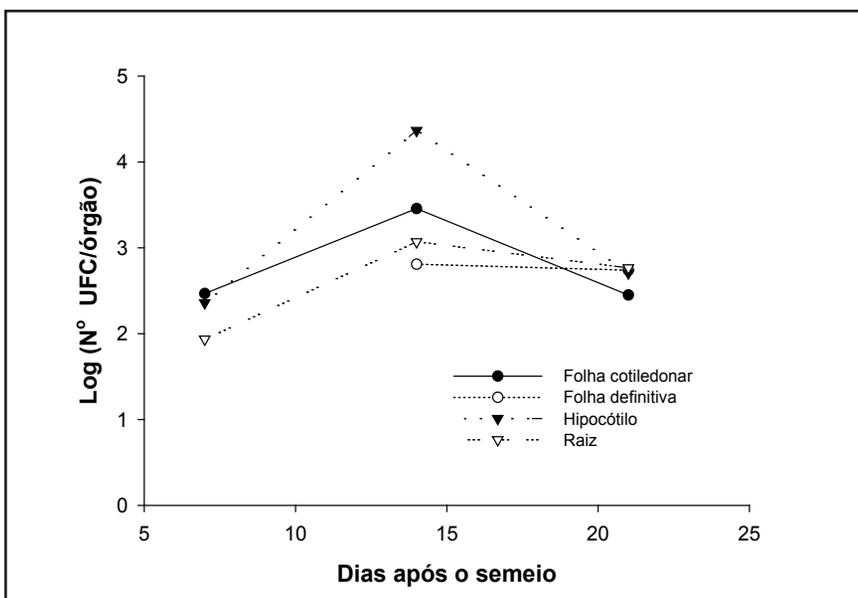


Figura 3. População de *Xanthomonas vesicatoria* [log (ufc+2)] em folhas cotiledonares, folhas definitivas, hipocótilo e raízes de mudas de tomateiro, originárias de sementes inoculadas a vácuo, determinada aos 7, 14 e 21 dias após o semeio em substrato sob condições de casa de vegetação. Determinada por isolamentos indiretos em meio nutriente agar (population of *Xanthomonas vesicatoria* [log(CFU+2)] in cotyledon leaves, definitive leaves, hypocotyls and tomato seedling roots, originated from seeds inoculated through vacuum, determined at 7, 14 and 21 days after sowing under greenhouse conditions. Determined by indirect isolations in nutrient agar medium). Seropédica, UFRRJ, 2008.

não submetidas à assepsia prévia com NaClO, pôde-se reisolat a fitobactéria de praticamente 100% das amostras de tegumento, desde o semeio até 96 horas

após, e da radícula, hipocótilo e folhas cotiledonares desde a sua emissão, às 48, 72 e 96 horas após o semeio, respectivamente (Figura 1B). A baixa recuperação

de *X. vesicatoria* nas amostras previamente tratadas com NaClO deve-se à ação deste sobre a fitobactéria e indica que, provavelmente, esta localizava-se predominantemente na superfície dos tecidos. Outros autores relatam detecção de fitobactérias em sementes por isolamentos sem o uso prévio de assepsia, mas com o uso de meios semi-seletivos. No entanto, relatam diferenças nas taxas de recuperação em função do meio (Silva et al., 2002; Tebaldi et al., 2007) devido à sensibilidade diferencial das bactérias aos antibióticos adicionados aos meios e da flora microbiana associada às sementes (Silva et al., 2002).

