

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* por  
Sementes de Tomateiro e Protocolos Aplicados ao  
seu Estudo**

**Suelem Silva de Lima**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**TRANSMISSÃO DE *Xanthomonas vesicatoria* POR SEMENTES DE  
TOMATEIRO E PROTOCOLOS APLICADOS AO SEU ESTUDO**

**SUELEM SILVA DE LIMA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Dr<sup>a</sup> Margarida Goréte Ferreira do Carmo**

*e Co-orientação*  
**Dr<sup>a</sup> Débora Alves Gonzaga da Silva**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitotecnia**, no curso de Pós-graduação em Fitotecnia da UFRRJ, área de concentração Produção Vegetal.

Seropédica, RJ  
Maio de 2012

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L732t Lima, Suelem Silva de, 1982-  
Transmissão de Xanthomonas vesicatoria por  
Sementes de Tomateiro e Protocolos Aplicados ao seu  
Estudo / Suelem Silva de Lima. - 2012.  
34 f.: il.

Orientadora: Margarida Goréte Ferreira do Carmo.  
Coorientadora: Débora Alves Gonzaga da Silva.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Fitotecnia, 2012.

1. Densidade de inóculo. 2. transmissão. 3.  
bactéria fitopatogênica.. I. Carmo, Margarida Goréte  
Ferreira do, 1963-, orient. II. Silva, Débora Alves  
Gonzaga da , 1976-, coorient. III Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro. Fitotecnia. IV.  
Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – A autora”.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TRANSMISSÃO DE *Xanthomonas vesicatoria* POR SEMENTES DE TOMATEIRO E  
PROTOCOLOS APLICADOS AO SEU ESTUDO

SUELEM SILVA DE LIMA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitotecnia**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ, área de concentração Produção Vegetal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 28/05/2012.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof<sup>a</sup> Margarida Goréte Ferreira do Carmo, D.Sc., Eng<sup>a</sup> Agrônoma  
UFRRJ/IA/Departamento de Fitotecnia  
(Orientadora/Presidente)

---

Prof<sup>o</sup> Everaldo Zonta, D. Sc., Eng. Agrônomo  
UFRRJ/IA/Departamento de Solos

---

Prof<sup>a</sup> Rosana Rodrigues, D. Sc., Eng.<sup>a</sup> Agrônoma  
UENF/Dep. De Genética e Melhoramento Vegetal

*Dedico esta dissertação  
A Deus,  
Ao meu filho amado  
Rafael Henrique de Lima Mont'Alto,  
Aos meus queridos pais  
Severino Estevâm de Lima e Izabel Cristina Lins da Silva (in memorian)  
E ao meu querido companheiro,  
Bruno Raphael Mont'Alto Santos.*

## AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus em primeiro lugar, pelo Dom da vida, pelo Seu amor incondicional e pela Sua graça sobre a minha vida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela formação e à Coordenação de Aperfeiçoamento em Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais que sempre fizeram tudo que estava ao seu alcance pela minha criação, apesar de não estarem presentes fisicamente nos últimos anos, sei que estão em pensamento junto a mim.

À Dra Margarida Goréte Ferreira do Carmo pelo exemplo, compreensão, apoio e principalmente paciência nesses oito anos de orientação.

À minha co-orientadora Dra Débora Alves Gonzaga da Silva pela dedicação, disponibilidade, comprometimento e bom humor diante das mais diversas situações.

A todos os professores do CPGF pelos preciosos ensinamentos, especialmente ao professor Maurício Ballesteiro pelo incentivo e ao professor Valdir Diola pelo auxílio nas análises.

Ao meu companheiro Bruno Raphael Mont'Santos pela ajuda indispensável, por entender minha ausência me dando toda força possível não só durante a execução deste sonho, mas também nestes anos de relacionamento.

Ao meu filho amado Rafael Henrique de Lima Mont'Alto, por ser a maior fonte de inspiração e felicidade em minha vida.

A minha querida amiga Mariana Gomes Lima por estar sempre disponível para me ajudar, pelas vezes em que cuidou do meu bebê e também pelo acompanhamento durante os ensaios.

À minha irmã e amiga Mariella Camargo Rocha, pois desde os tempos da graduação estive ao meu lado dando incentivo à vida acadêmica e apoio nas decisões pessoais. Por sempre me receber em sua residência de braços abertos.

À minha madrastra Maria da Glória por toda ajuda.

Às minhas companheiras de laboratório Lígia Saiko Kowata-Dresh e Dauciléia Paula Domingues, conseguimos conviver com nossas ansiedades e preocupações e manter o bom humor, fazendo do nosso ambiente de trabalho uma extensão da nossa casa (literalmente rs).

Aos meus amigos Evandro da Silva Pereira Costa e Eliete Nazareno pelas caronas.

A todos os colaboradores do Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes: Carlos, Carolina, Fernanda, Willian, Maurílio, Bruno e Felipe. E principalmente aos “meus companheiros e colaboradores” que muito se dedicaram durante todo o seu tempo de estágio, fazendo nosso trabalho um pouco mais leve. Anne Caroline, Ana Carolina, Jéssica, Edson, Gabriel e Júnior, obrigada pela ajuda nos feriados, fins de semana, recesso e também pelos momentos memoráveis de diversão.

A todos os amigos do Grupo Senzala de Capoeira da UFRRJ.

Às amigas do alojamento feminino F3 307 pela acolhida.

À Eliane Monsores e Tatiana pela disponibilidade e profissionalismo nos assuntos burocráticos.

Aos funcionários do Setor de Horticultura do Instituto de Agronomia pelo apoio no trabalho em estufa.

A todos que tiveram alguma contribuição na execução deste trabalho.

## RESUMO

LIMA, Suellem Silva de. **Transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* por sementes de tomateiro e protocolos aplicados ao seu estudo.** 2012. 34f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Este estudo objetivou avaliar o efeito de *Xanthomonas vesicatoria* sobre a taxa de aborto floral, as características de frutos de tomate e determinar a taxa de transporte e transmissão da bactéria das sementes para as plântulas de tomate. Inicialmente, foi realizada a seleção de um meio de cultura para germinação de sementes inoculadas com *X. vesicatoria*, utilizando-se os meios: Ágar-Água (AA) e Nutriente Ágar (NA), adicionados ou não de Solução Nutritiva de Hoagland, considerando a fração de macro ou de macro e micro nutrientes. Em casa de vegetação, foi desenvolvido um ensaio para verificar o efeito de *X. vesicatoria* no desenvolvimento e características de frutos de tomate, cultivar Santa Clara Miss Brasil, inoculados via atomização dos cachos florais com diferentes concentrações de inóculo ( $0$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  e  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e controle). Avaliou-se a porcentagem de flores abortadas e fixadas, em relação ao número inicial, a uniformidade da coloração, diâmetro, massa fresca dos frutos fixados, o número de sementes viáveis e a ocorrência de defeitos, anomalias e sintomas da doença. E finalmente, avaliou-se a eficiência de transmissão da fitobactéria, *in vitro*, utilizando-se sementes de frutos inoculados via flor com suspensão bacteriana a  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Estas amostras de sementes foram submetidas ou não a assepsia superficial. Uma segunda amostra composta por sementes de frutos não inoculados foi submetida à assepsia superficial e inoculação à vácuo com *X. vesicatoria* ou não inoculadas mas submetidas a assepsia. Isolamentos indiretos foram feitos do: 1) tegumento, 2) radícula, 3) hipocótilo 4) folhas cotiledonares com o tegumento aderido e 5) folhas cotiledonares livres do tegumento, extraídos de plântulas desenvolvidas a partir de sementes semeadas no meio Ágar-Água com macro e micronutrientes. Em casa de vegetação, ocorreu elevada taxa de aborto floral em função das altas temperaturas, não houve queda de frutos e nem expressão de sintomas de mancha-bacteriana. O número e porcentagem de flores abortadas variaram com os tratamentos. Maiores taxas de aborto ocorreram nas plantas inoculadas com  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e testemunha com solução salina. Não houve alteração do diâmetro equatorial e do número e porcentagens de sementes totais e vestigiais. Maior massa fresca e diâmetro longitudinal foram obtidos nos frutos inoculados com  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e solução salina. No estudo de transmissão *in vitro*, não se observou efeito significativo dos tratamentos sobre a população de *X. vesicatoria* incidente na radícula. A taxa de recuperação da bactéria na amostra inicial foi maior no tratamento inoculado à vácuo, 40%, e igual estatisticamente ao tratamento inoculado via flor já aos dois dias após a semeadura. Nos cotilédones, aos 14 DAS, a população bacteriana foi maior na folha que manteve o tegumento aderido, no tratamento composto pelas sementes inoculadas à vácuo.

**Palavras-chave:** Densidade de inóculo, transmissão, bactéria fitopatogênica.

## ABSTRACT

LIMA, Suelem Silva de. **Transmission of *Xanthomonas vesicatoria* by tomato seeds and protocols applied to its study.** 2012. 34f. Dissertation (Master's Degree in Plant Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

This study aimed to evaluate the effect of *Xanthomonas vesicatoria* on the floral abortion rate, the characteristics of tomato fruits and determine the rate of transport and transmission of the bacterium from the seeds to the tomato seedlings. Initially, the selection of a culture medium for seed germination inoculated with *X. vesicatoria* was carried out using the following media: Agar-Water (AA) and Agar Nutrient (NA), added or not by Hoagland Nutrition Solution, considering the fraction of macro or macro and micro nutrients. In a greenhouse, an experiment was carried out to verify the effect of *X. vesicatoria* on the development and characteristics of tomato fruits, Santa Clara Miss Brasil, inoculated by atomization of floral clusters with different concentrations of inoculum ( $0$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  and  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> and control). The percentage of aborted and fixed flowers in relation to the initial number, color uniformity, diameter, fresh mass of the fixed fruits, the number of viable seeds and the occurrence of defects, anomalies and symptoms of the disease were evaluated. Finally, the efficiency of phytobacterial transmission was evaluated *in vitro* using inoculated fruit seeds via flower with bacterial suspension at  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>. These seed samples were subjected to superficial asepsis or not. A second sample composed of uninoculated fruit seeds was submitted to superficial asepsis and vacuum inoculation with *X. vesicatoria* or not inoculated but submitted to asepsis. Indirect isolates were made of: 1) tegument, 2) radicle, 3) hypocotyl 4) cotyledonary leaves with adherent tegument and 5) cotyledonary free leaves of the integument, extracted from seedlings grown from seeds sown in the middle Ágar-Água with macro and micronutrients. In greenhouse, there was a high rate of floral abortion due to the high temperatures, there were no fruit drop and no expression of bacterial spot symptoms. The number and percentage of aborted flowers varied with treatments. Higher abortion rates occurred in plants inoculated with  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>,  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> and control with saline. There was no change in equatorial diameter and number and percentages of total and vestigial seeds. Larger fresh mass and longitudinal diameter were obtained in the fruits inoculated with  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> and saline solution. In the *in vitro* transmission study, no significant effect of the treatments was observed on the population of *X. vesicatoria* incident on radicle. The recovery rate of the bacterium in the initial sample was higher in the inoculated treatment by vacuum, 40%, and statistically equal to the treatment inoculated by flower already two days after sowing. In the cotyledons, at 14 DAS, the bacterial population was higher in the leaf that kept the tegument adhered, in the treatment composed by the seeds inoculated under vacuum.

**Keywords:** Inoculum density, transmission, phytopathogenic bacteria.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Isolados de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> virulentos ao tomateiro, submetidos à seleção por testes de patogenicidade. Seropédica, UFRRJ, 2010.....	06
Tabela 2.	Composição da solução nutritiva de Hoagland ajustada para 25% de concentração iônica, utilizada para o desenvolvimento de meio de cultura adequado a germinação de sementes de tomate inoculadas com <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , por meio de testes de germinação <i>in vitro</i> . Seropédica, UFRRJ, 2010.....	08
Tabela 3.	Caracterização morfológica e bioquímica de diferentes isolados de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> . Seropédica, UFRRJ, 2010.....	13
Tabela 4.	Análise de variância para efeito de meio de cultura, solução nutritiva e inoculação das sementes sobre a população de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> em diferentes órgãos de plântulas de tomate, aos cinco e aos 14 dias após o semeio, e no comprimento da radícula, hipocótilo e cotilédones das plântulas. Seropédica, UFRRJ, 2010.....	15
Tabela 5.	Efeito de diferentes combinações de meio de cultura, solução nutritiva e inoculação das sementes sobre a população de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> em diferentes órgãos de plântulas de tomate, aos cinco e aos 14 dias após o semeio, e no comprimento da radícula, hipocótilo e cotilédones das plântulas. Seropédica, UFRRJ, 2011.....	15
Tabela 6.	Análise de variância para efeito de inoculação sobre número de flores abortadas e vingadas, e porcentagem de flores abortadas e vingadas. Seropédica, UFRRJ, 2011.....	17
Tabela 7.	Efeito de diferentes concentrações de inóculo de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> sobre o número de flores abortadas e vingadas, e porcentagem de flores abortadas e vingadas. Seropédica, UFRRJ, 2011.....	17
Tabela 8.	Análise de variância para efeito de diferentes concentrações de inóculo de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> sobre as características de frutos de tomate cultivar Santa Clara Miss Brasil, produzidos em casa de vegetação. Seropédica, UFRRJ, 2011.....	19
Tabela 9.	Efeito de diferentes concentrações de inóculo de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> sobre as características de frutos de tomate cultivar Santa Clara Miss Brasil, produzidos em casa de vegetação. Seropédica, UFRRJ, 2011.....	19
Tabela 10.	Análise de variância para efeito de tratamento sobre a população de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> (UFC/órgão) em sementes de tomate e diferentes órgãos das plântulas aos zero, dois e 14 dias do semeio. Seropédica, UFRRJ, 2011.....	21
Tabela 11.	Efeito de tratamento sobre a população de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> (UFC/órgão) em sementes de tomate e diferentes órgãos das plântulas aos zero, dois e 14 dias do semeio. Seropédica, UFRRJ, 2011.....	22
Tabela 12.	Efeito de tratamento sobre a incidência de sementes e de diferentes órgãos das plântulas de tomate aos zero, dois e 14 dias do semeio sobre a porcentagem de infecção por <i>Xanthomonas vesicatoria</i> . Seropédica, UFRRJ, 2011.....	23

