

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

**TESE**

**Mecanismos de transmissão de *Xanthomonas*  
*vesicatoria* (Dodge) Dye em tomateiro (*Lycopersicon*  
*esculentum* Mill.)**

**Débora Alves Gonzaga da Silva**

**2008**



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

**MECANISMOS DE TRANSMISSÃO DE *Xanthomonas vesicatoria*  
(DODGE) DYE EM TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

**DÉBORA ALVES GONZAGA DA SILVA**

*Sob a orientação da professora*  
**Margarida Goréte Ferreira do Carmo**

*e Co-orientação dos professores*  
**Fábio Lopes Olivares**  
**Aldir de Oliveira de Carvalho**

Tese submetida como requisito parcial para  
obtenção do grau de **Doutor em Ciências**,  
no curso de Pós-graduação em Fitotecnia,  
Área de Concentração em Fitossanidade.

**Seropédica, RJ**  
**Setembro de 2008**

635.642

S586p

T

Gonzaga da Silva, Débora Alves,  
1976-

Mecanismos de transmissão de  
*Xanthomonas vesicatoria* (Dodge) Dye  
em tomateiro (*Lycopersicon  
esculentum* Mill) / Débora Alves  
Gonzaga - 2008.

121 f. : il.

Orientador: Margarida Goréte  
Ferreira do Carmo.

Tese (doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Curso de Pós-Graduação em  
Fitotecnia.

Inclui bibliografia

1. Tomate - Doenças e pragas -  
Teses. 2. *Xanthomonas* - Teses. 3.  
Sementes - Doenças e pragas -  
Teses. I. Carmo, Margarida Goréte  
Ferreira do. II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Curso de Pós-Graduação em  
Fitotecnia. III. Título.

**Bibliotecário:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

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

**DÉBORA ALVES GONZAGA DA SILVA**

Tese submetida com requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Fitossanidade.

TESE APROVADA EM 26/09/2008

---

Margarida Goréte Ferreira do Carmo, (Dr<sup>a</sup>.) UFRRJ/IA/Dep. Fitotecnia  
(Orientadora)

---

Joecildo Francisco Rocha (Dr.), UFRRJ/IB/Dep. Botânica

---

Leonardo de Oliveira Médici, (Dr.) UFRRJ/IB/Dep. Biológicas

---

José Rogério de Oliveira (Dr.), UFV/Dep. Fitopatologia

---

Ricardo Magela de Souza (Dr.) UFLA/Dep. Fitopatologia

*Dedico esta tese  
A Deus,  
Aos meus dois filhos  
Mariana Alves Gonzaga da Silva Oliveira e  
José Maurício Alves Gonzaga Ballesteiro Pereira  
Aos meus pais  
Antonio Gonzaga da Silva e Ivone Alves Gonzaga da Silva  
A minha querida irmã,  
Renata Alves Gonzaga da Silva  
A minha avó,  
Zenith da Silva do Carmo  
As minhas tias  
Esmeralda Gonzaga da Silva e Therezinha Gonzaga da Silva  
Ao meu tio  
José Alves do Carmo Sobrinho  
E ao meu grande amor,  
Maurício Ballesteiro Pereira.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por eu ter conseguido realizar este trabalho, pois “Bem aventurado o homem que põe no Senhor a sua confiança...” (Salmo 40: 4)

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por mais uma vez me conceder um título.

Ao curso de Pós-Graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por ter permitido a utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

À empresa Agristar do Brasil por ter fornecido as sementes de tomate.

A minha orientadora e amiga Dra. Margarida Goréte Ferreira do Carmo, pela confiança depositada, pelos ensinamentos e orientações prestados durante o curso e por todos os conselhos sobre a vida rotineira.

Ao meu companheiro Maurício Ballesteiro Pereira, pela motivação nos momentos difíceis, pela paciência nas horas de estresse, pela cumplicidade, por compartilhar tristezas e alegrias durante o curso e cuidar das crianças durante minha ausência. Enfim, por toda ajuda desprendida durante a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Aldir de Oliveira de Carvalho, meu padrinho, pela amizade e por todos os ensinamentos ao longo de minha trajetória.

Ao meu co-orientador Fábio Lopes Olivares, pelos ensinamentos sobre microscopia, sugestões de trabalho e empenho durante as observações em microscópio eletrônico de varredura.

Aos membros da Banca Examinadora: Dr. Joecildo Francisco Rocha, Dr. Leonardo de Oliveira Médici, Dr. José Rogério de Oliveira e Dr. Ricardo Magela de Souza.

Aos todos os professores do curso de Pós-graduação do curso de Fitotecnia que participaram de minha formação como pesquisadora.

Ao professor Manlio Silvestre Fernandes, por ter cedido à câmara de crescimento.

Às funcionárias da secretaria do curso de Pós-graduação em Fitotecnia Ellen Borges da Rocha e Tatiane Dantas Garcez pela presteza e gentileza ao longo do curso.

Às funcionárias do Laboratório de Preparo de amostras da UENF, Giovana Alves de Moraes e Beatriz Ferreira Ribeiro, por terem me recebido tão bem e pelo auxílio prestado durante o preparo das amostras para microscopia.

À Bolsista Jerusa Maia Sá, por toda ajuda desprendida durante a execução dos experimentos.

Aos meus queridos amigos e bolsistas Leysimar Ribeiro Pitzr Guimarães e Vinicius Gomes da Silva Vasconcelos, por todo empenho durante a execução dos trabalhos.

Aos estagiários: Guilherme, Cristiana, Luciene, Jéssica, Èrica, Jerfeson, Leandro e João Paulo, pela ajuda durante a execução dos experimentos.

À minha colega de curso Mariluci Sudo Marteletto, pela amizade e ajuda durante o curso.

À amiga Marinete Bezerra Rodrigues, pelo incentivo durante o curso.

À professora Ana Lúcia Cunha Dornelles, pela paciência em me agüentar em sua sala todos os dias.

Ao meu amigo e professor Dr. João Sebastião de Paula Araújo, pela ajuda ao longo do curso.

Às minhas amigas Daniela Cunha Magalhães, Mariana Coelho, Leonarda Martins de Souza e Eliene Marins de Souza e Aline Porto pela torcida por mais uma vitória em minha vida.

Aos amigos Simone da Costa Minervini e Paulo Zatorre, pela amizade e por terem cedido os tubetes para o plantio das mudas de tomate.

À minha cunhada Margarete Ballesteiro Pereira Portela pela ajuda durante o curso.

À minha sobrinha Nathalia Ballesteiro Pereira Mota e a minha cunhada Márcia Ballesteiro Pereira Mota por me ajudar a corrigir os abstracts.

Aos meus amados filhos Mariana Alves Gonzaga da Silva Oliveira e José Maurício Alves Gonzaga Ballesteiro Pereira pela compreensão durante o período de execução dos trabalhos e redação da tese. Desculpem-me, por não ter dado a vocês atenção que vocês precisavam. Vocês alegram a minha vida!

À minha mãe Ivone Alves Gonzaga da Silva por ter me gerado, educado, orado com bastante fé para tudo dar certo e por ter ajudado a tomar conta das crianças enquanto estive ausente.

Ao meu pai, Antonio Gonzaga da Silva, por estar sempre presente, me incentivando em todas as ocasiões.

À minha irmã, Renata Alves Gonzaga da Silva, pelo apoio e por me ajudar a cuidar das crianças.

Às minhas queridas e amadas tias Esmeralda Gonzaga da Silva e Therezinha Gonzaga da Silva por todo incentivo e motivação ao longo de toda minha vida.