Nos isolamentos indiretos, recuperou-se a fitobactéria a partir do tegumento somente às 36 horas após o semeio, observando-se um aumento da população até cerca de 48 horas, quando se estabilizou e se manteve alta até as 96 horas (Figura 1C). Esses resultados indicam que a população de *X. vesicatoria*, inicialmente localizada no tegumento da semente, apresenta população baixa não detectável nos isolamentos iniciais (zero, 12, 24 e 30 horas após o semeio) e se multiplica tão logo se inicia o processo de embebição das sementes, quando ocorre a liberação de exsudados (Nelson, 2004). Este período, em geral, coincide com o de emissão

Tabela 1. Resultado de isolamentos indiretos em meio nutriente agar a partir de amostras de radícula, tegumento, hipocótilo e folhas cotiledonares originários de sementes de tomate extraídas de frutos inoculados por injeção de suspensão de células de *Xanthomonas vesicatoria* na região da placenta e de sementes extraídas de frutos não inoculados seguido de inoculação, ou não, pelo método a vácuo, e semeadas em areia e mantidas em condições de câmara de crescimento ao longo de 144 horas (result of indirect isolations in agar nutrient from samples of radicle, seed coat, hypocotyls and cotyledon leaves from tomato seeds extracted from fruits inoculated by injections of suspension of *Xanthomonas vesicatoria* cells in the placenta regions and from extracted seeds of non-inoculated fruits followed of inoculation or not, by vacuum method, seeded in sand and kept in growth chamber conditions over 144 hours). Seropédica, UFRRJ, 2008.

Tratamento	Presença de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> no momento do semeio			
	Tegumento	Radícula	Hipocótilo	Folha cotiledonar
Início (zero horas)				
Sementes extraídas de frutos inoculados	-	na	na	na
Sementes inoculadas a vácuo	-	na	na	na
Testemunha	-	na	na	na
72 horas após o semeio				
Sementes extraídas de frutos inoculados	+	+	na	na
Sementes inoculadas a vácuo	-	-	na	na
Testemunha	-	-	na	na
96 horas após o semeio				
Sementes extraídas de frutos inoculados	+	+	+	na
Sementes inoculadas a vácuo	+	+	+	na
Testemunha	-	-	-	na
144 horas após o semeio				
Sementes extraídas de frutos inoculados		+	+	+
Sementes inoculadas a vácuo		+	+	+
Testemunha		-	-	-

na= não avaliado; -= ausência de *X. vesicatoria*; += presença de *X. vesicatoria* (na= not evaluated; -= absence of *X. vesicatoria*; += presence *X. vesicatoria*).

da radícula, quando também ocorre a multiplicação da fitobactéria (Figura 1D) acompanhando o seu crescimento. Este resultado deve-se ao fato de na região da radícula, principalmente na sua zona de alongação, também ocorrer intenso processo de exsudação. Às 96 h após o semeio, a fitobactéria pôde ser facilmente isolada de todos os órgãos da plântula já formados confirmando a sua presença nos mesmos (Figura 1D). Ou seja, a fitobactéria multiplica e se estabelece na superfície do tegumento de onde pode ser dispersa para os diferentes órgãos da plântula à medida que estes são emitidos, colonizando-os apenas superficialmente, conforme comentado anteriormente.

O reisolamento de *X. vesicatoria* de todas as amostras avaliadas, especialmente das folhas cotiledonares, confirma a presença da fitobactéria na parte aérea e a sua fácil dispersão para as plântulas. A ocorrência de infecções e o desenvolvimento de sintomas dependerão, no entanto, das condições de

ambiente, da virulência do isolado e da suscetibilidade da cultivar (Goto, 1992). No presente caso, as avaliações foram realizadas durante período muito curto e, provavelmente, não houve tempo para o desenvolvimento de sintomas.

Uma das formas de passagem da fitobactéria da região do tegumento para as folhas cotiledonares pode estar associada ao fato de o tegumento ficar temporariamente aderido às mesmas, por 24 a 48 h, após a sua emissão e à freqüente condensação de umidade na região. No entanto, acredita-se que este processo de disseminação seja tão mais eficiente à medida que predominarem maiores períodos de acúmulo de água livre nesta região, facilitando a sobrevivência das células e o processo de penetração e posterior infecção das folhas.