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentração bacteriana, isolado ENA 4463 de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> , em função da transmitância da suspensão.....	07
--	----

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1	Origem e importância econômica do tomateiro.....	02
2.2	Espécies de <i>Xanthomonas</i> associadas à mancha-bacteriana.....	02
2.3	Transmissão de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> por sementes.....	03
2.4	Influência de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> nas características da planta.....	04
2.5	Perdas devido à queda de flores e frutos infectados por fitobactérias.....	05
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	06
3.1	Seleção do isolado de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> e testes de patogenicidade.....	06
3.2	Caracterização dos isolados e quantificação da concentração de inóculo.....	07
3.3	Seleção do meio de cultura para condução do teste de germinação.....	07
3.4	Efeitos de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> sobre a taxa de aborto floral, pegamento e fixação e características dos frutos de tomate.....	09
3.4.1	Instalação do ensaio em casa de vegetação.....	09
3.4.2	Inoculação dos cachos florais e quantificação do aborto floral.....	09
3.4.3	Colheita e descrição das características morfológicas dos frutos.....	10
3.4.4	Extração manual das sementes.....	10
3.5	Transmissão de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> a partir de sementes para plântulas de tomate.....	10
3.6	Análises estatísticas dos dados.....	11
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
4.1	Seleção do isolado de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> e testes de patogenicidade.....	13
4.2	Caracterização dos isolados e quantificação da suspensão de inóculo.....	13
4.3	Seleção do meio de cultura para condução do teste de germinação.....	13
4.4	Efeitos de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> sobre a taxa de aborto floral, pegamento e fixação e características dos frutos de tomate.....	16
4.5	Transmissão de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> a partir de sementes para plântulas de tomate.....	20
5	CONCLUSÕES.....	24
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
	ANEXOS.....	32

## 1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais consumidas em todo o mundo graças a, entre outros fatores, sua elevada versatilidade culinária (FILGUEIRA, 2007). Em 2009, o Brasil ocupou a nona posição no ranking mundial de produtores de tomate com uma produção de 4.310.480 toneladas. Inúmeros fatores, porém, podem levar a perdas na produtividade da cultura. Entre estes fatores estão doenças de etiologia bacteriana como a mancha-bacteriana causada por espécies do gênero *Xanthomonas* (JONES et al., 2004). Desde a sua descrição em 1921, o agente a mancha-bacteriana passou por diversas reclassificações, que culminaram na mais recentemente sugerida, baseada em testes moleculares, em que quatro espécies distintas foram propostas, sendo elas *Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (JONES et al., 2004). Neste estudo, será considerada a taxonomia proposta anteriormente, no ano de 1998, utilizando-se o termo *Xanthomonas vesicatoria* para referência ao agente (JONES et al., 1998).

A mancha-bacteriana é uma enfermidade de ocorrência mundial, relatada em todas as regiões onde o tomateiro é cultivado (ROMEIRO, 2005). Sob condições tropicais, com predominância de temperaturas moderadas e alta umidade, a doença pode ocorrer de forma severa com elevadas perdas. Nestas condições, o seu controle é difícil devido à inexistência de cultivares resistentes e à baixa eficiência do controle químico (QUEZADO-DUVAL, 2006).

Sementes infectadas constituem a principal fonte de inóculo primário e promovem a disseminação da bactéria a longas distâncias. Dentre as estratégias de controle da mancha-bacteriana, as medidas profiláticas como a utilização de sementes sadias ou contendo níveis de contaminação dentro dos padrões aceitáveis, estão entre as mais importantes (ROBBS, 1985; CARMO et al., 2004).

Sementes comerciais são rotineiramente submetidas a tratamentos visando à redução da contaminação superficial de fungos de armazenamento. Além de fungicidas, tratamentos físicos e biológicos como a termoterapia e a microbiolização, respectivamente, tem sido eficientes na redução da transmissão externa da bactéria (KAVITHA & UMESHA, 2007; CARMO et al., 2004). A eficiência dos tratamentos está diretamente relacionada ao princípio dos mesmos e às características das sementes. O tratamento térmico via calor seco (70 °C por 96 horas), por exemplo, pode provocar alterações na estrutura superficial das sementes, como remoção, quebra e fusão de tricomas criando sítios para adesão de células bacterianas remanescentes ou sobreviventes ao tratamento (SILVA et al., 2002).

Segundo Baker (1972), patógenos abrigados no interior das sementes podem sobreviver por maiores períodos que aqueles localizados apenas externamente. A exemplo do que ocorre com diversos patógenos de plantas, fitobactérias podem se alojar na parte interna das sementes, e dessa forma serem facilmente transmitidas para as próximas gerações. Mesmo em plantas assintomáticas, algumas fitobactérias podem infectar a flor, atingir a semente ainda na planta mãe se alojar em seu interior. Além disso, já foi demonstrado que as sementes de tomate possuem estômatos rudimentares em sua superfície, o que não exclui a possibilidade de entrada de patógenos por essa via num dado momento do desenvolvimento das mesmas (SILVA, 2008).

Esta dissertação foi desenvolvida com o objetivo de: 1) desenvolver um protocolo para a condução de testes de germinação e de detecção de *X. vesicatoria* em sementes de tomate, *in vitro*; 2) avaliar o efeito de *X. vesicatoria* sobre a taxa de aborto floral e características dos frutos colhidos; 3) determinar a taxa de transporte e transmissão de *X. vesicatoria* das sementes para as plântulas de tomate.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Origem e importância econômica do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) tem como centro primário de origem a região Andina, no território compreendido entre o Chile e o Equador (FILGUEIRA, 2007). É considerada uma cultura de clima subtropical, com bom desenvolvimento em uma longa faixa de temperatura e amplo espectro de latitude, tipos de solo e métodos de cultivo (ALVARENGA, 2004).

A região sudeste destaca-se como o grande pólo de produção de tomate para atender ao mercado *in natura* enquanto o estado de Goiás destaca-se como grande centro produtor de tomate para a agroindústria (IBGE, 2012). O rendimento médio das lavouras de tomate no Brasil foi de 60,51 t.ha<sup>-1</sup> no ano de 2010 com destaque para os estados do Rio de Janeiro e de Goiás pelas maiores produtividades, 76,54 t.ha<sup>-1</sup> e 74,70 t.ha<sup>-1</sup>, respectivamente (IBGE, 2012).

O cultivo no Estado do Rio de Janeiro tem uma importância muito grande tanto pelo aspecto econômico como social. As lavouras e a comercialização de tomate empregam grande contingente de mão-de-obra desde a fase de produção de mudas à classificação, embalagem, transporte e comercialização no varejo. Em 2010 o Estado do Rio de Janeiro produziu cerca de 204.905 toneladas de tomate (IBGE, 2012).

### 2.2 Espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha-bacteriana

A mancha-bacteriana do tomateiro foi observada pela primeira vez em 1914, descrita como cancro do tomate na África do Sul, e seu agente etiológico identificado como *Bacterium vesicatorium* por Doidge em 1920. Na mesma época, Gardner & Kendrick descreveram a doença ocorrendo no continente americano, ao que chamaram de mancha-bacteriana (*bacterial spot*) e seu agente etiológico de *B. exitiosum*, em 1921. Estes autores, após estudos comparativos dos agentes, concluíram que eles eram pertencentes à mesma espécie, adotando a denominação *Bacterium vesicatorium* no ano de 1923 (DOIDGE, 1920; GARDNER & KENDRICK, 1921; GARDNER & KENDRICK, 1923).

Ao longo dos anos diversas mudanças taxonômicas foram propostas para o agente etiológico da mancha-bacteriana, porém a cada estudo o patógeno apresentava algum tipo de variação. Segundo Quezado et al. (2008), por muito tempo, o agente etiológico da mancha-bacteriana foi reconhecido como *X. campestris* pv. *vesicatoria*, e as pesquisas relacionadas a sua variabilidade genética é que deram origem a mais recente reclassificação taxonômica proposta para a espécie. Jones et al. (2004), baseado em tecnologia de hibridação DNA:DNA, identificaram quatro espécies capazes de incitar sintomas da mancha-bacteriana em tomate, pimentão ou em ambos, sendo elas *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*.

No Brasil, os primeiros relatos de ocorrência da mancha-bacteriana datam de 1947, na região nordeste (BATISTA, 1947). Atualmente, a distribuição da doença é generalizada em todas as regiões produtoras de tomate do país. Em recente levantamento sobre as espécies causadoras da mancha-bacteriana em tomates de mesa no Brasil, Pereira (2010) verificou a ocorrência das quatro espécies distribuídas em 11 Estados brasileiros e a seguinte distribuição: *X. perforans* nas regiões Nordeste, Centro Oeste e Sudeste; *X. gardneri* na região Sul e as quatro espécies ocorrendo na região Sudeste.

O estudo da associação destas espécies com sementes de tomateiro torna-se muito importante, principalmente por ser a semente uma das principais fontes de inóculo primário para a ocorrência de epidemias da doença (CORRÊA, et al., 2008). Quezado-Duval et al. (2004) fizeram o primeiro relato nacional da ocorrência de mancha-bacteriana do tomateiro,

causada por *X. gardneri*, na região Centro Oeste do Brasil e a associou à importação de sementes contaminadas.

Aparentemente, algumas espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana no tomate apresentam preferências quanto a uma determinada faixa de temperatura. Em estudos sobre a interação de espécies de *Xanthomonas* e faixa de temperatura sobre a severidade e o período de incubação em tomate, Araújo (2010) constatou que *X. vesicatoria* e *X. euvesicatoria* comportaram-se de forma constante em todas as faixas de temperatura testadas (20, 25 e 30 °C) e que *X. euvesicatoria* promoveu menor severidade da doença dentre as demais. Já *X. perforans* foi mais agressiva a 30°C e *X. gardneri* a 20°C.

Recentes pesquisas têm relacionado as espécies causadoras da mancha-bacteriana a outras espécies do gênero *Xanthomonas*. Empregando técnicas de *MultiLocus Sequence Analysis* (MLSA) e *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), Hamza et al., (2012) encontraram uma forte relação entre *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. alfalfae* e entre *X. gardneri* e *X. cynarae*.

Segundo Quezado-Duval et al. (2004), a compreensão do complexo da mancha-bacteriana no Brasil é o primeiro passo para o direcionamento de futuras pesquisas sobre detecção, sobrevivência e eficiência do controle da doença.

### 2.3 Transmissão de *Xanthomonas* spp. por sementes

Patógenos transportados e transmitidos pelas sementes constituem um sério problema, pois estas podem ser responsáveis pela reemergência de doenças antigas em áreas de uso contínuo e pela introdução de novas doenças em áreas agrícolas (GITAITIS & WALCOTT, 2007). Além do transporte a longas distâncias e da superação de barreiras naturais e políticas, as sementes promovem, ainda, manutenção da viabilidade e proteção aos patógenos (MACHADO, 2000).

Num lote de sementes, bactérias fitopatogênicas podem estar presentes de diferentes maneiras, infectando ou apenas infestando a sementes, podendo ser transmitidas eficientemente em ambos os casos (MACHADO, 2000; KIMURA et al., 1989) e causar danos variados como: redução da porcentagem de germinação e vigor das mesmas, introdução precoce da doença na lavoura e aumento da demanda por aplicações de defensivos químicos, redução qualitativa e quantitativa da produção final (MACHADO, 2006; KAVITHA & UMESHA, 2007).

No caso das *Xanthomonas* causadoras da mancha-bacteriana do tomateiro, as sementes contaminadas constituem-se na principal fonte de inóculo primário. Apesar da transmissão de fitobacterioses por sementes ser considerada baixa, a utilização de sementes contaminadas por esses agentes, mesmo em baixas proporções, associada a condições ideais de ambiente possibilitam o desenvolvimento de epidemias e sérios danos à produção. Estudos realizados com *X. euvesicatoria* em condições de viveiro, mostraram que a utilização de sementes com 0,01% de contaminação com a bactéria, em ambiente favorável, resultaram em 100% de contaminação das mudas ao final de 30 dias (CARMO et al., 1996).

Tendo em vista as dificuldades de controle da doença no campo devido à indisponibilidade de cultivares resistentes ao patógeno, à baixa eficiência dos produtos químicos aplicados, e à rápida disseminação do patógeno em condições ideais, a adoção de práticas preventivas, sobretudo a utilização de sementes isentas do patógeno ou com níveis de contaminação aceitáveis obtidas a partir de lavouras livres da doença ou por meio da aplicação de tratamentos eficientes, são cada vez mais necessárias (CARMO et al., 2004).