À minha avó Zenith por estar sempre alegre, transmitindo pensamentos positivos e por financiar meu Notebook, tão importante para finalização deste trabalho.

Às amigas, Ana Helena Lima Correia e Fátima Nascimento da Silva, pelo carinho e dedicação com toda a minha família.

À toda minha família.

A todos os meus amigos não citados, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

## BIOGRAFIA

Débora Alves Gonzaga da Silva, filha de Antonio Gonzaga da Silva e Ivone Alves Gonzaga da Silva, nasceu na cidade de São Paulo no dia 12 de março de 1976. Em março de 1995, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica na UFRRJ, concluindo-o em dezembro de 1999. Durante a graduação, iniciou estudos na área de Fitopatologia como estagiária e posteriormente bolsista de iniciação científica (CNPq), bolsista do convênio UFRRJ/Ministério da Agricultura e monitora da disciplina Fitopatologia Geral. Em maio de 2000 participou do programa de Residência Agrônômica no Serviço de Vigilância Agropecuária (VIGIAGRO) do Ministério da Agricultura no Porto do Rio de Janeiro. Em março de 2002 iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia (UFRRJ) desenvolvendo a dissertação intitulada “Dinâmica Populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e da flora microbiana residente em plantas de pimentão submetidas a pulverizações com agroquímicos e biofertilizante Agrobio”, sob orientação da professora Dra. Margarida Goréte Ferreira do Carmo. Em Agosto de 2004, iniciou o curso de Doutorado em Fitotecnia sob orientação da professora Dra. Margarida Goréte Ferreira do Carmo e Co-orientação dos professores Dr. Aldir de Oliveira de Carvalho (UFRRJ) e Dr. Fábio Lopes Olivares (UENF).

## RESUMO GERAL

SILVA, Débora Alves Gonzaga da. **Mecanismos de transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* (Dodge) Dye em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Seropédica, RJ. 124p. 2008. Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

Com o objetivo de se avançar no estudo epidemiológico da mancha-bacteriana do tomateiro, foram avaliados os mecanismos de transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* da planta para a semente e da semente para a planta. Foram feitos, ainda, estudos da morfologia da semente e partes da plântula ou muda (tegumento, radícula, hipocótilo e folhas cotiledonares e definitivas), através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura. A transmissão de *X. vesicatoria* da planta para a semente foi avaliada a partir de isolamentos diretos e indiretos de partes de frutos maduros (mesocarpo, placenta, líquido placentário, água proveniente da primeira lavagem das sementes, sementes inteiras e sementes trituradas) em meio de cultura Nutriente Agar (NA). Os frutos foram obtidos em parcelas experimentais, conduzidas no setor de Horticultura da UFRRJ, e inoculados com a fitobactéria por diferentes métodos (atomização e injeção) combinados com diferentes regiões de inoculação (cacho floral, mesocarpo e placenta), durante as fases de desenvolvimento da planta (flor, frutos verdes, frutos de vez e frutos maduros). A transmissão da fitobactéria das sementes para as plântulas e mudas foi avaliada por isolamentos em meio NA a partir de partes da plântula ou muda (raiz, tegumento, hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas), germinadas em diferentes substratos (papel germitest, areia e substrato comercial para mudas). A morfologia das sementes e partes das plântulas foi caracterizada por meio de observações em microscópio eletrônico de varredura utilizando-se amostras de sementes frescas (extraídas de frutos inoculados), de partes de plântulas ou mudas (raiz, hipocótilo, folha cotiledonar e folha definitiva) e de sementes inoculadas pelo procedimento a vácuo aos 7, 14 e 21 dias após a semeadura. Os tratamentos aplicados aos frutos verdes (inoculação por atomização, injeção na placenta e injeção no mesocarpo) foram mais eficientes no processo de transmissão da fitobactéria que os tratamentos aplicados aos frutos de vez e maduros. Observou-se, ainda, que *X. vesicatoria* coloniza o tegumento e todas as partes das plântulas e mudas durante o processo de germinação e emergência. O tegumento da semente foi caracterizado por um emaranhado de tricomas, com a base em forma de anel e cavidade, que podem servir como sítios protetores para patógenos inclusive *X. vesicatoria*. O processo de colonização das sementes de tomate por *X. vesicatoria* se caracteriza pela formação de biofilmes e fibrilas. Foram observados em radículas, de plântulas com sete dias de idade, e em raízes primárias, oriundas das radículas de mudas com 20 dias de idade, a presença de estômatos colonizados por *X. vesicatoria*. Sobre o hipocótilo, foram observadas poucas células de *X. vesicatoria*. Em várias amostras de sementes foi detectada a presença de bactérias endofíticas, que formavam agregados com características de crescimento agressivo, identificadas como *Acinetobacter* sp. Esta mesma bactéria foi detectada em vários testes de germinação e isolamento interferindo negativamente no desenvolvimento e recuperação de *X. vesicatoria* nos testes *in vitro*.

**Palavras-chave:** Tomate, mancha bacteriana, patologia de sementes, transmissão, *Acinetobacter*, biofilme, microscopia eletrônica.

## ABSTRACT

SILVA, Débora Alves Gonzaga da. **Mechanisms of transmission of *Xanthomonas vesicatoria* (Dodge) Dye in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)**. Seropédica, RJ. 124 pages 2008. Agronomy Institute, Fitotecnia Department, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

In the objective of advancing the epidemiologic study of the bacterial stain of the tomato, the mechanisms of transmission of *Xanthomonas vesicatoria* from the plant to the seed and from the seed to the plant have been evaluated. The morphology of seeds and of parts of the seedlings or saplings (tegument, radicles, hypocotyl and cotyledon leaves, and definitive leaves) have also been studied by means of electronic scanning microscopy techniques. The transmission of *X. vesicatoria* from the plant to the seed has been evaluated upon direct and indirect isolation of parts of ripe fruit (flesh, placenta, placental liquid, water from the first washing of the seeds, entire seeds and ground seeds) in a culture of Agar Nutrient (AN). The fruit were obtained in experimental parcels, conducted at the Horticultural sector of UFRRJ, and inoculated with the phyto bacteria through different methods (atomization and injection) combined with different regions of inoculation (flower cluster, flesh, and placenta), during the plant's developing phases (flower, unripened fruit, firm ripe and ripe fruit). The transmission of the phyto bacteria from the seeds to the seedlings and saplings was assessed by means of isolating in an AN medium parts of the seedling or sapling (root, tegument, radicles, hypocotyl and cotyledon leaves, and definitive leaves), germinated in different substrata ("germitest" paper, sand, and commercialized substrate for saplings). The morphology of seeds and parts of the seedlings was characterized through observations in electron microscope scanning by using samples of fresh seeds (extracted from inoculated fruit), of parts of seedlings or saplings (tegument, radicles, hypocotyl and cotyledon leaves, and definitive leaves) and of seeds inoculated by vacuum procedure at 7, 14, and 21 days after sowing. The treatments applied to the unripened fruit (inoculation by atomization, injection in the placenta and injection in the flesh) were more efficient in the process of transmitting the phyto bacteria than the treatment applied to the firm ripe and ripe fruit. It was also observed that the *X vesicatoria* colonizes the tegument and every part of the seedlings and saplings during the process of germination and emergence. The seed tegument was characterized by an entanglement of trichomes, with a base in the shape of ring and cavity, which may serve as sheltering sites for pathogens, including the *X vesicatoria*. The process of colonization of tomato seeds by *X vesicatoria* characterizes itself by the formation of biofilms and fibrils. The presence of stomata colonized by *X vesicatoria* has been observed in radicles, of seven day old seedlings, and in primary roots originated from the radicles of 20 day old saplings. Few cells of *X vesicatoria* have been observed on the hypocotyl. The presence of endophytic bacteria forming aggregates with characteristics of an aggressive growth identified as *Acinetobacter* sp. was detected in many samples of seeds. These same bacteria were detected in many tests of germination and isolation, interfering negatively in the development and recuperation of *X vesicatoria* in the *in vitro* tests.