EXP 2: Efeito da inoculação de frutos verdes na infecção por *X. vesicatoria* em sementes e plântulas de tomate

A presença da fitobactéria foi confirmada nos isolamentos a partir do líquido

placentário de todos os frutos inoculados utilizados nas duas séries de avaliações. A fitobactéria foi também detectada em 100% das sementes avaliadas por isolamentos diretos tanto no momento do semeio quanto nas avaliações seguintes, no primeiro e no segundo ensaio.

A população da fitobactéria associada às sementes foi maior no EXP 2, com inoculação via injeção de suspensão bacteriana nos frutos, que no EXP 1, cujas sementes foram inoculadas artificialmente pelo método à vácuo. Houve fácil recuperação da fitobactéria a partir do tegumento em todos os isolamentos, desde o realizado no momento do semeio (zero hora) até o realizado às 72 horas após, diferente do observado no EXP 1, onde somente houve recuperação da fitobactéria nos isolamentos indiretos a partir de 36 h do semeio (Figura 1C, 2A e 2B). Este resultado deve-se, provavelmente, às características das sementes e do tempo de contato da bactéria com as mesmas. No EXP 1 foram utilizadas sementes comerciais cujos tricomas são reduzidos

no processo de beneficiamento e o método de inoculação a vácuo, que apesar de ser feito com suspensão concentrada de células bacterianas (10^8 UFC/ml), é rápido e não favorece a multiplicação e colonização das sementes durante o procedimento. No EXP 2, foram utilizadas sementes frescas, com seus tricomas íntegros, e extraídas de frutos inoculados cerca de 20 dias antes da colheita, o que pode ter favorecido a multiplicação bacteriana na superfície das sementes, semelhante aos relatos de Corrêa *et al.* (2008), e a formação de biofilmes (Gonzaga da Silva, 2008) que favorecem a sobrevivência da bactéria (Morris & Monier, 2003). A profusão de tricomas presentes na superfície das sementes não beneficiadas (Silva *et al.*, 2002; Gonzaga da Silva, 2008) aumenta a superfície de adesão das células bacterianas e, conseqüentemente, a população inicial. A população de *X. vesicatoria* no tegumento atingiu o seu valor máximo às 48 h após o início da embebição ($p < 0,01$) seguido de estabilização ou leve decréscimo (Figura 2A), confirmando os resultados observados no EXP 1 e de acordo com os relatos de Nelson (2004).

No EXP 2, observou-se variação significativa ($p < 0,01$) na população de *X. vesicatoria* residente no tegumento ao longo das sete avaliações realizadas com níveis mais baixos a zero e 24 h, e máximo às 48 h após o semeio, similar ao observado em todos os ensaios anteriores. A partir de 48 h, ocorreu leve decréscimo na população, porém, sempre com médias superiores ao observado nas duas primeiras avaliações, zero e 24 h. A partir de 96 h do semeio, foi detectada a presença de *X. vesicatoria* tanto na radícula, quanto no hipocótilo e folhas cotiledonares. De forma geral, porém, não foram observadas variações significativas na população da fitobactéria, expressa pelo log (UFC+2) em cada órgão, às 96, 120, 144 e 168 h após o semeio (Figura 2B).

Estes resultados revelam um padrão para a colonização das sementes em fase de embebição e das plântulas por *X. vesicatoria* que se caracteriza pelo aumento acentuado da população da fitobactéria no tegumento nas primeiras 48 h, quando atinge o máximo, seguido