A crescente preocupação com a sanidade de sementes de tomate, devido ao seu importante papel no complexo da mancha-bacteriana do tomateiro, tem estimulado a condução de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de técnicas tratamentos para a sua

erradicação das sementes. Dentre os resultados até então alcançados estão a termoterapia via calor seco a 70°C por 96 horas (CARMO et al., 2004). SILVA et al. (2002), também relatam eficiência de 99,96% na erradicação da bactéria em sementes inoculadas à vácuo e submetidas tratamento via calor seco a 70°C por 96. Estes autores verificaram, ainda, que a ocorrência de efeitos na estrutura da semente não comprometeram a sua qualidade fisiológica.

A aplicação de substâncias desinfestantes, mostrou alta eficiência na erradicação do patógeno. Tratamento de sementes de tomate com ácido clorídrico a 5% resultaram em erradicação da fitobactéria tanto em cinco horas de exposição (MARINGONI & KUROSAWA, 1994) quanto em 10 minutos (CARMO et al., 2004), sendo recomendado essa técnica para o semeio imediato das sementes, evitando o armazenamento das mesmas.

Técnicas utilizando controle biológico também têm sido estudadas no tratamento de sementes de tomate. Um estudo do efeito do tratamento biológico sobre a incidência da mancha-bacteriana foi realizado na Índia, onde se observou que as sementes naturalmente infestadas pelo patógeno, quando tratadas com o antagonista *Pseudomonas fluorescens* obtiveram incrementos em sua qualidade fisiológica (KAVITHA & UMESHA, 2007).

## **2.4 Influência de *Xanthomonas* spp. nas características da planta**

Infecções bacterianas podem ocorrer em diversas etapas do desenvolvimento vegetal (MENTEN & BUENO, 1987). A infecção incitada por espécies de *Xanthomonas* pode se dar em todas etapas do ciclo do tomateiro, na fase de mudas em viveiros e durante o desenvolvimento da cultura no campo (CARMO, 1996). A fitobactéria incitante da mancha-bacteriana do tomateiro apresenta diversas estratégias de sobrevivência como colonização em plantas voluntárias da família solanácea, de restos culturais de plantas infectadas e ainda não decompostas e, epifiticamente na vegetação espontânea (STALL et al., 2009). Todos os órgãos aéreos das plantas de tomateiro podem ser afetados pela doença, ocasionando lesões em folhas, frutos e perdas no rendimento de frutos comerciais (GITAITIS & NILAKHE, 1983; LOUWS, 2001).

Nas folhas, as lesões são inicialmente minúsculas, circulares e irregulares, e quando evoluem aumentam de tamanho e apresentam aspecto encharcado (anasarca) em tonalidade marrom ou negra causada pela necrose dos tecidos. As lesões foliares são de tamanho variado, podendo ter de 1 até 5 mm de diâmetro e se localizar nos bordos ou no limbo da folha. Sob condições ideais de ambiente, as lesões podem coalescer e formar áreas maiores de tecido necrosado, que podem secar e tornar as folhas quebradiças (ROBBS, 1985). As infecções foliares resultam em redução da área foliar o que reduz atividade fotossintética e expõe os frutos à radiação solar, promovendo redução do potencial produtivo da planta e o aparecimento de sintomas de queimadura de sol e desuniformidade de maturação (LOPES & QUEZADO-SOARES, 2000).

Os sintomas em frutos de tomate são caracterizados por pequenas áreas encharcadas que depois necrosam e aumentam de tamanho, dando origem a lesões deprimidas ou levemente salientes, de aspecto corticoso (KUROSAWA & PAVAN, 1995; ROBBS, 1985). Nas lavouras destinadas à produção de frutos para o consumo *in natura*, a aparência do produto é prejudicada pelas deformações causadas pelos sintomas (KUROSAWA & PAVAN, 1995), pela desuniformidade na coloração e pelos sintomas de queimaduras de sol (LOPES & QUEZADO-SOARES, 2000). Já nos tomates para o processamento industrial, ocorre desvalorização do produto quando a qualidade é afetada pelo amarelecimento da película e redução do teor de açúcares (°Brix), em consequência da exposição do fruto à insolação direta (LOPES & ÁVILA, 2005).

Quando o desenvolvimento da doença se dá na floração e a incidência das lesões localiza-se no pedúnculo floral, ocorre queda de flores e frutos. Quando as lesões incidem

sobre os frutos pequenos, podem levar a sua deformação (KUROSAWA & PAVAN, 1995; ALVARENGA, 2004). Os danos sobre a fase reprodutiva da planta são importantes pois reduzem quantitativamente a produção da planta. Nesta fase, a colonização dos tecidos internos do fruto pode ocorrer e a bactéria atingir diretamente as sementes em formação (ROBBS, 1985). Frutos de tomate ainda verdes inoculados artificialmente com *X. vesicatoria*, mostraram redução do número de sementes viáveis por fruto infectado em 50%, e a expressiva ocorrência de sementes vestigiais em comparação com frutos sadios, sugerindo interrupção no processo de formação das sementes (SILVA, 2008).

Segundo NEERGAARD (1979), um dos danos causados por fitobactérias é o aborto das sementes. Falhas na fertilização e paralisação do processo de formação das sementes podem ocorrer caso a infecção pela fitobactéria coincida com a fase inicial da formação do fruto. Em estádios mais avançados de formação, o contato com o inóculo pode também promover reduções de tamanho e enrugamento das sementes, além de depreciação da qualidade.

## **2.5 Perdas devido à queda de flores infectadas por fitobactérias**

Dentre os sintomas da doença, a queda de flores é de grande importância, pois interfere diretamente na produtividade da planta (LOPES & ÀVILA, 2005).

Em infecções por *Clavibacter michiganensis* ssp *michiganensis*, agente do cancro bacteriano do tomateiro, observou-se queda de flores e frutos novos superiores a 20% da floração, e quando o ataque foi generalizado nos cachos, sob condições propícias à doença, a queda de flores ocorreu em 100% das plantas (FEITOSA & CRUZ, 2003).

A mancha-bacteriana do maracujazeiro, incitada por *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, é capaz de inutilizar os frutos para o consumo, os quais apresentam grandes manchas superficiais, de cor esverdeada e oleosa, que podem coalescer causando extensa área lesionada (HALFELD-VIEIRA & NECHET, 2006; JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 2007). Em maracujá doce, pode ocorrer a deterioração do mesocarpo, caracterizada por podridão mole, com anasarca, descoloração e consequente separação da casca, com o aparecimento ou não de cavidades (MALAVOLTA JÚNIOR et al., 2001).

Como sintomas do cancro bacteriano da videira, causado por *X. campestris* pv. *viticola*, são observados manchas necróticas e cancos escuros em toda parte aérea e, principalmente, nas inflorescências e cachos já formados. Os principais prejuízos diretos são a redução do volume de cachos com valor comercial, o comprometimento dos ramos produtivos e o favorecimento ao ataque de patógenos secundários (*Lasioidiplodia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, e leveduras), aumentando a incidência de podridões de cacho (ARAÚJO, 2001; LIMA & FERREIRA, 2000; NASCIMENTO, 2005).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção do isolado de *Xanthomonas vesicatoria* e testes de patogenicidade

O ensaio foi conduzido entre os meses de março e maio de 2010, no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da UFRRJ. Os isolados de *X.vesicatoria* utilizados eram pertencentes à coleção bacteriológica do laboratório citado (Tabela 1), e foram originalmente isolados de folhas de tomate com sintomas de mancha-bacteriana, oriundas de plantas do município de Vassouras, localizado no estado do Rio de Janeiro, e de Viçosa, no estado de Minas Gerais. Os isolamentos foram realizados no período aproximado de 1995 a 1997 e os isolados se encontravam preservados em água esterilizada e armazenados à temperatura ambiente.

Para a execução dos testes foram utilizadas mudas de tomateiro, cultivar Santa Clara Miss Brasil, por apresentar suscetibilidade à mancha-bacteriana, confirmada em estudos anteriores realizados por Silva (2008). As mudas foram utilizadas quando apresentavam mais de 25 dias de idade.

Os isolados foram repicados para placas contendo o meio de cultura Nutriente Ágar (NA) (FAHY & HAYWARD, 1983) e crescidos por 48 horas à temperatura de 28 °C. As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina (NaCl a 0,85%) e a concentração ajustada para aproximadamente 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias (UFC).mL<sup>-1</sup>. As inoculações foram feitas utilizando-se o método de infiltração com seringa hipodérmica, na face inferior das folhas (SILVA, 2008). Para cada isolado, foram inoculadas três plantas e de cada planta eram inoculados de dois a três folíolos. Após a inoculação, as mudas foram colocadas em câmara úmida pelo período de 48 horas.

Aos sete dias após a inoculação, foram isoladas colônias típicas de *X. vesicatoria* a partir de folhas com sintomas. Os isolamentos foram realizados retirando-se fragmentos de folhas na região limítrofe entre o tecido lesionado e sadio. Procedeu-se à assepsia dos fragmentos de tecido pela imersão sequenciada dos mesmos em álcool etílico (70%) por 30 segundos, em solução de hipoclorito de sódio (NaClO, 0,7%) por um minuto e três vezes em água destilada estéril (ADE) por um minuto cada. Em seguida, depositaram-se os fragmentos de tecido em placas de Petri esterilizadas contendo solução salina (NaCl a 0,85%) onde permaneceram por 20 minutos. Após este período, retiraram-se alíquotas com a alça de platina que foram riscadas por estrias sobre o meio de cultura Nutriente Ágar (NA). Mantiveram-se as placas em BOD regulada para 28°C ±2°C por 48 horas.

Aproximadamente, quatro inoculações sucessivas foram realizadas para cada isolado até que as culturas fossem preservadas em óleo mineral (MARIANO, 2000).

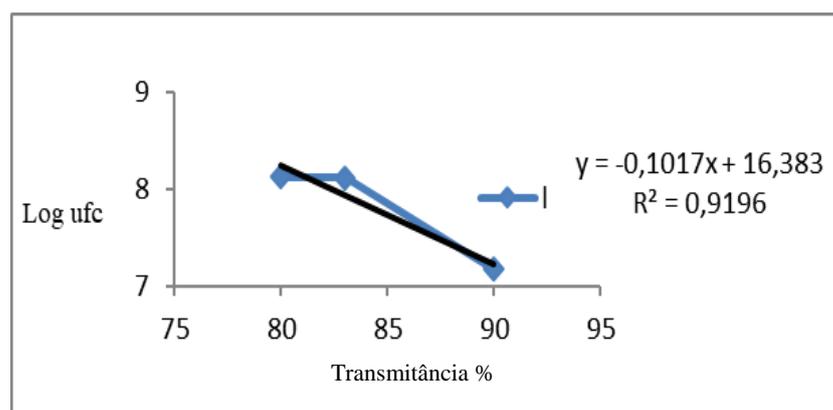
**Tabela 1.** Isolados de *Xanthomonas vesicatoria* virulentos ao tomateiro, submetidos à seleção por testes de patogenicidade. Seropédica, UFRRJ, 2010.

Isolado	Método de Preservação	Origem	Data de Registro
ENA 4337	Água esterilizada	-	-
ENA 4463	Água esterilizada	Vassouras-RJ	28/05/96
ENA 4481	Água esterilizada	-	-
ENA 4485	Água esterilizada	Viçosa-MG	10/11/97
ENA 4568	Água esterilizada	Vassouras-RJ	12/11/99

### 3.2 Caracterização dos isolados e quantificação da concentração de inóculo

Este ensaio foi realizado entre os meses de maio a junho de 2010, no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da UFRRJ. Os cinco isolados testados foram submetidos a testes morfológicos (coloração de Gram e movimentação em água) e bioquímicos (hidrólise da gelatina, oxidação/fermentação da glicose e hidrólise do amido), seguindo a metodologia descrita por Maringoni (2010).

Foram realizados testes para a calibração da suspensão de inóculo utilizando-se o isolado ENA 4463. Seis suspensões de células do isolado foram preparadas a partir de colônias com 48 horas de crescimento em meio de cultura NA a 28 °C. Em seguida, as suspensões foram diluídas em série até  $10^{-5}$  para leitura em espectrofotômetro (540 nm de comprimento de onda). Das respectivas suspensões, que resultaram em transmitância de 80, 83, 90, 95, 97 e 100% foram tomadas alíquotas de 100  $\mu$ L para riscagem em placas de Petri contendo o meio NA. Estas foram mantidas em BOD regulada para  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 horas quando foi feita a contagem do número de UFC por placa e calculada o número de UFC por mL de suspensão. Com estes dados foi construída a curva da população bacteriana em função da transmitância (Figura 1).



**Figura 1.** Concentração bacteriana, isolado ENA 4463 de *Xanthomonas vesicatoria*, em função da transmitância da suspensão.

### 3.3 Seleção do meio de cultura para condução do teste de germinação

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da UFRRJ, no período de junho a agosto de 2010. Testaram-se diferentes meios de cultura para germinação e crescimento de plântulas de tomate e, crescimento e recuperação de *X. vesicatoria*. Foram utilizadas sementes de tomate, cultivar Perinha Água Branca, proveniente de cultivos anteriormente realizados no Setor de Horticultura da UFRRJ e o isolado ENA 4463 de *X. vesicatoria*. Para tanto, foi adotado um esquema fatorial 2x5, composto por inoculação ou não com a fitobactéria e por cinco composições de meio de cultura. Os tratamentos aplicados às sementes foram: 1) assepsia superficial e inoculação por imersão das sementes em suspensão de células da fitobactéria e 2) assepsia superficial e imersão em água destilada estéril. Os meios de cultura testados foram Ágar-Água (20 g de ágar.litro<sup>-1</sup> de água destilada) (SCHAAD et al., 2001) e Nutriente Ágar (5g de peptona de carne + 3g de extrato de carne + 2,5g de sacarose + 16g de ágar.litro<sup>-1</sup> de água destilada) (FAHY & HAYWARD, 1983). A estes meios foram adicionados solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) diluída a 25% da concentração iônica, considerando a fração de macronutrientes ou macro e micronutrientes (Tabela 2). Os

meios utilizados foram assim constituídos: 1) Ágar-Água com macronutrientes; 2) Ágar-Água com micro e macronutrientes; 3) Nutriente Ágar com macronutrientes; 4) Nutriente Ágar com micro e macronutrientes e 5) Nutriente Ágar.