**Key-words:** tomato, bacterial stain, seed pathology, transmission, *Acinetobacter*, biofilm, electron microscopy.

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

Xv -	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
MEV -	Microscopia Eletrônica de Varredura
NA -	Nutriente Agar
UFRRJ -	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UFC -	Unidade Formadora de Colônia
Test. vácuo -	Testemunha correspondente a inoculação a vácuo
FAA -	Flor Aberta Inoculada por Atomização
FVAE -	Fruto Verde inoculado por Atomização na Epiderme
FVIP -	Fruto Verde inoculado por Infiltração na Placenta
FVIM -	Fruto Verde inoculado por Infiltração no Mesocarpo
FDAE -	Fruto “De vez” inoculado por Atomização na Epiderme
FDIP -	Fruto “De vez” inoculado por Infiltração na Placenta
FDIM -	Fruto “De vez” inoculado por Infiltração no Mesocarpo
FMAE -	Fruto Maduro inoculado por Atomização na Epiderme
FMIP -	Fruto Maduro inoculado por Infiltração na Placenta
FMIM -	Fruto Maduro inoculado por Infiltração no Mesocarpo
LP -	Líquido Placentário
APPLS -	Água Proveniente da Primeira Lavagem das Sementes
SI -	Sementes inteiras
ST -	Sementes trituradas

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 A Mancha Bacteriana do Tomateiro	03
2.2 Transmissão de Fitobactérias por Sementes	04
2.3 Morfologia da Semente de Tomateiro e Interações entre Bactérias e Sementes	05
2.4 A Importância das Técnicas de Microscopia Utilizadas no Estudo das Interações de Bactérias com Órgãos de Planta	07
2.5 Biofilme como Mecanismo de Sobrevivência de Bactérias	09
2.6 Bactérias Endofíticas e o Controle de Fitopatógenos	11
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
3 CAPÍTULO I: Mecanismos de transmissão de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> da planta de tomate para as sementes	20
3.1 RESUMO	21
3.2 ABSTRACT	22
3.3 INTRODUÇÃO	24
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.4.1 Experimento um: Seleção do estágio fenológico	27
3.4.2 Experimento dois: Seleção do método e da região de inoculação	29
3.4.3 Experimento três: Determinação da taxa de infecção das sementes e das alterações morfológicas dos frutos	31
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.5.1 Seleção do isolado de <i>X. vesicatoria</i>	32
3.5.2 Experimento um: Seleção da fase fenológica do tomateiro	32
3.5.3 Experimento dois: Seleção do método e da região de inoculação mais eficiente na recuperação de <i>X. vesicatoria</i> aplicada em frutos verdes e flor aberta.	37
3.5.4 Experimento três: Determinação de taxa de infecção das sementes e das alterações morfológicas dos frutos	39
3.6 CONCLUSÕES	45
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
4 CAPÍTULO II: Transmissão de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> da semente para planta de tomate	49
4.1 RESUMO	50
4.2 ABSTRACT	51
4.3 INTRODUÇÃO	52
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.4.1 Experimento um: Inoculação a vácuo e por imersão	54
4.4.2 Experimento dois: Transmissão de <i>X. vesicatoria</i> de sementes inoculadas a vácuo para as plântulas	55
4.4.3 Experimento três: Inoculação de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> em sementes por meio de injeção na região da placenta de frutos verdes	56
4.4.4 Experimento quatro: Estudo da transmissão de <i>X. vesicatoria</i> em sementes de tomate em testes de emergência em areia e em substrato para mudas	57
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.5.1 Experimento um: Inoculação a vácuo e por imersão	59
4.5.2 Experimento dois: Transmissão de <i>X. vesicatoria</i> de sementes inoculadas a	

vácuo para as plântulas	60
4.5.2.1 Isolamentos indiretos	63
4.5.3 Experimento três: Inoculação de <i>X. vesicatoria</i> em sementes por meio de injeção na região da placenta de frutos verdes	65
4.5.4 Experimento quatro: Estudo da transmissão de <i>X. vesicatoria</i> em sementes de tomate em testes de emergência em areia e em substrato para mudas	68
4.6 CONCLUSÕES	73
4.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
5 CAPÍTULO III: Localização de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> em sementes de tomateiro por meio de microscopia eletrônica de varredura	76
5.1 RESUMO	77
5.2 ABSTRACT	78
5.3 INTRODUÇÃO	79
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	81
5.4.1 Inoculação artificial das sementes de tomateiro	81
5.4.2 Preparo das amostras para observações no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).	83
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
5.5.1 Localização de <i>X. vesicatoria</i> sobre o tegumento das sementes	84
5.5.2 Localização de <i>X. vesicatoria</i> sobre as radículas e raiz principal das plântulas	91
5.5.3 Localização de <i>X. vesicatoria</i> sobre a parte aérea das plântulas	97
5.5.4 Ocorrência natural de uma bactéria associada a sementes de tomate	102
5.6 CONCLUSÕES	106
5.7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
6. CONCLUSÕES GERAIS	110
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
8. ANEXO	112

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Descrição dos tratamentos aplicados, de acordo com a época, tipo e parte da planta inoculada.	27
<b>Quadro 2.</b> Avaliações realizadas durante o experimento um.	29
<b>Quadro 3 -</b> Descrição das avaliações realizadas durante o experimento dois.	30

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Número médio de colônias de *Xanthomonas vesicatoria* (UFC/mL) obtidos a partir de isolamentos indiretos em meio Nutriente Ágar de diferentes partes de frutos de tomate coletados de plantas em diferentes fases fisiológicas (floração, frutos verdes, frutos de vez e frutos maduros) e inoculados por diferentes procedimentos (atomização, injeção na placenta e injeção no mesocarpo). 34
- Tabela 2** – Detecção de *X. vesicatoria* a partir do isolamento direto de sementes inteiras e sementes trituradas, em meio Nutriente Ágar, de frutos de tomate coletados de plantas em diferentes fases fisiológicas (floração, frutos verdes, frutos de vez e frutos maduros) e inoculados por diferentes procedimentos (atomização, injeção na placenta e injeção no mesocarpo). 36
- Tabela 3** - Análise da variância dos métodos de inoculação aplicados aos frutos verdes (atomização da epiderme, injeção na placenta e injeção no mesocarpo) sobre as frações isoladas dos frutos (mesocarpo, LP + APPLS e semente). 38
- Tabela 4** – Médias do número de colônias de *X. vesicatoria* (UFC/mL), obtidos a partir do isolamento das frações mesocarpo, líquido placentário + água proveniente da primeira lavagem das sementes (LP+APPLS) e sementes inteiras (SI) de frutos verdes inoculados por diferentes métodos (atomização (AE), injeção na placenta (IP) e injeção no mesocarpo (IM)). 38
- Tabela 5** – Número médio de sementes por frutos, extraídas de frutos frescos inoculados ainda verdes por injeção na região da placenta; número médio de sementes infectadas por *X. vesicatoria*; porcentagem do número de sementes por fruto infectadas por *X. vesicatoria*; número de sementes por fruto colonizadas pela flora microbiana; e número médio de sementes por fruto, extraídas de frutos frescos sadios. 44
- Tabela 6** - Análise da variância para o efeito do método de inoculação das sementes de tomate do tempo após a inoculação e da interação entre estes sobre o crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*, em isolamentos indiretos em meio NA. 59
- Tabela 7** - Número de UFC de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomate inoculadas a vácuo e por imersão a partir do isolamento indireto em diferentes épocas após a montagem do teste. 59
- Tabela 8** - Porcentagem de recuperação de *Xanthomonas vesicatoria* em isolamentos diretos, com e sem assepsia das sementes e/ou partes das plântulas em meio NA de amostras de sementes inoculadas com a fitobactéria pelo método a vácuo e testemunhas, semente imersa em solução tampão submetida a vácuo sem a fitobactéria e semente original. 62
- Tabela 9** - Quantificação de *X. vesicatoria* (UFC/semente), obtido a partir do isolamento indireto em três placas, de tegumentos de cinco sementes de tomate submetidas a três tratamentos: ‘testemunha’, ‘vácuo + solução tampão’ e inoculadas a vácuo com *Xanthomonas vesicatoria*. 64
- Tabela 10** - Quantificação de *Xanthomonas vesicatoria* nas partes das plântulas de tomates, obtidas de sementes originais, testemunha vácuo e sementes inoculadas a vácuo com *X. vesicatoria*, 96 horas após o início do ensaio. 64
- Tabela 11** - Número médio de colônias de *X. vesicatoria* (UFC/semente) obtidas do isolamento de sementes extraídas de frutos inoculados, ainda verdes, por infiltração na placenta, em diferentes tempos após a semeadura. 65