de decréscimo. Porém, a partir deste momento, com a emissão da radícula, e em seguida do hipocótilo e folhas cotiledonares, ocorre o transporte da fitobactéria até estes e a colonização superficial dos mesmos (Figura 2B). O desenvolvimento dos órgãos da plântula caracteriza-se pela intensa multiplicação celular e alongamento dos tecidos. Durante este processo, sucede-se o rompimento dos tecidos e o extravasamento de substâncias (Nelson, 2004) que são utilizadas pela população residente associada superficialmente aos tecidos formados. Provavelmente, ao final do desenvolvimento de cada órgão, a liberação dessas substâncias cessa, limitando-se a alguns pontos chamados nichos de liberação de exsudados onde a população da fitobactéria tenderia a se concentrar. Esses resultados indicam, ainda, que o transporte de *X. vesicatoria* da semente para a plântula ocorre de forma eficiente e que infecções e o desenvolvimento de sintomas poderão ocorrer, dependendo das condições de ambiente predominantes nas fases seguintes. A não observação de sintomas nas folhas cotiledonares, provavelmente, deve-se ao curto período avaliado, 72 horas contadas desde a sua emissão, inferior ao período de incubação médio relatado para fitobacterioses que causam manchas foliares (Goto, 1992) e para a mancha bacteriana do tomate causada por *X. vesicatoria* (Araújo, 2010), cerca de cinco a oito dias.

EXP 3: Recuperação de *X. vesicatoria* em sementes inoculadas de tomate em testes de emergência em areia e em substrato para mudas

Observou-se, no teste de emergência em areia, o crescimento de outras bactérias nos isolamentos indiretos efetuados em amostras de sementes no momento do semeio e nas avaliações subseqüentes. Esta flora dificultou a quantificação da população de *X. vesicatoria*. Conseguiu-se, porém, isolar e confirmar a presença da fitobactéria no tegumento e na radícula nos intervalos de 72 e 96 h após o semeio nos tratamentos de inoculação por injeção nos frutos e a vácuo, respectivamente. Após 96 e 144 horas pôde-se reisolar a fitobactéria do hipocótilo e das folhas cotiledonares, respectivamente, de plântulas dos dois

tratamentos de inoculação (Tabela 1). Neste mesmo teste, aos 14 dias após o semeio, apesar da não observação de sintomas, pôde-se recuperar a fitobactéria tanto da raiz, como do hipocótilo e folhas cotiledonares. A população de *X. vesicatoria* (em valores transformados log (x+2)) nas folhas (0,969711) não diferiu significativamente do hipocótilo (0,551436) e ambas, diferiram significativamente da raiz (0,313608). Aos 30 dias, algumas mudas apresentavam sintomas de mancha bacteriana nas folhas definitivas, confirmado em observações ao microscópio, isolamentos e testes bioquímicos e de patogenicidade (Fahy & Hayward, 1983).

Estes resultados confirmam aqueles observados nos testes *in vitro*, que evidenciam que *X. vesicatoria* é capaz de se estabelecer como residente nos órgãos da parte aérea assim que estes são emitidos e, sobreviver sem causar sintomas aparentes até que ocorram condições favoráveis. Confirmam, ainda, que as raízes também podem atuar como sítios de sobrevivência de *X. vesicatoria*, pelo menos até 14 dias após o semeio, devido à capacidade da bactéria se fixar na epiderme e colonizar o rizoplaneo como residente sem, aparentemente, causar danos às raízes.

No segundo ensaio, conduzido em casa de vegetação, em condições similares às de produção de mudas, pode-se confirmar os resultados observados nos testes de emergência em areia. A fitobactéria não afetou a emergência das plântulas, o que está de acordo com os relatos de Silva *et al.* (2002) e Corrêa *et al.* (2008) de que a bactéria não reduz a qualidade fisiológica das sementes, e mostrou-se hábil em colonizar os diferentes órgãos formados ao longo do processo de desenvolvimento das plântulas e mudas. Aos sete dias, a fitobactéria pôde ser facilmente reisolada tanto da radícula, como do hipocótilo e folhas cotiledonares e, aos 14 dias, também das folhas definitivas. Em ambas as datas não se observaram a presença de sintomas o que permite concluir que *X. vesicatoria* estava associada aos diferentes órgãos apenas como residente ou epífita. Nesta mesma data constatou-se maior população de *X. vesicatoria* na região do hipocótilo, seguido das folhas