Para a montagem do teste, as sementes de tomate foram submetidas à assepsia em solução de hipoclorito de sódio (0,7% de NaClO) sob agitação, pelo período de um minuto. Em seguida, foram lavadas sob agitação em água destilada estéril (ADE) por um minuto em cinco ciclos sucessivos, peneiradas, dispostas em placa de Petri contendo papel germitest esterilizado para remoção do excesso de umidade e secas em estufa de ventilação forçada a 35°C por 24 horas. A suspensão de células foi preparada com culturas de 36-48 horas de crescimento em meio de cultura NA a 28 °C, e a concentração ajustada para aproximadamente  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, com auxílio de espectrofotômetro a 540 nm e leitura de 85 % de transmitância. As sementes foram imersas nesta suspensão e mantidas a 5 °C pelo período de 24 horas.

As sementes foram distribuídas individualmente em tubos de ensaio contendo os diferentes meios, em um total de 10 tubos por tratamento. Os tubos foram vedados com filme plástico e mantidos em temperatura ambiente até o momento das avaliações (temperatura média de 30°C).

As avaliações foram realizadas aos cinco e aos 14 dias após a montagem do teste (DAM) por isolamentos indiretos de amostras de tegumento, radícula, hipocótilo e cotilédones das plântulas. Nas avaliações, foram utilizadas quatro amostras para cada tratamento. Cada amostra foi fracionada em diferentes porções com auxílio de um bisturi, em condições assépticas, e os fragmentos depositados em Erlenmeyers contendo 20 mL de solução salina (NaCl a 0,85%), que foram mantidos sob agitação por 30 minutos. Alíquotas de 100 µL das suspensões obtidas foram riscadas em placas de Petri contendo o meio NA e estas placas incubadas em BOD a 28±2°C. Após 48 horas, contabilizou-se o número de UFC da bactéria por órgãos das plântulas.

Aos 14 DAM foram determinados os comprimentos da radícula e da parte aérea, com o auxílio de um paquímetro, e feitas observações ao microscópio estereoscópico para detecção de sintomas de fitotoxidez ou de mancha-bacteriana.

**Tabela 2.** Composição da solução nutritiva de Hoagland ajustada para 25% de concentração iônica, utilizada para o desenvolvimento de meio de cultura adequado à germinação de sementes de tomate inoculadas com *Xanthomonas vesicatoria* - adaptado de HOAGLAND & ARNON (1950). Seropédica, UFRRJ, 2010.

Nutrientes		
Macro	Concentração (M)	Dosagem (µL.mL <sup>-1</sup> )
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1	625
KNO <sub>3</sub>	1	625
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	1	250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	125
Micro		
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>		
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O, ou		
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O, ou		
MnSO <sub>4</sub> anidro	1	250
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>27</sub> .H <sub>2</sub> O		
FeEDTA		2500

### **3.4 Efeito de *Xanthomonas vesicatoria* sobre a taxa de aborto floral, pegamento, fixação e características dos frutos de tomate**

Estudou-se o efeito de *X. vesicatoria* sobre os componentes de produção do tomateiro sob condições de casa-de-vegetação, no Campo Experimental do Setor de Horticultura e no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no período de abril a setembro de 2011.

#### **3.4.1 Ensaio em casa de vegetação**

Utilizaram-se três concentrações de suspensão de células de *X. vesicatoria*, isolado ENA 4463, e plantas da cultivar Santa Clara Miss Brasil. Os tratamentos testados foram: cachos florais inoculados com suspensão de células de *X. vesicatoria* em solução salina (NaCl a 0,85%) nas concentrações de 1)  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>; 2)  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e 3)  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>, todos ensacados após a inoculação; 4) cachos florais inoculados com solução salina e ensacamento e 5) cachos florais apenas ensacados.

Sementes de tomate submetidas a tratamento térmico a 70 °C por 96 horas (SILVA et al., 2002) foram semeadas em bandejas de poliestireno contendo substrato comercial para produção de mudas. Aos 20 dias após a semeadura, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de 8,0 L e preenchidos com substrato preparado à base de solo argiloso, esterco bovino curtido e substrato comercial na proporção 3:1:1.

Adotou-se delineamento de blocos ao acaso com cinco tratamentos e dez repetições sendo cada parcela composta por um vaso contendo uma planta. O espaçamento entre os vasos foi de 1,0x0,6 m.

Após o transplante seguiu-se o manejo usual da cultura, com a retirada manual das ervas espontâneas e a condução vertical das plantas em uma única haste com auxílio de fitilhos. O suprimento diário das necessidades hídricas foi realizado através de irrigação manual, com auxílio de uma mangueira, feita ao pé da planta.

Aos nove dias após o transplantio (DAT), as plantas foram pulverizadas com biofertilizante líquido Agrobio (1%). A partir dos 43 DAT iniciaram-se aplicações de macronutrientes na dose de 15g de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 14g de uréia, 30g de K<sub>2</sub>O e 7,3g de MgSO<sub>4</sub> por vaso, em seis aplicações semanais. Ao surgimento dos primeiros frutos com podridão apical, observado a partir do terceiro cacho, iniciaram-se aplicações semanais de solução de CaCl a 0,6%, direcionadas às inflorescências e aos cachos com frutos em formação em um total de quatro pulverizações.

Durante a condução do ensaio foram realizadas duas pulverizações preventivas para o controle da requeima (*Phytophthora infestans*) com fungicida a base de mancozeb (3g.L<sup>-1</sup>) aos 38 e 53 DAT e quatro aplicações do inseticida sistêmico a base de tiametoxan (20 g.100L<sup>-1</sup>) para o controle da mosca branca (*Bemisia tabaci*) aos 66, 80, 99, 120 DAT.

Diariamente, anotaram-se os dados de temperatura, máxima e mínima, registrados por um termômetro colocado dentro da casa de vegetação.

#### **3.4.2 Inoculação dos cachos florais e quantificação do aborto floral, pegamento e fixação dos frutos**

Antes das inoculações, identificaram-se os cachos com um barbante e contaram-se o número de flores por cacho. Os botões florais murchos e pequenos frutos em estágio inicial de desenvolvimento foram previamente retirados. As suspensões bacterianas dos respectivos tratamentos foram aplicadas por meio de atomização nas flores abertas até o ponto de

escorrimento e os cachos foram submetidos à câmara úmida por 48 horas (MARIANO, 2000; SILVA, 2008) por meio do ensacamento do cacho com sacos de papel manteiga.

As inoculações iniciaram-se quando as plantas apresentavam de dois a três cachos florais, por volta dos 48 DAT e seguiram-se pelos 64, 71, 78, 83, 108 DAT. As plantas receberam inoculações sucessivas do terceiro ao sétimo cacho, sempre realizadas ao final da tarde, quando a temperatura na casa de vegetação era mais amena.

As avaliações da taxa de aborto floral foram realizadas 48 horas após a inoculação por ocasião da retirada da câmara úmida por meio da contagem das flores caídas no interior do envelope. Nas avaliações foram consideradas as seguintes variáveis: 1) porcentagem de flores abortadas e fixadas em relação ao número inicial.

### **3.4.3 Colheita e avaliação dos frutos**

A colheita iniciou-se quando os frutos atingiram o ponto de maturação fisiológica aos 105 DAT, seguindo-se mais oito colheitas aos 106, 110, 112, 116, 119 e 125, 133 e 140 DAT. Colheram-se os frutos manualmente e estes foram dispostos em embalagens plásticas e identificados conforme o tratamento, planta e número do cacho. Após a colheita, os frutos foram avaliados quanto à coloração (alaranjado, vermelho ou vermelho intenso), uniformidade da coloração, diâmetros (equatorial e longitudinal em mm), massa fresca (gramas), número de sementes viáveis e vestigiais, presença de defeitos ou anomalias e presença de sintomas de mancha-bacteriana.

### **3.4.4 Extração das sementes**

Os frutos foram lavados em água corrente com auxílio de uma esponja macia e detergente neutro, pulverizados com solução hipoclorito de sódio (0,7% de NaClO) e dispostos em papel germitest esterilizado para remoção do excesso de umidade. Em seguida, sob condições assépticas, cortaram-se os frutos transversalmente e extraiu-se a polpa dos mesmos sobre uma peneira. Com o auxílio de uma espátula, friccionaram-se as sementes para retirada do excesso de mucilagem, e depositaram-nas em erlenmeyers contendo água destilada estéril, seguido de agitação por um minuto. Por fim, as sementes foram peneiradas e friccionadas em papel germitest esterilizado para completa remoção da mucilagem. Após este processo as sementes foram colocadas em envelopes de papel, e secas em estufa de ventilação forçada à 35° C por 48 horas.

### **3.5 Transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* das sementes para plântulas de tomate**

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro nos meses de novembro e dezembro de 2011.

Utilizaram-se sementes de tomate, cultivar Santa Clara Miss Brasil, extraídas de frutos frescos oriundos de flores inoculadas com a fitobactéria ( $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>) ou não inoculadas, produzidas sob condições de casa-de-vegetação no Setor de Horticultura da UFRRJ, conforme item 3.1.4. Cada uma destas duas amostras foram divididas em duas subamostras de 150 sementes e submetidas a dois novos tratamentos. As sementes oriundas de frutos inoculados foram submetidas ou não à assepsia com NaClO. Metade das sementes oriundas de frutos não inoculados foram submetidas a assepsia e em seguida inoculadas com suspensão de células de *X. vesicatoria* do isolado ENA 4463, pelo método a vácuo (BASHAN & ASSOULINE, 1983) e a outra metade foi apenas submetida à assepsia com NaClO.

A assepsia das sementes foi feita por meio de imersão das mesmas em álcool etílico (70%) por 30 segundos seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio (0,7% de NaClO) por um minuto e lavagem sob agitação em água destilada esterilizada em cinco ciclos sucessivos. Após este processo, as sementes foram depositadas em placas de Petri contendo papel germitest esterilizado e mantidas em estufa de ventilação forçada a 30 °C até o semeio, por aproximadamente 3 horas. A inoculação pelo método a vácuo foi feita utilizando-se suspensão de células do isolado ENA 4463 ( $10^8$ UFC.mL<sup>-1</sup>) em solução salina (NaCl 0,85% p/v) (BASHAN & ASSOULINE, 1983).

Foram utilizados 240 tubos de ensaio, de tamanho médio, preenchidos com 10 mL do meio de cultura Ágar-Água acrescido de macro e micronutrientes, desenvolvido à base da solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) diluída a 25% da concentração iônica (conforme descrito no item 3.1.3). Em condições assépticas e com auxílio de uma pinça, as sementes foram depositadas individualmente nos tubos de ensaio, e estes foram levados à câmara BOD regulada para 25°C ±2°C e 12 horas de fotoperíodo.

Para determinar a taxa de transmissão de *X. vesicatoria* pelas sementes foram feitos isolamentos diretos e indiretos a partir de diferentes fragmentos das plântulas em cinco estádios de desenvolvimento. Foram feitos isolamentos a partir do tegumento das sementes aos zero e dois dias após a semeadura (DAS), e da radícula, hipocótilo e cotilédones das plântulas aos 14 e 21 DAS.

Nas avaliações realizadas aos zero e aos dois DAS foram feitos isolamentos diretos e indiretos das sementes. Para os isolamentos diretos, as sementes foram depositadas sobre placas de Petri contendo meio de cultura NA, e levadas a BOD a 28°C ±2°C pelo período de 48 horas.

Para os isolamentos indiretos foram tomadas cinco amostras de cada tratamento, sendo cada amostra composta por duas sementes, totalizando 10 sementes por tratamento. As amostras foram depositadas em tubos de ensaio contendo solução salina (NaCl a 0,85%) na proporção de 1mL/semente não inoculada ou de 5mL/semente inoculada. Em seguida, os tubos foram mantidos sob agitação durante 20 minutos quando foram coletadas alíquotas de 100 µL e riscadas em três placas de Petri contendo o meio NA. As placas foram acondicionadas em câmara BOD com temperatura regulada para 28 ±2°C por 48 horas.

Nas avaliações aos sete, 14 e 21 DAS efetuaram-se apenas os isolamentos indiretos a partir da radícula, hipocótilo e dos cotilédones, seguindo-se a mesma metodologia descrita anteriormente. Especialmente aos 14 DAS, os isolamentos das folhas cotiledonares foram realizados considerando-se a seguinte distinção: quando a estrutura ainda conservava o tegumento da semente aderido na sua extremidade, a folha recebia a denominação folha cotiledonar um, e o tegumento era cuidadosamente retirado para execução do isolamento, enquanto que a folha cotiledonar livre do tegumento era representada pela denominação folha cotiledonar dois.