<b>Tabela 12</b> - População de <i>X. vesicatoria</i> (média de Log(UFC+2)), obtida do isolamento indireto de sementes extraídas de frutos previamente inoculados em diferentes tempos após a semeadura.	66
<b>Tabela 13</b> – Isolamentos indiretos das sementes e diferentes partes das plântulas de tomate proveniente de sementes extraídas de frutos cultivados na estufa, inoculados ou não com <i>X. vesicatoria</i> ao longo de 144 horas.	69
<b>Tabela 14</b> – Quantificação de <i>X. vesicatoria</i> (UFC/parte de plântula) sobre as partes de plântulas (raiz, hipocótilo e folha cotiledonar) obtidas a partir de sementes extraídas de frutos inoculados com a fitobactéria, ainda verdes, por infiltração da placenta com 14 dias de idade em testes de emergência em areia.	70
<b>Tabela 15</b> – Quantificação de <i>X. vesicatoria</i> sobre as diferentes partes das plântulas (raiz, hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas) aos 7, 14 e 21 dias de germinação em substrato comercial para mudas. A análise foi feita com a transformação dos dados para log (UFC+2) e os valores apresentados foram destransformados.	71
<b>Tabela 16</b> – Identificação das amostras de sementes de tomateiro extraídas de frutos inoculados, ainda verdes, com <i>X. vesicatoria</i> por diferentes métodos (atomização da flor, atomização da epiderme do fruto, infiltração no mesocarpo e infiltração na placenta), durante os estudos de transmissão da fitobactéria da planta para as sementes. As sementes foram extraídas dos frutos e imediatamente fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) sem colocação em substrato.	82
<b>Tabela 17</b> – Descrição das amostras selecionadas para eletromicrografia de varredura submetidas a diferentes períodos de incubação e diferentes substratos.	82
<b>Tabela 18</b> - Descrição das partes de plântulas (raiz, hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas) desenvolvidas em substrato comercial oriundas de sementes inoculadas com <i>X. vesicatoria</i> por infiltração à vácuo.	83

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Frutos de tomateiro colhidos no Setor de Horticultura da UFRRJ. Da esquerda para a direita: fruto não inoculado (sadio); fruto inoculado apresentando lesão provocada pela infecção de *X. vesicatoria*. 39
- Figura 2** – Seção longitudinal de frutos de tomate mostrando: A) - Corte longitudinal de fruto sadio, polpa de cor vermelho intenso e sementes íntegras; B) Corte longitudinal de frutos, ainda verdes, inoculados com *X. vesicatoria* por injeção da suspensão bacteriana na região da placenta com alterações na cor da polpa e lesões internas com a polpa destruída (1B) e fruto com polpa de cor esverdeada próximo da área de inoculação (2B). 40
- Figura 3** – Sementes de tomateiro semeadas em placas de Petri vertidas com meio NA. (A) Sementes inteiras extraídas do fruto n. 1, inoculado por *X. vesicatoria* ainda verde, por injeção na região da placenta exibindo infecção; (B) semente colonizada por microflora residente que suprimiu o crescimento de *X. vesicatoria* (seta). 41
- Figura 4** – Sementes de tomate extraídas de frutos sadios e semeadas em placas de Petri vertidas com meio de cultura NA. Observa-se crescimento de microrganismos residentes ao redor das sementes. 42
- Figura 5** - Sementes de tomate extraídas de frutos inoculados com *X. vesicatoria* por injeção na placenta e semeadas em placas de Petri vertidas com meio de cultura NA. As sementes extraídas desse fruto possuem maior número de sementes colonizadas pela microflora que infectadas por *X. vesicatoria*. 43
- Figura 6** - Sementes de tomate extraídas de fruto inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por injeção na região da placenta que foram semeadas em placas de Petri vertidas com meio NA. Algumas sementes são infectadas apenas por *X. vesicatoria* (colônia amarela), outras colonizadas pela flora residente (colônia branca) e a maior parte por ambas (colônias amarela e branca). Nota-se crescimento de *X. vesicatoria* reduzido em sementes colonizadas pela microflora. 43
- Figura 7** – Sementes de tomateiro extraídas de fruto inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por injeção na região da placenta que foram semeadas em placas vertidas com meio NA. Nota-se que todas as sementes estão infectadas por *X. vesicatoria* e que apenas uma semente apresenta crescimento de outro microrganismo (seta). 44
- Figura 8** - População de *X. vesicatoria* (UFC) recuperada dos tegumentos, radículas, hipocótilos e folhas cotiledonares de plântulas de sementes de tomates previamente inoculados (dados não transformados). 67
- Figura 9** – População de *X. vesicatoria* (UFC/parte de plântula ou muda) sobre as partes das plântulas (radícula, tegumento, hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas) ao longo de 21 dias. Os valores de UFC não foram transformados. 72
- Figura 10** – Eletromicrografias de varredura (MEV) de semente comercial de tomate, cv. Santa Clara inoculada com *X. vesicatoria* por infiltração a vácuo. A – Visão geral da semente mostrando a densidade de tricomas em forma de cabeleira (Barra = 0,4 mm); B – Emaranhado de tricomas (Barra = 7 µm); C e D – Os tricomas arranjados em forma de anel. Estes podem constituir sítios de proteção para a fitobactéria contra diversos métodos de tratamento de sementes. (Barras = 2,7 e 1,5 µm); E - Células de *X. vesicatoria* aderidas no interior da cavidade da base do tricoma (Seta) (Barra = 2,7 µm). F – Superfície lisa da

semente apresentando agregados de *X. vesicatoria* aderidos à superfície (Barra = 1,5 µm). 86