cotiledonares, raízes e folhas definitivas (Figura 3). O aumento da população na região do hipocótilo, provavelmente, deve-se à liberação de exsudatos pelos tricomas, abundantes nesta região (Gonzaga da Silva, 2008). No entanto, de 14 para 21 dias, observou-se como tendência a queda da população bacteriana tanto na região do hipocótilo como nas raízes e folhas cotiledonares, já senescentes (Figura 3) e leve crescimento, porém não significativo, nas folhas definitivas. Nesta data, porém, apesar da presença da fitobactéria, não foram observados sintomas nas folhas, devido, provavelmente, a restrições do ambiente e a baixa população inicial da bactéria nas sementes. Apesar da presença de umidade, fornecida por nebulização no período noturno, predominaram no interior da casa de vegetação condições de alta temperatura, 35 a 40°C, e dias secos. Araújo (2010) relata aumento do período de incubação da mancha bacteriana do tomate em temperaturas de 30°C comparado a 25°C. Goto (1992) relata o aparecimento de sintomas de manchas foliares com população bacteriana de cerca de 10⁶ células por sítio de inoculação e que a multiplicação bacteriana depende de sítios de congestão de água. Umesh *et al.* (1998) relatam um nível limiar alto de contaminação de sementes para o estabelecimento de *X. campestris* pv. *carotae* em folhas de plantas de cenoura, cerca de 10⁴ a 10⁵ UFC/g de sementes.

Tendo como base os resultados observados nos três experimentos pode-se concluir que *X. vesicatoria* se multiplica rapidamente no tegumento durante a fase de embebição e coloniza todos os órgãos da plântula à medida em que estes são emitidos, radícula, hipocótilo e folhas cotiledonares. Este processo também pode ser observado em condições de viveiro com a colonização das folhas definitivas tão logo estas são formadas, podendo sobreviver como residente nestes órgãos até pelo menos 21 dias após o semeio, sem causar sintomas. A rápida multiplicação de *X. vesicatoria* no tegumento nas primeiras 48 h após o início do processo de embebição parece ser uma estratégia importante para o seu transporte para os demais órgãos da plântula, especialmente para as folhas

cotiledonares, uma vez que esses permanecem, temporariamente, aderidos a estas folhas. A colonização residente das plântulas e mudas pela fitobactéria foi, em geral, próxima a 100%, sem que, na maioria das vezes, sintomas tenham sido observados indicando que métodos de detecção da fitobactéria por testes de crescimento, como *Blotter Test* ou de emergência em areia, devam ser complementados com isolamentos para detecção de população residente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado à primeira autora, ao CNPq pelo financiamento do projeto, à UFRRJ e UENF pelo apoio e à empresa Agristar do Brasil Ltda. pela doação de sementes.

REFERENCIAS

- ARAÚJO ER. 2010. Competitividade entre espécies de *Xanthomonas* causadoras de mancha bacteriana do tomateiro. Brasília: UnB. 82 p. (Dissertação mestrado).
- BACILIO-JIMENEZ M; AGUILAR-FLORES S; DEL VALLE MV; PEREZ A; ZEPEDA A; ZENTENO E. 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 167-172.
- BASHAN Y; ASSOULINE I. 1983. Complementary bacterial enrichment techniques for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in infested tomato and pepper seeds. *Phytoparasitica* 11: 187-193.
- BRASIL. 2009. Regras para análise de sementes. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 399 p.
- BUYER JS; ROBERTS DP; RUSSEK-COHEN E. 1999. Microbial community structure and function in the spermosphere as affected by soil and seed type. *Canadian Journal of Microbiology* 45: 138-144.
- CARMO MGF; CORREA FM; CORDEIRO ES; CARVALHO AO; ROSSETTO CAV. 2004. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. *Horticultura Brasileira* 22: 579-584.
- CARMO MGF; MAFFIA LA; KIMURA O; CARVALHO AO. 1996. Disseminação da pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, em condições de viveiro. *Fitopatologia Brasileira* 20: 85-93.
- CORRÊA FM; CARVALHO AO; CARMO MGF. 2008. Inoculação e sobrevivência de

Xanthomonas vesicatoria em sementes de tomateiro. *Summa Phytopathologica* 34: 71-75.