Após 48 horas de crescimento, procedeu-se a quantificação do número de UFC de *X. vesicatoria* e os dados expressos em porcentagem.

### 3.6 Análise estatística

Os dados obtidos no ensaio de seleção do meio de cultura para as avaliações *in vitro*, dados em UFC de *X. vesicatoria* por órgãos das plântulas aos cinco e aos 14 DAS, bem como os dados dos comprimentos da radícula e da parte aérea das plântulas aos 14 DAS, foram transformados para raiz (x+1) para a aplicação da análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para os resultados obtidos do ensaio em casa de vegetação, provenientes da quantificação do aborto floral, calculou-se o número total de flores inoculadas, abortadas e fixadas por tratamento, além das porcentagens de flores abortadas e vingadas por tratamento, e procedeu-se à análise de variância. As médias dos dados foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da caracterização morfológica dos frutos, dados em massa fresca, diâmetros equatorial e longitudinal e número e porcentagem de sementes totais e vestigiais foram submetidos à análise de variância. Para as comparações das médias, os dados foram transformados para raiz ( $x+1$ ) e aplicou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No ensaio de transmissão da fitobactéria das sementes para plântulas de tomate, os dados da quantificação da população de *X. vesicatoria*, dados de UFC da fitobactéria por órgãos das plântulas (no tempo zero e aos dois, sete e 14 DAS), foram transformados para Log (UFC+10) para a aplicação da análise de variância e as médias foram submetidas ao teste de Duncan (a  $p<0,0001$ ,  $p<0,02$  e a  $p<0,05$ ). Nas análises estatísticas utilizou-se o software SAEG (2007).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seleção do isolado de *Xanthomonas vesicatoria* e testes de patogenicidade

Os isolados ENA 4463 e ENA 4568 foram os mais virulentos causando sintomas mais severos já aos sete dias após a inoculação. Em todas as inoculações realizadas, estes isolados se destacaram frente aos demais.

### 4.2 Caracterização dos isolados e quantificação da suspensão de inóculo

Todos os isolados testados apresentaram as mesmas reações nos testes bioquímicos (Tabela 3). Além disso, as características morfológicas apresentadas foram compatíveis com as descritas para *X. vesicatoria* na literatura, como células de formato bastonetiforme, colônia de cor amarela, centro convexo e borda lisa (LOPES & QUEZADO-SOARES, 2000), coloração de Gram negativa, hidrólise da gelatina negativa, hidrólise do amido negativa, e oxidação/fermentação da glicose positiva (KAVITHA & UMESHA, 2007).

**Tabela 3.** Caracterização morfológica e bioquímica de diferentes isolados de *Xanthomonas vesicatoria*. Seropédica, UFRRJ, 2010.

Isolados	Testes morfológicos			Testes bioquímicos	
	Coloração de Gram	Movimentação em água	Hidrólise da gelatina	Oxidação/fermentação da glicose	Hidrólise do amido
ENA 4481	negativa	lenta	negativa	Positiva	negativa
ENA 4337	negativa	lenta	negativa	Positiva	negativa
ENA 4463	negativa	lenta	negativa	Positiva	negativa
ENA 4568	negativa	lenta	negativa	Positiva	negativa
ENA 4485	negativa	lenta	negativa	Positiva	negativa

### 4.3 Seleção do meio de cultura para condução do teste de germinação

As sementes emitiram a radícula em até 48 horas e germinaram até sete dias após o semeio (DAS) em todos os meios utilizados. Observou-se, porém, efeito significativo dos meios sobre a população bacteriana detectada nas duas avaliações nos isolamentos (Tabela 4). Embora não se tenha verificado o crescimento de colônias bacterianas na superfície dos meios pode-se recuperar a fitobactéria nos testes de isolamentos. No tratamento à base de Ágar-Água pode-se recuperar facilmente *X. vesicatoria* nos isolamentos indiretos feitos a partir de todas as estruturas das plântulas oriundas de sementes inoculadas e semeadas nestes meios (Tabela 5). Já nos tratamentos com Nutriente Ágar, apesar da recuperação da fitobactéria em algumas amostras, houve também o crescimento de fungos diversos o que dificultou a recuperação de *X. vesicatoria*, mesmo nos tratamentos com sementes inoculadas. Silva et al. (2002) constatou em isolamentos a partir de sementes de tomate inoculadas com *X. vesicatoria*, que no meio de Nutriente Ágar houve intenso crescimento de fungos e bactérias, e que estes inibiram o crescimento de *X. vesicatoria*, dificultando a identificação das colônias do patógeno e o seu reisolamento. Em testes de sanidade, a microflora das sementes representa o maior problema na detecção de bactérias alvo, especialmente quando não se utiliza um meio seletivo para tanto (GITAITIS & WALCOTT, 2007).

Na primeira avaliação, realizada aos cinco DAS, o único tratamento que possibilitou a recuperação de colônias da fitobactéria foi o meio Ágar-Água acrescido de macro e micro nutrientes, com maior população de *X. vesicatoria* incidindo sobre o tegumento das sementes.

Já na segunda avaliação, aos 14 DAS, os meios à base de Ágar-Água, independente da suplementação ou não com macro e micronutrientes, apresentaram população de fitobactéria significativamente maior que nos meios com Nutriente Ágar e possibilitando a recuperação bacteriana a partir de todos os órgãos das plântulas (Tabela 5).

Foi constatado efeito significativo dos tratamentos sobre o comprimento médio da radícula, do hipocótilo e cotilédones das plântulas (Tabela 4) com médias significativamente maiores, aos 14 DAS, nos tratamentos à base de Ágar-Água (Tabela 5). Neste meio, não houve diferença significativa entre o tratamento inoculado e a testemunha não inoculada.

No decorrer do ensaio não foram observados sintomas de fitoxidez, nem de mancha-bacteriana nas plântulas. Apesar da ausência de sintomas confirmou-se nos isolamentos a presença da fitobactéria na radícula como residente (Tabela 5). *X. vesicatoria* pode sobreviver facilmente como residente em hospedeiros alternativos e plantas de tomateiro. Nestas se multiplica epifiticamente mesmo sob condições desfavoráveis ao desenvolvimento da doença (TIMMER et al., 1987; MCGUIRE et al., 1991).

Na primeira avaliação, realizada aos cinco DAS, o único tratamento que possibilitou a recuperação de colônias da fitobactéria foi o meio Ágar-Água acrescido de macro e micro nutrientes, com maior população de *X. vesicatoria* incidindo sobre o tegumento das sementes. Já na segunda avaliação, aos 14 DAS, os meios à base de Ágar-Água, independente da suplementação ou não com macro e micronutrientes, apresentaram população de fitobactéria significativamente maior que nos meios com Nutriente Ágar e possibilitando a recuperação bacteriana a partir de todos os órgãos das plântulas (Tabela 5).

Foi constatado efeito significativo dos tratamentos sobre o comprimento médio da radícula, do hipocótilo e cotilédones das plântulas (Tabela 4) com médias significativamente maiores, aos 14 DAS, nos tratamentos à base de Ágar-Água (Tabela 5). Neste meio, não houve diferença significativa entre o tratamento inoculado e a testemunha não inoculada.

No decorrer do ensaio não foram observados sintomas de fitoxidez, nem de mancha-bacteriana nas plântulas. Apesar da ausência de sintomas confirmou-se nos isolamentos a presença da fitobactéria na radícula como residente (Tabela 5). *X. vesicatoria* pode sobreviver facilmente como residente em hospedeiros alternativos e plantas de tomateiro. Nestas se multiplica epifiticamente mesmo sob condições desfavoráveis ao desenvolvimento da doença (TIMMER et al., 1987; MCGUIRE et al., 1991).

**Tabela 4.** Análise de variância para efeito de meio de cultura, solução nutritiva e inoculação das sementes sobre a população de *Xanthomonas vesicatoria* em diferentes órgãos de plântulas de tomate, aos cinco e aos 14 dias após o semeio, e no comprimento da radícula, hipocótilo e cotilédones das plântulas. Seropédica, UFRRJ, 2010.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio							
		População de <i>X. vesicatoria</i> aos 5 dias		População de <i>X. vesicatoria</i> aos 14 dias			Comprimento		
		Tegumento <sup>1</sup>	Radícula <sup>1</sup>	Radícula <sup>1</sup>	Hipocótilo <sup>1</sup>	Cotilédone <sup>1</sup>	Radícula <sup>1</sup>	Hipocótilo <sup>1</sup>	Cotilédone <sup>1</sup>
Tratamento	9	103,04 *	13,72 *	1189,8 *	34,85 *	263,92 *	1220,85 *	8,05 *	91,05 *
Resíduo	20	0,966	0,055	69,93	0,18	5,84	30,23	0,18	1,47
CV%		34,45	14,09	80,09	14,48	45,90	21,97	13,25	15,69

<sup>1</sup>Dados transformados para  $\text{raiz}(x+1)$ .

\*Significativo até 5% pelo teste T.

**Tabela 5.** Efeito de diferentes combinações de meio de cultura, solução nutritiva e inoculação das sementes sobre a população de *Xanthomonas vesicatoria* em diferentes órgãos de plântulas de tomate, aos cinco e aos 14 dias após o semeio, e no comprimento da radícula, hipocótilo e cotilédones das plântulas. Seropédica, UFRRJ, 2012. Seropédica, UFRRJ, 2010.

Tratamento	População de <i>X. vesicatoria</i> aos 5 dias		População de <i>X. vesicatoria</i> aos 14 dias			Q.M. Comprimento		
	Tegumento <sup>1</sup>	Radícula	Radícula	Hipocótilo	Cotilédone	Radícula	Hipocótilo	Cotilédone
Ágar-Água + Macro + Micro + Xv	387,0 a	59,6 a	2641,3 a	13,33 b	299,00 b	46,06 <sup>a</sup>	18,94 abc	12,14 ab
Ágar-Água + Macro + Xv	0 b	0 b	2474,6 a	137,33 a	799,33 a	47,02 a	18,07 abc	12,66 a
Nutriente Ágar + Macro + Micro + Xv	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c	0 d	0 d	0 d
Nutriente Ágar + Macro + Xv	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c	0 d	0 d	0 d
Nutriente Ágar + Test + Xv	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c	0 d	0 d	0 d
Ágar-Água + Macro + Micro+Test	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c	43,06 ab	25,85 a	12,86 a
Ágar-Água + Macro + Test	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c	46,78 a	21,48 ab	11,50 abc
Nutriente Ágar + Macro + Micro + Test	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c	21,55 c	12,53 bc	8,72 c
Nutriente Ágar + Macro + Test	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c	18,54 c	14,11 abc	10,25 abc
Nutriente Ágar + Test + Test	0 b	0 b	0 b	0 c	0 c	27,19 bc	10,32 c	9,17 bc

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Foi constatado efeito significativo dos tratamentos sobre o comprimento médio da radícula, do hipocótilo e cotilédones das plântulas (Tabela 4) com médias significativamente maiores, aos 14 DAS, nos tratamentos à base de Ágar-Água (Tabela 5). Neste meio, não houve diferença significativa entre o tratamento inoculado e a testemunha não inoculada.

No decorrer do ensaio não foram observados sintomas de fitoxidez, nem de mancha bacteriana nas plântulas. Apesar da ausência de sintomas confirmou-se nos isolamentos a presença da fitobactéria na radícula como residente (Tabela 5). *X vesicatoria* pode sobreviver facilmente como residente em hospedeiros alternativos e plantas de tomateiro. Nestas se multiplica epifiticamente mesmo sob condições desfavoráveis ao desenvolvimento da doença (TIMMER et al., 1987; MCGUIRE et al., 1991).

Um dos critérios utilizados para definição do substrato adequado foi a capacidade de recuperação da fitobactéria nas duas datas de avaliação. Como o meio Ágar-Água suplementado de macro e micro nutrientes foi o único que proporcionou a recuperação de *X vesicatoria* na primeira avaliação, aos cinco DAS, e boa recuperação na segunda avaliação, aos 14 dias, foi adotado nos testes seguintes. SILVA (2008) relata alta população de *X. vesicatoria* ocorrendo desde 12 até 96 horas após o semeio das sementes, e flutuações em sua população em função da liberação gradual de exsudados pelas sementes durante a fase de embebição das mesmas.

#### **4.4 Efeito de *Xanthomonas vesicatoria* sobre a taxa de aborto floral, pegamento, fixação e características dos frutos de tomate**

Observou-se alta taxa de aborto floral em todos os tratamentos, inclusive na testemunha. Estes abortos ocorreram tanto em cachos recém emitidos, que possuíam apenas os botões florais, quanto em cachos com todas as flores plenamente expandidas e também naqueles que já apresentavam flores e frutos em desenvolvimento. Esta alta taxa de aborto floral, provavelmente, está associada às condições de ambiente no interior da casa de vegetação. Segundo Lopes e Stripari (1998) temperaturas extremas e o tempo de sua duração são fatores importantes que interferem no equilíbrio hormonal do tomateiro, no seu desenvolvimento e sobrevivência. As temperaturas máximas observadas durante a condução do ensaio estavam na faixa de 37 e 50 °C, as mínimas entre 16 e 35 °C. Estas temperaturas estão bem acima das citadas como adequadas para o tomateiro cuja temperatura ótima está na faixa de 13 a 14 °C para o florescimento, de 22 °C (diurnas) e de 13 a 14 °C (noturnas) para a antese, de 18 a 20 °C para a fixação dos frutos, e de 24 a 28 °C para o amadurecimento (LOPES & STRIPARI, 1998). Acredita-se que a dissipação da energia térmica foi dificultada pela presença da cobertura plástica na casa de vegetação. As maiores temperaturas ocorreram quando as plantas estavam em fase reprodutiva, tornando-se necessário irrigá-las duas vezes ao dia, pela manhã e à tarde, a fim de minimizar o estresse das plantas. Durante o ensaio não se observou queda de frutos em maturação.