**Figura 11** - Eletromicrografias de varredura (MEV) da superfície da semente comercial de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, inoculada com *X. vesicatoria*, por infiltração a vácuo. As sementes foram retiradas do gerbox 120 horas após a germinação e depositadas em NA por 48 horas. A – Visão Geral da semente (Barra = 0,4 mm); B e C – Células de *X. vesicatoria* em fixação apolar na base dos tricomas. Note a formação de cordões (fibrilas) nas quais a fitobactéria se ancora entre si e sobre a superfície do tricoma e tegumento (setas) (Barras = 7 e 2,7 µm); D, E e F - Formação de biofilme sobre os tricomas, este é um importante mecanismo para sobrevivência em condições adversas; pois a matriz de polissacarídeos fornece resistência a antibióticos e remoção das células por lavagem (Barras = 1,5, 2,7 e 2,7 µm). 89

**Figura 12** - Eletromicrografias de varredura (MEV) de semente de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, extraída de fruto inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por infiltração na região da placenta. A amostra foi retirada do gerbox 7 dias após o semeio e em seguida depositada em meio NA por 48 horas. A – Visão geral da semente e radícula (Barra = 0,7 µm); B – Tricomas impregnados de *X. vesicatoria* (Barra = 14 µm); C e D – Espaços entre os tricomas lotados de *X. vesicatoria* (Barras = 7 e 4,5 µm). 90

**Figura 13** – Eletromicrografias de varredura (MEV) da superfície radicular de plântulas tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, obtidas a partir de sementes de fruto inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por infiltração na placenta. A – Área próxima a emergência da raiz colonizada por células de *X. vesicatoria* (Barra = 14 µm); B – ampliação de A evidenciando a presença de estômatos nessa região colonizados pela fitobactéria (Barra = 13,5 µm); C– Detalhe de *X. vesicatoria* no interior do poro estomático (Barra = 4,5 µm); D e E –Estômatos completamente abertos e colonizados por *X. vesicatoria*. Note que esta estrutura serve de via de entrada para *X. vesicatoria* e provavelmente outros patógenos, principalmente os de comportamento vascular (Barras = 7 µm); e F – Pelo radicular colonizado por *X. vesicatoria*. Note maior concentração de células na base do pelo, provavelmente devido a maior liberação de exsudados (Barra = 7 µm). 93

**Figura 14** – Eletromicrografias de varredura (MEV) de radículas de plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de sementes extraídas de fruto inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por injeção na região da placenta. A amostra foi retirada do gerbox sete dias após o semeio e em seguida depositada em meio NA por 48 horas. A radícula apresenta estômato completamente aberto. A – Estômato com células de *X. vesicatoria* colonizando a periferia do poro (Barra = 4,5 µm) B – *X. vesicatoria* no interior do ostíolo (Barra = 1,4 µm). 94

**Figura 15** - Eletromicrografias de varredura (MEV) da raiz primária de uma planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, com 20 dias de idade cultivada em condições de viveiro. A e B – Estômato localizado na raiz principal, com as células-guardas semi-túrgidas (Barras = 27 e 14 µm). C e D – Detalhe do estômato semi-aberto com células de *X. vesicatoria* no contorno e no interior do poro estomático. Note presença de muco associado as células da fitobactéria (Barras = 7 e 2,7µm). 95

**Figura 16** - Eletromicrografias de varredura (MEV) da raiz lateral de uma planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, com 20 dias de idade, produzida a partir de sementes comerciais inoculadas com *X. vesicatoria* (ENA 4483) por infiltração a vácuo, em bandejas de isopor contendo substrato comercial e cultivadas em casa-de-vegetação. A e B – Visão geral de um seguimento de raiz secundária (Barras = 70 e 27,7  $\mu\text{m}$ ); C- Descolamento do pelo radicular, formando um sítio de infecção para patógenos. Note que entre as fissuras são localizadas células de *X. vesicatoria* (Barra = 7  $\mu\text{m}$ ); D – Colonização de *Acinetobacter* sp. entre as fissuras da epiderme afundada (Barras = 14  $\mu\text{m}$ ); E – Células simples de *X. vesicatoria* aderidas por fixação apolar na epiderme (Barra = 2,7  $\mu\text{m}$ ); F – Células centrais de *X. vesicatoria* em divisão binária. (Barra = 7,5  $\mu\text{m}$ ).

96

**Figura 17** – Eletromicrografias de varredura (MEV) de seguimento do hipocótilo de plântulas de 15 e 20 dias, produzidas a partir de sementes foram inoculadas com *X. vesicatoria* por infiltração a vácuo, semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial para mudas e conduzidas em condição de viveiro. A – visão geral do hipocótilo aos 15 dias, evidenciando o tecido dérmico com seus apêndices (tricomas) (Barra = 133  $\mu\text{m}$ ); B – Detalhe dos tricomas. Note ao centro um tricoma glandular (Barra = 27,7  $\mu\text{m}$ ); C – microagregados na base dos tricomas (Barra = 2,7  $\mu\text{m}$ ); D – Epiderme de hipocótilo aos 20 dias, evidenciando um tricoma quebrado como provável sítio de infecção (Barra = 70  $\mu\text{m}$ ); E – Estômato semi-aberto sobre a epiderme (Barra = 7  $\mu\text{m}$ ); e F – Célula compatível com *X. vesicatoria* próximo a abertura do poro estomático (Barra = 2,7  $\mu\text{m}$ ).

98

**Figura 18** - Eletromicrografias de varredura (MEV) da folha cotiledonar de uma plântula de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, com 20 dias de idade, produzidas a partir de sementes comerciais inoculadas com *X. vesicatoria* (ENA 4483) por infiltração a vácuo e após semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial e cultivadas em casa-de-vegetação. A – Visão geral de um seguimento de folha cotiledonar (Barra = 70  $\mu\text{m}$ ); B – Detalhe de um tricoma (Barra = 27,7  $\mu\text{m}$ ); C, D, E e F – Estômatos da folha cotiledonar com diferentes aberturas estomáticas (Barras = 7; 4,5; 4,5; 4,5 e 4,5  $\mu\text{m}$ ).

100

**Figura 19** – Eletromicrografias de varredura (FEMV) de uma folha definitiva aos 20 dias de idade, proveniente de planta produzida a partir de sementes inoculadas com *X. vesicatoria* por infiltração a vácuo, semeadas em bandejas de isopor contendo substrato comercial e conduzidas em casa-de-vegetação. A – Agregados bacterianos na epiderme do filoplano (Barra = 7  $\mu\text{m}$ ); B e C – Estômatos fechados (Barra = 4,5; 2,7  $\mu\text{m}$ ).

101

**Figura 20** - Eletromicrografias de varredura (MEV) da superfície da semente de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, extraída de fruto não inoculado lavada em água destilada estéril e depois inoculada a vácuo com *X. vesicatoria*. Superfície dos tricomas com agregados de *Acinetobacter* sp. A – Intensa colonização de *Acinetobacter* sp. aderidos à base dos tricomas (Barra = 7  $\mu\text{m}$ ); B – Tricomas deitados com intensa colonização de *Acinetobacter* sp. sobre a superfície das sementes (Barras = 14); C – Mistura de agregados de *X. vesicatoria* com agregados de *Acinetobacter* sp. (2,7  $\mu\text{m}$ ).

103

**Figura 21** – Eletromicrografias eletrônicas de varredura (FMEV) da semente de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, extraída de um fruto

inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por infiltração na placenta. A – Visão geral da semente mostrando a camada limite entre a radícula recém emergida e o tegumento (Barra = 150  $\mu\text{m}$ ); B – Superfície da radícula apresentando agregados de *Acinetobacter* sp. com caráter endofítico, por ter as células emergindo junto com a raiz (Barra = 2,6  $\mu\text{m}$ ); C Pelo radicular com células de *Acinetobacter* concentradas próximo a base (Barra = 4,5  $\mu\text{m}$ ); D- Estômato fechado na radícula colonizado por *Acinetobacter* sp. (Barra = 4,5  $\mu\text{m}$ ); E - - Radícula do fruto recém emergida apresentando agregados de *Acinetobacter* sp. sobre a superfície (Barras = 4,5  $\mu\text{m}$ ); eF – Intensa colonização de *Acinetobacter* sp. sobre a radícula (Barra = 7,0  $\mu\text{m}$ ).