- COSTA JR; ARAÚJO ER; BECKER WF; FERREIRA MASV; QUEZADO-DUVAL AM. 2012. Ocorrência e caracterização do complexo de espécies causadoras da mancha bacteriana do tomateiro no Alto Vale do Rio do Peixe. *Tropical Plant Pathology* 37: 149-154.
- FAHY PC; HAYWARD AC. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic test. In: FAHY PC; PERSLEY GJ (eds). *Plant bacterial diseases: a diagnostic guide*. Sidney: Academic Press. p 337-338.
- GONZAGA SILVA DA. 2008. *Mecanismos de transmissão de Xanthomonas vesicatoria em Lycopersicon esculentum*. Seropédica: UFRRJ. 121p. (Tese doutorado).
- GOTO M. 1992. Fundamentals of bacterial plant pathology. San Diego, Academic Press. 341p.
- HADAR Y; HARMAN GE; TAYLOR AG; NORTON JM. 1983. Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. *Phytopathology* 73: 1322-1325.
- JIP; CAMPBELL HL; KLOPPER JW; JONES JB; SUSLOW TV; WILSON M. 2006. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological agents and plant growth promoting rhizobacteria. *Biological Control* 36: 358-367.
- JONES JB; LACY GH; BOUZAR H; STALL RE; SCHAAD NW. (2004). Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27:755-762.
- MARIANO RLR. 2000. *Manual de práticas em fitobacteriologia*. Recife: UFRPE. 171p.
- MORRIS CE; MONIER JM. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review Phytopathology* 41: 429-453.
- NELSON EB. 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review Phytopathology* 42: 271-309.
- NORMANDER B; PROSSER JI. 2000. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. *Applied Environmental Microbiology* 66: 4372-4377.
- PEREIRA RC; ARAÚJO ER; FERREIRA MASV; QUEZADO-DUVAL AM. 2011. Occurrence of *Xanthomonas* species causing bacterial spot in fresh market tomato fields in Brazil. *Acta Horticulturae*: 914:61-64.
- QUEZADO-DUVAL AM; LOPES CA; LEITE JUNIOR RP; LIMA MF; CAMERGO LEA. 2005. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. *Acta Horticulturae* 695: 101-108.
- ROMEIRO RS. 2005. *Bactérias fitopatogênicas*. Viçosa: UFV. 417p.
- SCHAAD NW; FORSTER RA. 1982. Semi-selective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seed. *Seed Science and Technology* 8: 383-391.

- SCHAAD NW. 1989. Detection and identification of bacteria. In: SAETTLER AW; SCHAAD NW; ROTH DA (eds). *Detection of bacteria in seed and other planting material*. Minneapolis: APS Press. 122p. 1989.
- SCHAAD NW; JONES JB; CHUM W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St Paul: APS Press. 373p.
- SILVA AMS; CARMO MGF; OLIVARES FO; PEREIRA AJ. 2002. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre as sementes. *Fitopatologia Brasileira* 27: 587-593.
- SIMON HM; SMITH KP; DODSWORTH JA; GUENTHNER B; HANDELSMAN J; GOODMAN RM. 2001. Influence of tomato genotype on growth of inoculated and indigenous bacteria in the spermosphere. *Applied Environmental Microbiology* 67: 514-520.
- TEBALDI ND; PANIZZI RDEC; SADER R. 2007. Detecção, transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolis. *Summa Phytopathologica* 33: 290-293.
- UMESH KC; DAVIS RM; GILBERTSON RL. 1998. Seed contamination thresholds for development of carrot bacterial blight caused by *Xanthomonas campestris* pv. *Carotae*. *Plant Disease* 82: 1271-1275.
- VAUTERIN L; HOSTE B; KERSTERS K; SWING J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 472-489.
-