Apesar do alto coeficiente de variação para as variáveis número e porcentagem de flores abortadas detectou-se efeito significativo dos tratamentos sobre as mesmas (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise de variância para efeito de inoculação sobre número de flores abortadas e vingadas, e porcentagem de flores abortadas e vingadas. Seropédica, UFRRJ, 2011.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio				
		Número total flores			Porcentagem flores	
		Inoculadas	Abortadas	Vingadas	Abortadas	Vingadas
Tratamento	4	14,152 <sup>ns</sup>	12,803**	11,90 <sup>ns</sup>	532,79**	532,72**
Resíduo	45	14,817	3,845	15,91	156,36	156,36
CV		24,8	76,5	30,9	75,6	14,9

\*\*Significativo até 5% pelo teste F, <sup>ns</sup> não significativo.

O número total de flores inoculadas foi semelhante para todos os tratamentos, com pequenas variações devido às diferenças nos números originais de flores por cacho em cada planta. O número e a porcentagem de flores abortadas variaram em função dos tratamentos. Maior taxa de aborto foi observada nos tratamentos com *X. vesicatoria* a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>,  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e na testemunha com aplicação de solução salina apenas (Tabela 7). Menores taxas de aborto foram observadas nos tratamentos com *X. vesicatoria* à  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> e na testemunha apenas com ensacamento das inflorescências (Tabela 7). Este resultado não permite afirmar que a fitobactéria aumentou a taxa de aborto floral uma vez que os tratamentos contendo suspensão da fitobactéria não diferiram da testemunha apenas com o diluente, solução salina.

Este resultado pode estar relacionado ao curto período das avaliações, apenas 48 horas. O período de incubação de fitobactérias é influenciado pela densidade de inóculo e pelas condições de ambiente. Na literatura, o tempo de incubação da mancha-bacteriana em tomate, apresenta variação em função dos genótipos, das condições climáticas de cada estudo e das espécies de *Xanthomonas* estudadas. Por exemplo, períodos de 50 horas são citados por Cavalcanti et al. (2006), de seis a 11 dias por Valácia et al. (2005) e de cinco a oito dias por Araújo (2010). Kennedy (1969) observou em plântulas de soja inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* o desenvolvimento de sintomas de crestamento à 21 °C em dois dias após a inoculação com suspensão contendo  $1 \times 10^7$  UFC. mL<sup>-1</sup> e em oito dias após a inoculação com suspensão contendo  $6,3 \times 10^1$  UFC. mL<sup>-1</sup>. Gitaitis & Nilakhe (1983) inocularam folhas de feijão caupi com diferentes concentrações de suspensão de células de *X. axonopodis* pv. *vignicola* e observaram aumento do período de incubação de cinco para 20 dias quando a concentração variava de  $10^8$  para  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Tabela 7.** Efeito de tratamentos com diferentes concentrações de inóculo de *Xanthomonas vesicatoria* e testemunhas sobre o número de flores abortadas e vingadas, e porcentagem de flores abortadas e vingadas. Seropédica, UFRRJ, 2011.

Tratamento	Número flores*		Porcentagem flores	
	Abortadas	Vingadas	Abortadas	Vingadas
$10^6$ UFC.mL <sup>-1</sup> Xv+ ensacamento	4,15 a	11,6 a	26,9 a	73,0 b
Testemunha + ensacamento	2,90 ab	13,2 a	18,9 ab	81,0 ab
$10^8$ UFC.mL <sup>-1</sup> Xv+ ensacamento	2,82 ab	13,6 a	17,4 ab	82,5 ab
$10^4$ UFC.mL <sup>-1</sup> Xv+ ensacamento	1,60b	11,8 a	11,0 b	88,9 a
Ensacamento	1,34b	14,0 a	8,3 b	91,6 a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

\*Média de dez plantas.

No estudo das características morfológicas, pode-se observar que os frutos provenientes de cachos florais atomizados com solução salina e os que foram inoculados com suspensão de *X. vesicatoria* contendo  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> não diferiram entre si, apresentando os

maiores valores de massa fresca. O grande número de flores abortadas observadas nestes tratamentos (Tabela 7), certamente contribuiu para a alteração da relação fonte dreno das plantas, principalmente no tratamento com  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, em que o menor número de flores resultou no menor número de frutos por cacho e por conseguinte, produção de frutos com maior massa fresca. Estes tratamentos também se destacaram por apresentar frutos com maiores médias para diâmetro longitudinal, juntamente com o tratamento submetido ao ensacamento (Tabelas 8 e 9). Não foram detectadas diferenças significativas sobre o diâmetro equatorial dos frutos (Tabela 8).

As plantas que receberam inoculações com suspensões nas concentrações de  $10^8$  e de  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> deram origem a frutos com massa fresca e diâmetro longitudinal reduzidos, portanto menores e mais leves (Tabela 9). Estes resultados corroboram com os encontrados por Silva (2008), que ao utilizar uma densidade de inóculo de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *X. vesicatoria* sobre frutos de tomate, inoculados por infiltração no estágio verde, observou uma redução de tamanho dos frutos em cerca de 50%.

Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas quanto ao número ou porcentagem de sementes totais e vestigiais dos frutos (Tabela 10), diferentemente dos resultados encontrados por Silva (2008) em que frutos inoculados com *X. vesicatoria* apresentaram número de sementes reduzidos à metade daquele encontrado nos frutos não inoculados.

Não foram observados sintomas de mancha-bacteriana nos frutos ou qualquer órgãos das plantas.

Com relação ao amadurecimento dos frutos, nas colheitas iniciais os cachos apresentavam frutos de coloração vermelha uniforme, porém, no decorrer das colheitas os frutos passaram a apresentar maturação irregular. Provavelmente nestes cachos houve efeito direto das altas temperaturas, que em médias superiores a 28 °C são responsáveis pela redução da síntese de licopeno e com isso, os frutos apresentam-se amarelados (SILVA et al., 2006). Além disso, o ambiente quente e seco favoreceu a infestação de *Bemisia tabaci* (BROWN et al., 1995), que também promovem desordens fisiológicas nos frutos caracterizadas pelo amadurecimento irregular (LOURENÇÃO & NAGAI, 1994; HAJI et al., 1996).

**Tabela 8.** Análise de variância para efeito de diferentes concentrações de inóculo de *Xanthomonas vesicatoria* sobre as características de frutos de tomate cultivar Santa Clara Miss Brasil, produzidos em casa de vegetação. Seropédica, UFRRJ, 2011.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio						
		Massa fresca	Diâmetro		Número de sementes <sup>1</sup>		Número de sementes totais <sup>1</sup>	Porcentagem de sementes vestigiais <sup>1</sup>
			Equatorial	Longitudinal	Totais	Vestigiais		
Tratamento	4	2602,31*	77,82 <sup>ns</sup>	170,17*	1,68 <sup>ns</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	1,47 <sup>ns</sup>	0,65 <sup>ns</sup>
Resíduo	352	349,84	28,33	33,30	4,50	1,35	4,36	2,98
CV%		28	11	12	29	62	27	74

<sup>1</sup>Dados transformados para raiz(x+1).

\*Significativo até 5% pelo teste T, <sup>ns</sup> não significativo.

**Tabela 9.** Efeito de diferentes concentrações de inóculo de *Xanthomonas vesicatoria* sobre as características de frutos de tomate cultivar Santa Clara Miss Brasil, produzidos em casa de vegetação. Seropédica, UFRRJ, 2011.

Tratamento	Massa fresca	Diâmetro		Número de sementes		Número de sementes totais	Porcentagem de sementes vestigiais
		Equatorial	Longitudinal	Totais	Vestigiais		
10 <sup>8</sup> UFC.mL <sup>-1</sup> Xv+ ensacamento	59,58 b	47,06 a	45,86 b	52,87 a	4,15 a	57,03 a	8,15 a
10 <sup>6</sup> UFC.mL <sup>-1</sup> Xv+ ensacamento	67,81 ab	48,46 a	47,70 ab	56,01 a	4,05 a	60,07 a	7,58 a
Testemunha + ensacamento	73,16 a	48,78 a	50,05 a	53,41 a	3,77 a	57,18 a	7,05 a
10 <sup>4</sup> UFC.mL <sup>-1</sup> Xv+ ensacamento	61,28 b	46,46 a	47,37 b	57,18 a	3,66 a	60,84 a	7,13 a
Ensacamento	61,23 b	46,91 a	48,23 ab	57,85 a	3,64 a	61,50 a	6,89 a

\*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A mancha-bacteriana do tomateiro é favorecida por temperaturas entre 20 e 30 °C, enquanto ocorrem chuvas associadas a ventos fortes a doença torna-se mais severa (LOPES & ÁVILA, 2005). O predomínio de temperaturas altas e de baixa umidade relativa pode ter limitado o aparecimento dos sintomas da doença nas plantas em casa de vegetação, principalmente porque o período de molhamento foliar era baixo e descontinuado. Em estudos recentes, Marcuzzo et al. (2009) verificaram em condições controladas, que no intervalo de temperatura de 25 a 30°C, acompanhado de molhamento foliar contínuo por mais de 20 horas, a severidade da doença aumentava acentuadamente.

#### **4.5 Transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* de sementes para plântulas de tomate**

A emissão da radícula das sementes de todos os tratamentos iniciou-se às 48 horas após o semeio. A faixa ideal de temperatura para a germinação das sementes de tomateiro encontra-se entre 26 e 32°C (LOPES & STRIPARI, 1998), compatível com a temperatura utilizada neste ensaio. Prejuízos à germinação podem ocorrer a temperaturas superiores a 34°C (GEISENBERG & STEWART, 1986). Nos isolamentos realizados no tempo zero e aos dois e 14 DAS foi possível recuperar colônias características de *X. vesicatoria* em diversos tratamentos e fragmentos das plântulas (Tabela 10).

Observou-se efeito significativo de tratamento sobre a população da fitobactéria presente no tegumento, no tempo zero e aos dois dias após o semeio, e na folha cotiledonar um e dois e na soma das duas, aos 14 dias após semeio. Não houve efeito de tratamento sobre a população de *X. vesicatoria* incidente na radícula (Tabela 10).

Na primeira avaliação, zero DAS, observou-se nas sementes submetidas à assepsia seguido de inoculação à vácuo maior população da fitobactéria no tegumento que em todos os demais tratamentos que por sua vez não diferiram entre si ( $p < 0,001$ ) (Tabelas 10 e 11). Aos dois DAS, tanto o tratamento inoculado à vácuo, quanto o inoculado via atomização das flores e submetido a assepsia antes da montagem do teste não diferiram entre si, destacando-se frente aos demais pelas maiores médias de UFC por tegumento (Tabela 11).

Foram observados efeitos significativos dos tratamentos sobre a população de *X. vesicatoria* nas folhas cotiledonares aos 14 dias do semeio (Tabela 10). Elevada incidência de *X. vesicatoria* foi observada na folha cotiledonar que manteve o tegumento (folha um) no tratamento inoculado à vácuo, sendo este superior aos demais. Quando se considerou a estrutura livre do tegumento (folha dois), o tratamento inoculado à vácuo foi semelhante ao inoculado via flor sem assepsia prévia, no qual ambos apresentaram uma taxa de incidência de 20% da bactéria em seus tecidos (Tabela 12).

Observou-se diferenças quanto a população de *X. vesicatoria* nas folhas cotiledonares que conservavam ou não o tegumento aderido. A população da fitobactéria na folha que conservava o tegumento foi sempre superior à da segunda folha indicando que esta aderência favorece a passagem da fitobactéria do tegumento para as folhas cotiledonares. No presente trabalho, assim como no estudo desenvolvido por Silva (2008) foi observada alta população de *X. vesicatoria* incidindo no tegumento nas primeiras 48 horas após o início do processo de embebição das sementes (Tabela 12).

Bactérias constituem o grupo de microrganismos dominantes na filosfera (WHIPPS et al., 2008), onde exibem estratégias de sobrevivência a fim de superar as rápidas flutuações de ambiente ocorridas neste habitat, como a exposição direta a radiação solar, a baixa disponibilidade de água e outros fatores de estresse (BEATTIE & LINDOW, 1995). Além destas estratégias de sobrevivência, muitas bactérias fitopatogênicas apresentam ainda estratégias de evasão como a capacidade de se alojarem em sítios que lhes permitem maior proteção contra as condições adversas como sítios na região interna das folhas (BEATTIE & LINDOW, 1999).

O estabelecimento na superfície da folha ocorre em função de fatores do ambiente, da planta e dos microrganismos colonizadores. Para que as condições desfavoráveis nas folhas sejam minimizadas, alguns colonizadores foliares formam agregados de células bacterianas para o benefício da sua população (WHIPPS et al., 2008). Nestes locais, a produção de polissacarídeos extracelulares podem conferir proteção contra o estresse hídrico (MORRIS et al., 1997) e, analogamente aos biofilmes, proteger as células bacterianas da radiação UV, e dessecação. Podem, ainda, influenciar no controle do pH e das trocas gasosas na região e promover a intensificação da permuta de material genético entre os indivíduos da população (MORRIS et al., 2002; MORRIS & MONIER, 2003).