104

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomate é a segunda hortaliça em importância econômica do mundo, com produção em torno de 100 milhões de toneladas, sendo superada apenas pela batata. No Brasil, ocupa também o segundo lugar em volume de produção, tendo atingido somente no mês de junho de 2007, um valor de 3.198.772 toneladas e área total plantada de 54.946 hectares (IBGE, 2007). O cultivo no estado do Rio de Janeiro tem uma importância sócio-econômica muito grande, pois o estado é o terceiro produtor nacional com uma área plantada de 2.655 hectares e produção de 195.665 toneladas, além de empregar grande contingente de mão-de-obra desde o campo até a comercialização (IBGE, 2007).

A cultura, porém, está sujeita a fitobacterioses, principalmente na parte aérea. Dentre estas se destaca a “mancha bacteriana” ou “pústula bacteriana” causada por *Xanthomonas vesicatoria* (= *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (DOIDGE)) (VALTERIN et al., 1995; JONES et al., 1998), por ser altamente destrutiva (BASHAN et al., 1982; BASHAN e ASSOULINE, 1983; KIMURA, 1984; JONES et al., 1991; ROBBS, 1953; KIMURA e CARMO, 1996; JONES et al., 1998). A mancha bacteriana é uma das doenças mais difundidas no país. Afeta toda a parte aérea do tomateiro provocando perdas na quantidade e qualidade dos frutos (ROBBS, 1985; LOPES e SANTOS, 1994). Sementes contaminadas representam a principal fonte de inóculo primário para a ocorrência desta fitobacteriose, pois mesmo em baixas proporções, pode resultar em severas epidemias e perdas no viveiro e campo, principalmente sob ambiente favorável (CARMO et al., 1996a, 1996b). Estudos realizados na UFRRJ por CARMO et al (1996) mostraram que 0,01% de sementes de pimentão contaminadas por *X. euvesicatoria* pode resultar, sob condições de ambiente favorável, em 100% de mudas contaminadas ao final de 30 dias.

Como a maioria das fitobacterioses, a mancha-bacteriana é de difícil controle no campo. As dificuldades do controle da doença podem ser atribuídas, em parte, à maior ou menor eficácia dos princípios ativos dos produtos químicos aplicados, aos cuidados e épocas de tratamento e, principalmente, à sensibilidade ou resistência das populações do patógeno aos bactericidas comumente empregados (STALL, 1993; KIMURA e CARMO, 1996). Normalmente, é recomendada a aplicação de fungicidas cúpricos ou cuprorgânicos que, em geral, não diferem entre si (MARCO e STALL, 1983) exceto quando da ocorrência de estirpes resistentes ao cobre (AGUIAR, 1997) e, em geral, observa-se variação na eficiência destes no controle de acordo com a região e a época do ano (CARMO et al., 2001).

O controle da doença deve incluir, necessariamente, o uso de sementes sadias ou com níveis de contaminação dentro dos padrões aceitáveis, obtidas a partir de lavouras livres da doença ou pela aplicação de métodos de tratamentos eficientes, bem como o uso de práticas de rotação por pequenos períodos e o uso de variedades menos suscetíveis (ROBBS, 1985).

Entre os tratamentos de sementes descritos para sementes de tomate visando à erradicação de *X. vesicatoria* destacam-se a termoterapia e a aplicação de substâncias desinfestantes. A termoterapia para sementes de tomate tem sido feita pela imersão da semente em água quente a 50° C, por 20 minutos (MACHADO, 2000a) ou pelo uso do calor seco a 70° C por 96 horas (CARMO et al., 2004; SILVA et al., 2002). O tratamento químico é feito principalmente com a aplicação de ácido clorídrico a 5% (MARINGONI e KUROZAWA, 1994; CARMO et al., 2004).

Com relação às sementes, acredita-se que a sua morfologia possa contribuir para aumentar o transporte e a transmissão da fitobactéria. A presença de estômatos na superfície pode facilitar a infecção. A densidade e a estrutura dos tricomas podem aumentar a sobrevivência de *X. vesicatoria* pela adesão das células em sítios difíceis de serem atingidos. O conhecimento do mecanismo de transmissão da bactéria da semente para a plântula poderá auxiliar no desenvolvimento de métodos de detecção e de tratamento das sementes.

Esse trabalho foi feito visando avançar no estudo epidemiológico da mancha-bacteriana do tomateiro, principalmente quanto à sua forma de transmissão. Para tanto, diferentes ensaios foram realizados com o objetivo de se determinar:

- a) O mecanismo de transmissão da fitobactéria da planta para a semente;
- b) O mecanismo de transmissão da fitobactéria da semente para a plântula;
- c) O papel da flora microbiana das sementes no processo de transmissão semente-plântula e na alta variabilidade observada nos testes de detecção;
- d) A importância da morfologia das sementes quanto à localização de *X. vesicatoria*;
- e) Os principais sítios de sobrevivência de *X. vesicatoria* nas sementes de tomate.

## 1.2 REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGUIAR, L. A. **Identificação de isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, agente de mancha-bacteriana do pimentão (*Capsicum annuum* L.), resistentes ao cobre e perspectivas de seu controle com formulações cúpricas e cuprorgânicas.** 1997 153 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- 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.; OKON, Y.; HENIS, Y. Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas vesicatoria* in tomato and pepper seeds. **Phytopathology**, n. 72, p. 1143-1144, 1982.
- 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, jul-set, 2004.
- CARMO, M.G.F.; MACAGNAN, D.; CARVALHO, A. O. Progresso da mancha-bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inóculo e do emprego ou não do controle com oxicleto de cobre. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 3, p. 342-347, nov., 2001.
- CARMO, M.G.F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L.A.; CARVALHO, A.O. O progresso da pústula bacteriana do pimentão causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em condições de viveiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n.1, p. 66-70, 1996a.
- CARMO, M, G. F.; SILVA, A. M. S. ; CARVALHO, S. ; CASTILHO, K. S. C. ; CARVALHO, A. O. Comparação de métodos de detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão. In: XXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1996, Campo Grande. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21. p. 342-342, 1996b.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário estatístico**, 2007.
- 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.; WOLTZ, S.S.; JONES, J.P.; PORTIER, K.L. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato leaflets treated with copper bactericides. **Phytopathology**, v 81 p. 714-9, 1991.
- KIMURA, O; CARMO, M.G.F. Doenças do pimentão causadas por bactérias. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p 66-73, 1996.
- KIMURA, O. Enfermidades bacterianas do pimentão. **Informe Agropecuário**, n. 10, p. 39-41, 1984.
- LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA – CPNH EMBRAPA – SPI, 1994. 61p

- MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: UFLA, 2000. 138p.
- MARCO, G.M.; STALL, R. E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensibility to copper. **Plant Disease**, v. 67 n. 7, p. 779-781, 1983.
- 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.
- ROBBS, C. F. Doenças causadas por bactéria. **Informe Agropecuário**, n. 11, p. 45-50, 1985.
- ROBBS, C. F. A “Mancha bacteriana” do pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Agricultura e Pecuária**, n. 25, p. 22, 1953.
- 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. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, n. 27, n. 6, p.587-593, 2002.
- STALL, R.E. *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*: Cause of bacterial spot to tomato and pepper. In SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (Eds.). **Xanthomonas**. London. CHAPMAN & HALL, p. 57-60, 1993.
- VALTERIN, L; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWING, J. Reclassidication of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 45, p. 472-489, 1995.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL

### 2.1 A Mancha Bacteriana do Tomateiro e Desenvolvimento da Doença

Várias fitobacterioses são descritas ocasionando danos econômicos à cultura do tomateiro. Dentre estas, a mancha bacteriana causada por *X. vesicatoria* é uma das mais importantes, tanto em tomate rasteiro quanto estaqueado. A distribuição geográfica da doença é bastante ampla, ocorrendo em todas as regiões do mundo onde o tomateiro é cultivado. No Brasil, a mancha bacteriana do tomateiro foi observada pela primeira vez em Pernambuco por BATISTA (1947), e mais registros de sua ocorrência foram realizados somente alguns anos mais tarde por CICCARONE e DAWSON (1959) e KRAMER (1959). Atualmente a doença encontra-se disseminada em toda a região Sudeste do Brasil (ROBBS *et al.*, 1981) e demais regiões (ROMEIRO, 2005).

*Xanthomonas vesicatoria* pertence à família Pseudomonadaceae e apresenta como principais características células de formato bastonetiforme e colônias de cor amarela, com o centro convexo e a borda lisa (LOPES e QUEZADO SOARES, 2000). As colônias de *X. vesicatoria*, quando isoladas em meio Tweem B tem aparência de ‘ovo frito’, com o centro amarelo, mucóide, circundado por uma zona de lipólise (KAVITHA e UMESHA, 2007). Quando submetida a testes bioquímicos, é classificada como gram negativa, solubilidade em KOH positiva, dehidrolase da arginina positiva, hidrólise da gelatina negativa, hidrólise do amido negativa, atividade lípase positiva, hidrólise da caseína positiva, produção de H<sub>2</sub>S positiva, oxidase Kovac’s negativa, oxidação/fermentação positiva, hipersensibilidade ao fumo positiva e patogenicidade ao tomateiro positiva (KAVITHA e UMESHA, 2007).

*Xanthomonas vesicatoria* é eficientemente transmitida via semente de tomate, constituindo-se numa importante fonte de inóculo inicial nas sementeiras e em campos de produção. Sendo assim, o progresso da doença no campo está diretamente relacionado às condições de ambiente, favorecida por alta umidade e temperaturas entre 22 e 32° C e pluviosidade (SHEKHAWAT e CHAKHAVARTI, 1976). A disseminação ocorre através de aerossóis, entrando por pequenos ferimentos, estômatos (MORALES *et al.*, 2005) ou hidatódios (MENTEN e BUENO, 1987). Sérios prejuízos às lavouras podem ocorrer sob condições de chuvas prolongadas ou de irrigação por aspersão, principalmente quando acompanhadas de rajadas de ventos, que promovem rápida disseminação da bactéria na cultura (POHRONEZNY *et al.*, 1992). Para Estudos realizados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, mostraram que 0,01% de sementes de pimentão, contaminadas pelo patógeno podem resultar, sob condições de ambiente favorável, em 100% de mudas contaminadas no final de 30 dias (CARMO *et al.*, 1996a).

O tomateiro pode ser afetado em qualquer estágio de desenvolvimento e os sintomas são observados em todos os órgãos aéreos. Em mudas, quando ocorrem condições favoráveis, a doença pode provocar destruição dos cotilédones e das folhas, retardando seu crescimento, podendo até inutilizar as mudas para plantio (ROBBS, 1985).

Na planta adulta as folhas apresentam, inicialmente, lesões minúsculas, circulares ou irregulares, que evoluem e aumentam de tamanho, passando do aspecto encharcado (anasarca) para tons marrons ou negros devido à necrose dos tecidos (ROBBS, 1985; MORALES *et al.*, 2005). As lesões, que são envoltas por um bordo amarelado, estão frequentemente localizadas nos bordos das folhas ou no limbo foliar (ROBBS, 1985), atingindo de 1 a 5 mm de diâmetro. Com a evolução da doença, as lesões podem coalescer formando áreas maiores de tecidos necrosados, tanto ao longo das nervuras como nos bordos das folhas, que secam e tornam-se quebradiças.

A bactéria pode provocar, ainda, queda de flores e frutos. Nos frutos, os sintomas iniciais surgem em forma de pequenas áreas encharcadas, escuras e com halos amarelados que com o tempo aumentam de tamanho e tornam a apresentar bordos ligeiramente elevados e aparência áspera, irregular e com centro deprimido, lembrando crateras escurecidas. Quando essas lesões ocorrem em grande número, os frutos perdem seu valor comercial. A bactéria pode colonizar os tecidos internos do fruto e atingir as sementes permitindo a sua contaminação direta ou no processo de extração (ROBBS, 1985).

Segundo KAVITA e UMESHA (2007), de uma estação de cultivo para outra, *X. vesicatoria* pode sobreviver no solo e em resíduos da cultura.

## 2.2 Transmissão de Fitobacterioses por Sementes

Potencialmente, todos os organismos fitopatogênicos podem ser transportados pelas sementes, embora a transmissão de inúmeros deles, dessa maneira não seja conhecida (Machado, 2000). Desta forma, a semente constitui-se em um meio bastante eficiente de transmissão de fitopatógenos, uma vez que não existem barreiras geográficas capazes de impedir a disseminação dos mesmos, além de apresentar um maior potencial de viabilidade no tempo em comparação com outras partes vegetais de propagação.

Dentre as bactérias fitopatogênicas transmissíveis por sementes, o maior número de espécies conhecidas pertence aos gêneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Corynebacterium* (*Clavibacter*) (Machado, 2000b). Além desse gênero a espécie de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* transmite a doença via sementes de melão (SILVA NETO, 2006), melancia, abóbora e pepino (OLIVEIRA, 2003).

As fitobactérias podem estar associadas as sementes de diversas formas, misturado com as sementes, fazendo parte da fração impura do lote, aderidas passivamente à superfície destas, ou no interior das sementes, seja nas camadas internas ou no embrião (MACHADO, 2000b).

Em plantas, os danos causados pelas fitobactérias ocorrem através de interferências em diferentes mecanismos biológicos das plantas como consumo do conteúdo celular do hospedeiro, provocando o seu enfraquecimento; morte celular ou distúrbio de seu metabolismo, através da secreção de toxinas, enzimas e reguladores de crescimento por parte dos patógenos e bloqueio do transporte de alimentos, nutrientes minerais e água através dos tecidos condutores (AGRIOS, 1978). Em sementes, os danos mais frequentes são vistos na forma de abortos, deformações, apodrecimentos, estromatizações, manchas necróticas, descolorações da casca, que levam sempre a perda do poder germinativo das sementes e constituem focos primários de infecção no campo (MACHADO, 2000b).

Em campos de produção comercial, a atuação de patógenos a partir de sementes contaminadas ou infectadas pode ser observada logo no início do cultivo. Alguns desses agentes causam morte da planta em pré ou pós-emergência. Outros patógenos não se manifestam no início do cultivo, porém podem causar danos as plantas adultas (MACHADO, 2000b).