Dentro deste contexto, acredita-se que o tegumento da semente tenha um papel importante no processo de colonização das folhas cotiledonares e, conseqüentemente, da parte aérea da planta. Nesta estrutura onde a retenção da umidade é maior haveria um favorecimento do crescimento da população de *X vesicatoria* no ponto em que está aderido. Além disso, no momento da ruptura do tegumento para a emissão da folha cotiledonar, o tegumento pode causar ferimentos superficiais que facilitaria a penetração da bactéria e, por conseguinte a infecção e colonização da folha. Diversos estudos demonstram a ocorrência de bactérias de maneira localizada em sítios específicos da superfície foliar, como os pontos de inserção de tricomas e estômatos (BASHAN et al., 1982; MEW & VERA CRUZ, 1986; MANSVELT & HATTINGH, 1987; TIMMER et al., 1987; MARIANO & MCCARTER, 1993), as junções das células epidérmicas (LEBEN, 1969; BLAKEMAN et al., 1985; DAVIS & BRLANSKY, 1991;) e em ferimentos causados na nervura principal (MANSVELT & HATTINGH, 1987; LEBEN, 1988; MARIANO & MCCARTER, 1993).

**Tabela 10.** Análise de variância para efeito de tratamento sobre a população de *Xanthomonas vesicatoria* (UFC/órgão) em sementes de tomate e diferentes órgãos das plântulas aos zero, dois e 14 dias do semeio. Seropédica, UFRRJ, 2011.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio <sup>1</sup>		
		Tegumento		Radícula
		Tempo 0	2 dias	14 dias
Tratamento	3	0,8445***	0,4719*	0,0665 <sup>ns</sup>
Resíduo	56	0,1026	0,1913	0,0668
CV		28,3	38,0	25,0
		Folha cotiledonar aos 14 dias		
		Folha 1	Folha 2	Folha 1 e 2
Tratamento	3	1,8759***	3,0428*	5,5216**
Resíduo	56	0,2887	1,1767	1,6283
CV		44,7	80,0	50,2

<sup>1</sup>Dados transformados para Log (UFC+10); \*\*\* significativo p<0,0001; \*\* significativo a p<0,02; \* significativo a p<0,06, pelo Teste de Duncan.

**Tabela 11.** Efeito de tratamento sobre a população de *Xanthomonas vesicatoria* (UFC/órgão) em sementes de tomate e diferentes órgãos das plântulas aos zero, dois e 14 dias do semeio. Seropédica, UFRRJ, 2012.

Tratamento	Tegumento (UFC)		
	Tempo 0	2 dias	14 dias
Inoculação a vácuo	70,00 a	10,00 ab	-
Inoculação via flor + assepsia	1,33 b	239,33 a	-
Inoculação via flor e sem assepsia	0,00 b	0,00 b	-
Testemunha	0,00 b	0,00 b	-
	14 Dias (UFC)		
	Folha Cotiledonar 1	Folha Cotiledonar 2	Folha Cotiledonar 1 e 2
Inoculação a vácuo	533,33 a	400,00 ab	933,33 ab
Inoculação via flor + assepsia	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Inoculação via flor e sem assepsia	0,00 b	105933,33 a	105933,33 a
Testemunha	1,33 b	0,00 b	1,33 b

<sup>1</sup>Dados transformados para Log(UFC+10).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Nas condições de realização deste ensaio, as plântulas não apresentaram sintomas de mancha-bacteriana na radícula, hipocótilo ou folhas cotiledonares, mesmo no tratamento inoculado à vácuo com suspensão bacteriana de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, em que havia grande população inicial de *X. vesicatoria* (Tabela 12). Esta alta população inicial da fitobactéria em sementes inoculadas à vácuo já foi relatada em estudos realizados com sementes de tomate por Silva (2008). A ausência de sintomas da doença neste ensaio pode ter ocorrido em função do seu pequeno tempo de duração, apenas 14 dias, sendo este intervalo insuficiente para a expressão de sintomas característicos.

A incidência da fitobactéria no tegumento, logo após a inoculação, foi de 40% no tratamento com assepsia e inoculação à vácuo. Enquanto que às 48 horas do semeio, neste mesmo tratamento, observou-se uma redução da incidência a 13% (Tabela 12). Estes resultados estão de acordo com os de Silva (2008) que relata níveis máximos da bactéria no tegumento às 48 horas após o semeio e decréscimos a partir deste ponto. Por outro lado, no tratamento inoculado via flores mais assepsia houve incremento na população bacteriana no tegumento após 48 horas da inoculação e do semeio, sendo esta cerca de duas vezes maior que a população inicial detectada às zero horas. Apesar disso, ao final do teste, as plântulas geradas neste tratamento, não apresentavam a fitobactéria incidindo em nenhuma das folhas cotiledonares, nem mesmo naquelas em que o tegumento ficou aderido por alguns dias. Estes resultados sugerem possíveis falhas na metodologia utilizada que pode dever-se ao tamanho reduzido das amostras e, conseqüentemente, na probabilidade de detecção do patógeno e na sensibilidade do teste em detectar baixas populações da bactéria.

É possível notar que nas sementes inoculadas via atomização das flores e feito isolamentos com prévia assepsia das sementes foi possível detectar células bacterianas em 6,6% das amostras avaliadas no dia zero e em 20% às 48 horas. Este resultado permite deduzir que houve multiplicação bacteriana na fase de embebição até níveis detectáveis no isolamento ou que a inoculação via atomização das flores permitiu a infecção interna das sementes. Bactérias fitopatogênicas podem infectar flores, sementes e frutos em fases distintas de desenvolvimento e se alojarem interna ou externamente. Porém, quanto mais internamente estiverem as células bacterianas numa semente, maior a sua sobrevivência e dificuldade de erradicação (MENTEN & BUENO, 1987; ROMEIRO, 2005).

A recuperação da bactéria nos isolamentos do tegumento, no tratamento inoculado via

flor sem assepsia, pode ter sido influenciada tanto pelo período de armazenamento, quanto pela presença de contaminantes superficiais. Nestas amostras detectou-se intensa flora microbiana composta por *Bacillus* sp. e outras bactérias Gram negativas que interferiram negativamente nos isolamentos e recuperação de *X. vesicatoria*.

Pode-se afirmar que durante a condução do ensaio, *X. vesicatoria* colonizou epifiticamente a espermosfera e o filoplano das plântulas o que possibilitou tanto a sobrevivência quanto a multiplicação da bactéria, chegando a apresentar ao final de 14 dias até 40% de incidência nas sementes, apesar da ausência de sintomas característicos (Tabela 12). Para enriquecer este estudo, seria importante desenvolver um ensaio nas condições *in vivo*, para que se pudesse prolongar o período de avaliação até a completa formação das mudas, o que foi dificultado neste estudo, em virtude do crescimento muito rápido das plântulas no limitado espaço físico dos tubos de ensaio. A cultivar escolhida apresenta crescimento rápido e vigoroso o que limitou o seu cultivo *in vitro* nos tubos além de 14 dias.

**Tabela 12.** Efeito de tratamento sobre a incidência, expressa em porcentagem, de sementes de tomate e de diferentes órgãos das plântulas aos zero, dois e 14 dias do semeio infectadas por *Xanthomonas vesicatoria*. Seropédica, UFRRJ, 2011.

Tratamento	Tegumento (%)		
	0 dias	2 dias	14 dias
Assepsia + inoculação a vácuo	40,0	13,3	-
Inoculação via flor + assepsia	6,6	20,0	-
Inoculação via flor sem assepsia	0,0	0,0	-
Testemunha	0,0	0,0	-
	Folha Cotiledonar aos 14 dias (%)		
	Folha 1	Folha 2	Folha 1 e 2
Assepsia + Inoculação a vácuo	33,3	20,0	40,0
Inoculação via flor + assepsia	0,0	0,0	0,0
Inoculação via flor sem assepsia	0,0	20,0	20,0
Testemunha	6,6	0,0	6,6

## 5 CONCLUSÕES

- 1) O meio de cultura Ágar-Água suplementado com macro e micronutrientes permitiu maior recuperação de *X. vesicatoria* aos cinco e 14 dias da semeadura.
- 2) A solução salina promoveu aborto floral comparado ao tratamento testemunha (apenas ensacamento) e dificultou a avaliação do efeito da bactéria. Porém uma tendência para maior taxa de aborto foi observada nos cachos inoculados com *X. vesicatoria* contendo  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>.
- 3) A inoculação dos cachos florais com suspensão de células de *X. vesicatoria* igual a  $10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup> afetou o desenvolvimento dos frutos.
- 4) A inoculação dos cachos florais com suspensão de células de *X. vesicatoria* não afetou o diâmetro equatorial nem o número de sementes totais e vestigiais.
- 5) A transmissão de *X. vesicatoria* pode ocorrer via infecção das flores sem que as plantas e frutos expressem sintomas.
- 6) Sementes infectadas por *X. vesicatoria* não resultaram em plântulas infectadas em até 14 dias após o semeio.
- 7) A rápida multiplicação de *X. vesicatoria* no tegumento durante a embebição e a sua adesão à folha cotiledonar favorece a transmissão da bactéria das sementes para as plântulas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004, 400p.
- ARAÚJO, J. S. P. **Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera* L.) no Brasil**. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2001.
- ARAÚJO, E. R. **Competitividade entre espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Brasília: Universidade de Brasília, 2010.
- BAKER, K. F. Seed Pathology. In: Kozlowski, T.T. (Ed.) **Seed Biology**. New York: Academic Press, 1972. p. 317-416.
- 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**, n.11, p. 187-193, 1983.
- BASHAN, Y., DIAB, S. & OKON, Y. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper seeds and roots in symptom less and dry leaves in non-host plants in the soil. **Plant Soil**, v.68, p.161-170, 1982.
- BATISTA, A. C. **Principais doenças de plantas cultivadas no Nordeste**. Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de Pernambuco, n. 14, p. 5-46, 1947.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 145-172, 1995.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v. 89, p. 353-359, 1999.
- BLAKEMAN, J. P. Ecological succession of leaf surface microorganisms relation to biological control. In: WINDELS, C. E. & LINDOW, S. E. **Biological Control on the Phylloplane**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985, p. 6-30,
- BROWN, J. K.; FROHLICH, D. R.; ROSELL, R. C. The sweet potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. **Annual Review Entomology**, v. 40, p. 511-534, 1995.
- CARMO, M. G. F., KIMURA, O., MAFFIA, L. A.; CARVALHO, A. O. C. Progresso da pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em condições de viveiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 66-70, 1996.

CARMO, M. G. F.; CORREA, F. M.; CORDEIRO, E. S.; CARVALHO, A. O.; ROSSETTO, C. A. V. Tratamentos de erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* e efeitos sobre a qualidade das sementes de tomate. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.579-584, 2004.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; ZACARONI, A. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; COSTA, J. C. B.; SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 372-380, 2006.

CORREA, F. M.; CARVALHO, A. O.; CARMO, M. G. F. Inoculação e sobrevivência de sementes de tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.1, p.71-75, 2008.

DAVIS, C. L. & BRLANSKY, R. H. Use of immunogold labeling with scanning electron microscopy to identify phytopathogenic bacteria on leaf surfaces. **Applied Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3052-3055, 1991.

DOIDGE, E. M. A. Tomato canker. **Journal of Department of Agriculture of Union South Africa**, Oxford, v.1, p.718-721, 1920.

FAHY, P. C. & HAYWARD, A. C. Media and methods for isolation and diagnostic test. In: FAHY, P. C.; PERSLEY, G. J. **Plant bacterial diseases: a diagnostic guide**. Sidney: Academic Press, v.16, p.337-338, 1983.

FEITOSA, F. A. A. & CRUZ, G. F. **Controle de Pragas e Doenças de Flores e Hortaliças**. In: 10ª Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria. Fortaleza: Instituto Frutal, 2003, 222p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3 ed -Viçosa: UFV, 2007, 421p.

GARDNER, M. W., KENDRICK, J. B. Bacterial spot of tomato. **Journal of Agriculture**, v. 21, p. 123-156, 1921.

GARDNER, M. W., KENDRICK, J. B. Bacterial spot of tomato and pepper. **Phytopathology**, v. 13, p. 307-315, 1923.

GEISENBERG, C. & STEWART, K. Field crop management. In: ATHERTON, J. C. & RUDICH, J. **The tomato crop - A scientific basis for improvement**. London: Chapman and Hall, p 511-557, 1986.

GITAITIS, R. D. & NILAKHE, S. S. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola* in southern pea seed. **Plant Disease**, v. 66, p.20-22, 1983.

GITAITIS, R. & WALCOTT, R. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 371-397, 2007.

HAJI, F. N. P.; ALENCAR, J. A. de; LIMA, M. F. Mosca-branca: danos, importância econômica e medidas de controle. Petrolina, PE: EMBRAPA-CPATSA, 1996, 9p. (EMBRAPA-CPATSA. Documentos; 83).

HALFELD-VIEIRA, B. A. & NECHET, K. L. **Mancha-bacteriana do maracujá: sintomas, danos e medidas de controle**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2006, 4p. (Comunicado técnico, 03).

HAMZA, A. A.; I. ROBENE-SOUSTRADEA, I.; JOUENA, E.; LEFEUVREA, P.; CHIROLEUA, F. FISHER-LE SAUXB, M.; GAGNEVINA, L.; PRUVOSTA, O. MultiLocus Sequence Analysis- and Amplified Fragment Length Polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, n.3, p. 183-190, 2012.

HOAGLAND, D. R. & ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular 347. **Agricultural Experiment Station, University of California**, Berkeley, CA, 1950, 32 p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>, acessado em 02/02/2012.

JONES, J. B.; STALL, R. E.; BOUZAR, H. Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 41-58, 1998.

JONES, J. B.; LACY, B. H.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p.755–62, 2004.

JUNQUEIRA, N. T. V. & JUNQUEIRA, K. P. Manejo das principais doenças do maracujazeiro. In: SUSSEL, A. A. B.; MEDEIROS, F. H. V.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; UCHOA, C. N.; AMARAL, D. R.; MEDEIROS, F. C. L.; PEREIRA, R. B.; SANTOS, J.; LIMA, L. M.; ROSWALKA, L. C. **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Lavras: UFLA, 2007.

KAVITHA, R. & UMESHA, S. Prevalence of bacterial spot in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. **Crop Protection**, n. 26, p. 991-997, 2007.

KENNEDY, B. W. Detection and distribution of *Pseudomonas glycinea* in soybean. **Phytopathology**, v. 59, p. 1618–1619, 1969.

KIMURA, O.; STRALIOTTO, R.; SUDO, A.; MURANAGA, M. Eficiência de transmissão de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão. **Fitopatologia Brasileira**, n. 14, p. 126, 1989.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.

A. M. **Manual de fitopatologia vol II: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. 705 p. 1997.

LEBEN, C. Colonization of soybean buds by bacteria: Observations with the scanning electron microscope. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 15, p. 319-320, 1969.

LEBEN, C. Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants. **Phytopathology**, v. 78, p.179-185, 1988.

LIMA, M. F. & FERREIRA, M. A. S. V. Infecção latente em porta enxerto de videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* no Submédio do Vale do São Francisco em 1999. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.127, 2000.

LOPES, C. A.; ÁVILA, C. A. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005, 151p.

LOPES, C. A. & QUEZADO-SOARES, A. M. Doenças causadas por bactérias em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: UFV, v.2,p.754-784, 2000.

LOPES, M. C.; STRIPARI, P. C. A cultura do tomateiro. In: GOTP, R.; TIVELLI, S.W. (Ed.). **Produção de hortaliças em ambiente protegido**. São Paulo: UNESP, 1998, 319p.

LOURENÇÃO, A. L.& NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas. v. 53, n.1, p. 53–59, 1994.

LOUWS, F. J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; JONES, J. B.; SHOEMAKER, P. B.; SAHIN, F.; MILLER, S. A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, v.85, p.481-488, 2001.

MACHADO, J. C. Patologia de sementes: Significado e atribuições. In: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes. Ciência, Tecnologia e Produção**. 4ª Ed, Jaboticabal: Funep, v. 1,2000, 588 p.

MACHADO, J. C. Patologia de sementes e sustentabilidade do sistema agrícola no brasil. **Fitopatologia Brasileira**, 31(Suplemento), agosto 2006, 409 p.

MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; BERIAM, L. O. S.; RODRIGUES NETO, J. Podridão do fruto, novo sintoma relacionado à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Arquivos do Instituto Biológico**, Campinas, v. 68, n.2, p.121-123, jul-dez,2001.

MANSVELT, E. L. & HATTINGH, M. J. Scanning electron microscopy of colonization of pear leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, p. 2517-2522, 1987.

MARCUZZO, L. L.; FERNANDES, J. M. C; BECKER, W. F. Influência da temperatura e da duração do molhamento foliar na severidade da mancha bacteriana do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.229-230, 2009.

- MARIANO, R. L. R. & MCCARTER, S. M. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. **Microbiology Ecology**, v. 26, p.47-58, 1993.
- MARIANO, R. L. R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife, UFRPE. 2000. 171p.
- MARINGONI, A. C. & KUROZAWA, C. Erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 2, p. 191-194, 1994.
- MARINGONI, A. C. **Técnicas em fitobacteriologia**. 1 ed. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Vegetais, 2010, 70 p.
- MCGUIRE, R. G.; JONES, J. B.; SCOTT, J. W. Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato cultivars resistant and susceptible to bacterial spot. **Plant Disease**, v. 75, p. 606-609, 1991.
- MENTEN, J. O. M. & BUENO, J. T. Transmissão de patógenos por sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. ed. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, p.164-91, 1987.
- MEW, T. W. & VERA CRUZ, C. M. Epiphytic colonization of host and non-host plants by phytopathogenic bacteria. In: FOKKEMA, N. J. & VAN DEN HEUVEL. **Microbiology of the Phyllosphere**, New York: Cambridge University Press, 1986. p.269-282
- MORRIS, C. E.; MONIER, J. M.; JACQUES, M.A. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganisms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1570–1576, 1997.
- MORRIS, C.E.; BARNES, M.B.; MCLEAN, R.C.J. Biofilms on leaf surfaces: implications for the biology, ecology and management of populations of epiphytic bacteria. In: LINDOW, S.E., HECHT-POINAR, E.I. & ELLIOTT, V.J. **Phyllosphere Microbiology**. St Paul, USA: APS Press, 2002. p. 139–155.
- MORRIS, C. E. & MONIER, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v. 41, p. 429–453, 2003.
- NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. v. 1, London, The MacMillan Press, 1979 p.
- NASCIMENTO, A. R. P. **Cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) da videira (*Vitis* spp.): Métodos de preservação e crescimento de isolados, escala diagramática e reação de variedades de videira à doença**. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005.
- PEREIRA, R. C. **Ocorrência, identificação e caracterização das espécies de *Xanthomonas*, causadoras de mancha bacteriana em tomate para mesa no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Brasília: Universidade de Brasília, 2010.

QUEZADO-DUVAL, A. M., LEITE, R. P., JR., TRUFFI, D.; CAMARGO, L. E. A. Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil. **Plant Disease**, v. 88, p.157-161, 2004.

QUEZADO-DUVAL, A. M. Mancha-bacteriana do tomateiro e de *Capsicum* spp. **Fitopatologia Brasileira**, 31 (Suplemento), 2006, 409 p.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; NETO GUIMARÃES, C. M. & SILVA, C. S. Tigueras: uma fonte de inóculo inicial da mancha bacteriana em tomate para processamento industrial. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento). Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008, 13 p.

ROBBS, C. F. Doenças causadas por bactéria. **Informe Agropecuário**, n. 11, p. 45-50, 1985.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2 ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005, 417p.

SAEG. Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3.ed. St. Paul: The American Phytopathology Society, 2001. 373p.

SILVA, A. M. S.; CARMO, M. G. F.; OLIVARES, F. O.; PEREIRA, A. J. Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoriae* efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 6, p.587-593, 2002.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B.; FURUMOTO, O.; BOITEUX, L. S.; FRANÇA, F. H.; VILLAS BÔAS, G. L.; BRANCO, M. C.; MEDEIROS, M. A.; MAROUELLI, W.; CARVALHO E SILVA, W. L.; LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C.; NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, P. Embrapa Hortaliças **Sistemas de Produção**, 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>, acessado em 01/03/2012.

SILVA, D. A. G. Mecanismos de transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Tese (Doutorado em Fitotecnia). Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

STALL, R. E.; JONES, J. B. & MINSAVAGE, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to *xanthomonads* causing bacterial spot. **Annual Review Phytopathology**, v. 47, p.265–284, 2009.

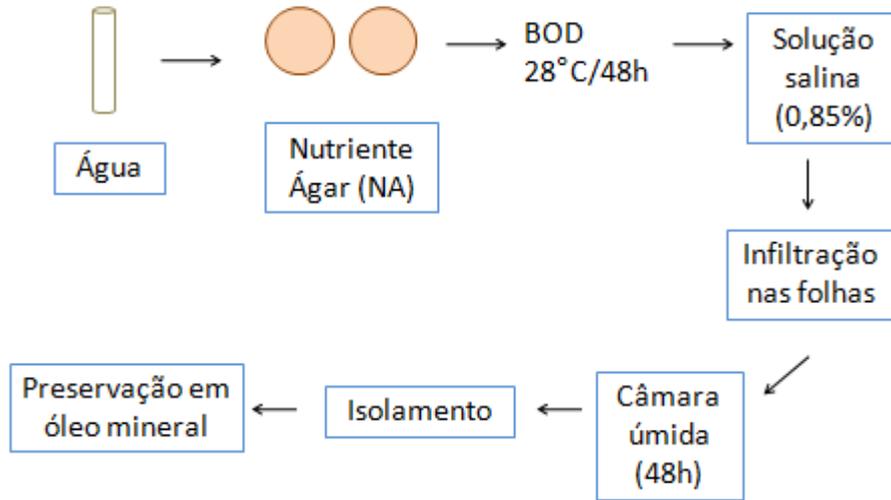
TIMMER, L. W.; MAROIS, J. J; ACHOR, D. Growth and survival of xanthomonads under conditions non-conductive to disease development. **Phytopathology**, v. 77, p.1341–1345, 1987.

VALÁCIA, L. S. L.; LOPES, C. A.; GIORDANO, L. B. Componentes da resistência à mancha-bacteriana e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria*, raça T2, em genótipos de tomateiro. **Fitopatologia Bbrasileira**, v.30, n.1, 2005.

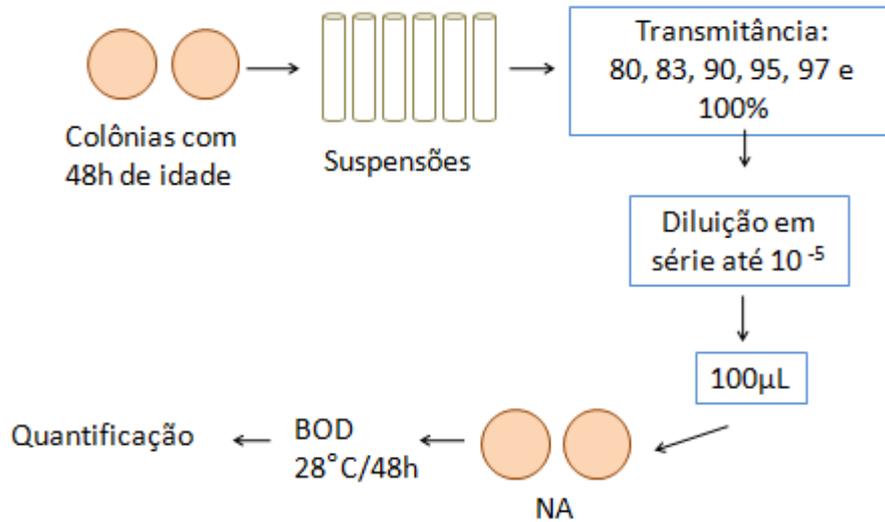
WHIPPS, J. M, HAND, P.;PINK, D.; BENDING, G. D. (GARY D.) Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p.1744-1755, 2008.

## ANEXOS

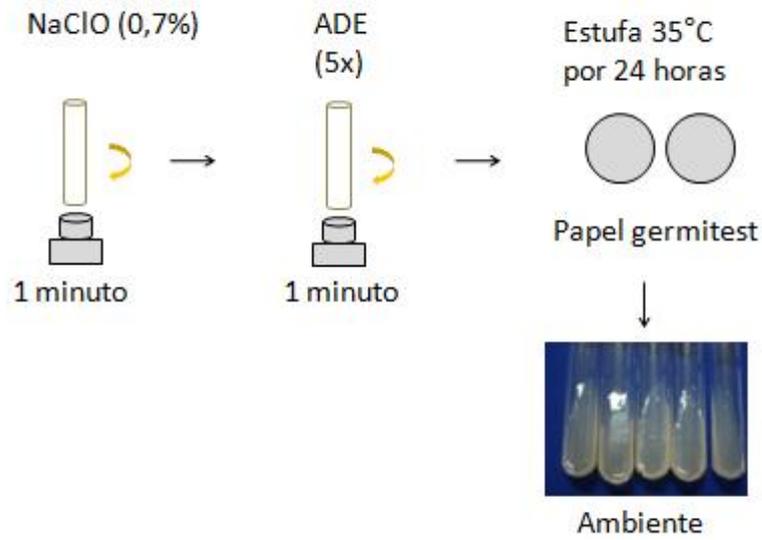
### A. Seleção do isolado bacteriano por testes biológicos.



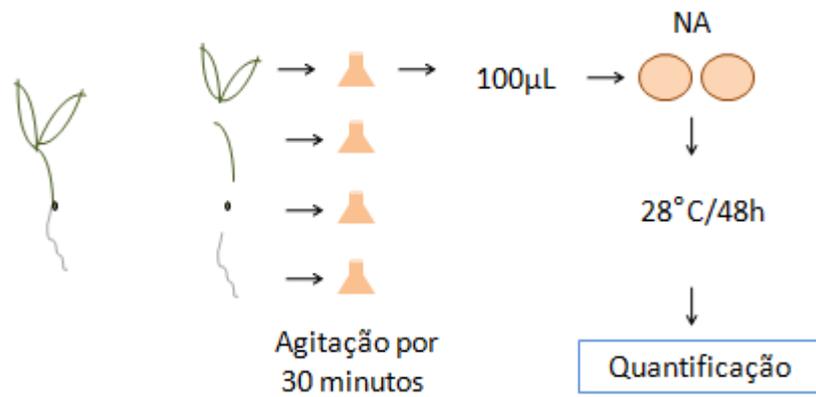
### B. Calibração da suspensão de inóculo.



C. Assepsia das sementes - etapa preliminar.



D. Isolamentos indiretos.



E. Assepsia das sementes – ensaio *in vitro*.