O transporte e a transmissão de patógenos pelas sementes é um componente importante que deve ser levado em consideração em programas de produção e certificação de sementes. A determinação do nível de tolerância para um patógeno em sementes com base em estudos epidemiológicos é um desafio que requer conhecimento do patógeno e desenvolvimento da doença. O programa de certificação de sementes de feijoeiro no estado de Michigan, EUA, permite no máximo a presença de 0,05% de plantas contaminadas por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* durante a inspeção de campo e 0,0% nas sementes em testes de laboratório (MENTEN e BUENO, 1987). Existem outros programas, como por exemplo, no estado da Geórgia, EUA, onde é proibida a comercialização de sementes de crucíferas sem laudo de

sanidade para *X. campestris* pv. *campestris* (SCHAAD e FORSTER, 1982; SCHAAD e STALL, 1988). O índice de tolerância estabelecido em Wiscosin, EUA, para *Pseudomonas phaseolicola* em sementes de feijão é de 0,02% (Machado, 2000B)

A utilização de sementes contaminadas por patógenos, mesmo em baixas proporções pode resultar em severas epidemias de doença no campo e, conseqüentemente, perdas na produção (HARMAN, 1983; RICHARDSON, 1979; ROMEIRO, 1988). A alta ocorrência de podridão negra é sempre observada quando a contaminação de sementes de repolho por *X. campestris* pv. *campestris* excede 0,03% (SCHAAD e FORSTER, 1982; SCHAAD e STALL, 1988). OLIVEIRA et al. (1995), constataram que 1, 2, 3, 4 e 8% de incidência de plântulas de tomate infectadas por *X. vesicatoria*, resultaram igualmente em severas epidemias em condições de viveiro. Na França, TRIGALLET e BIDAUD (1978) demonstraram que a presença de cinco sementes de feijoeiro contaminadas por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* em um lote de 1.000 sementes, são suficientes para causar severa epidemia da doença no campo, porém, com uma semente contaminada em um lote de 20.000, a doença ocorre em baixa incidência. CARMO et al (1996a) constataram que 0,01% de sementes pimentão contaminadas com *X. euvesicatoria* podem ocasionar sob condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, sob condições de viveiro em 100% das mudas infectadas no final de trinta dias.

### 2.3 Morfologia da Semente de Tomateiro e Interações entre Bactérias e Sementes

A semente constitui a unidade reprodutiva das espermatófitas (gimnospermas e angiospermas), cuja função se relaciona com a dispersão e sobrevivência das espécies (BELTRATI e PAOLI, 2003), sendo ela a base da agricultura mundial. Por esse motivo, a utilização de sementes saudáveis é importante, uma vez que sementes podem abrigar vários patógenos e constituir uma fonte primária de inóculo para epidemias de muitas doenças e disseminá-las por longas distâncias. Bactérias e outros patógenos (fungos, nematóides e vírus), podem estar associados às sementes infectando-as, infestando-as ou ambas as formas. O grau de associação de patógenos com as sementes pode estar relacionado com a morfologia da semente que varia com as espécies e variedades de plantas. Por muitas vezes, o controle via tratamento por meio de métodos químicos, físicos ou biológicos é dificultado pela possibilidade desses patógenos estarem localizados internamente às sementes, ou protegidos em alguma estrutura da semente pois a taxa de aderência de propágulos é consideravelmente influenciada pelas características da superfície da semente (MENTEN e BUENO, 1987).

Em tomateiro, SILVA et al. (2002), constataram que a arquitetura da semente, seja interna ou externa, é muito complexa, possuindo inúmeras estruturas como arestas, tricomas, estômatos, corpos protéicos, grânulos de amido etc, e que a presença dessas estruturas dificulta a caracterização das estruturas e localização de *X. vesicatoria*. A grande presença de cavidades (arestas) e tricomas, formando uma espécie de trama, constituem sítios potenciais para o alojamento de bactérias em sementes, podendo facilitar sua sobrevivência ou aderência nas mesmas. Esta característica pode ser um dos fatores pelo qual o tratamento químico com as diversas substâncias testadas por diversos pesquisadores (CARMO et al, 2004; MARINGONI e KUROSAWA, 1994; VALARINI, 1995), não tenha mostrado eficiência no controle de *X. vesicatoria* em sementes de tomate. Quando se têm resultados positivos, tem-se também uma redução muito grande na viabilidade das sementes. A utilização da termoterapia também não possuiu eficiência total na erradicação de *X. vesicatoria* em sementes de tomate (SILVA et al., 2002; CARMO et al., 2004).

Entre os detalhes importantes observados na avaliação da ultra estrutura de sementes de tomate está a presença de estômatos (SILVA et al, 2002). Estas estruturas celulares que geralmente tem a função de realizar trocas gasosas entre a planta e o meio ambiente, foram

observados na epiderme externa da testa (tegumento externo da semente) em cerca de 30 famílias de angiospermas. Porém, pouco se conhece sobre a função desses estômatos em sementes (BELTRATI e PAOLI, 2003). A distribuição dos estômatos ocorre frequentemente nas partes aéreas fotossintetizantes, principalmente na lâmina foliar, e podem também ser encontrados, em menor número, nos pecíolos, caules jovens e partes florais, como pétalas, estames e gineceu.

A presença de estômatos em sementes de tomateiro pode ser importante no processo de transmissão de *X. vesicatoria* da semente para a planta, pois estes se ativos, podem servir como porta de entrada da bactéria para o interior das sementes, dificultando a sua eliminação. SILVA et al (2002) observaram, por meio de eletromicrografia eletrônica de varredura, estômatos em sementes de tomate e células de *X. vesicatoria* próximas a ele. Vários autores citam que *X. vesicatoria* está presente apenas na parte externa das sementes, ou seja, infestando-as (SCHAAD, 1982; MARINGONI e KUROZAWA, 1994; OLIVEIRA, 1995; VALARINI, 1995), contudo, a constatação da presença de estômatos no tegumento das mesmas é um indício de que a bactéria pode perfeitamente penetrar na região do endosperma das sementes, causando infecção (SILVA, 1999)..

O avanço da microscopia, com o advento da microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura, microscopia de fluorescência, microscopia confocal a laser de varredura e outros, possibilitam investigar a distribuição das células bacterianas ao longo da superfície das sementes, apontando os sítios específicos onde essas células se localizam, além de reentrâncias das sementes, pelas quais as células bacterianas podem se abrigar. Ou seja, estruturas anatômicas específicas para cada espécie de planta que podem facilitar ou evitar a infecção das sementes. Essas técnicas de microscopia também permitem que sejam estudados separadamente, através de cortes de seções, todos os constituintes das sementes como tegumentos externos e internos, embrião e endosperma, fornecendo condições de fotomicrografar células ativas ou não de bactérias no interior ou exterior das sementes, explicando melhor a eficiência relativa de muitos métodos de tratamento em sementes que visam o controle de fitopatógenos. Existem na literatura, muitos relatos da interação de bactérias e raízes, como o estudo de padrões de colonização de bactérias do gênero *Pseudomonas* sobre as raízes, ou interações de bactérias com outros microrganismos (outras bactérias ou fungos), contudo, poucos estudos nessa área têm sido reportados para sementes.

SILVA NETO et al. (2006) investigaram a colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* estirpe Aac1 em sementes de melão amarelo por meio da microscopia eletrônica de varredura. Para tanto, as sementes inoculadas por imersão ( $3,4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> por 30 minutos). Vinte e quatro horas após a inoculação, foram feitas observações em microscopia eletrônica de varredura. Detectaram-se células de *A. avenae* subsp. *citrulli* colonizando epífita e endofiticamente todas as partes de sementes analisadas: tegumentos externo e interno, embrião e endosperma. Segundo os autores, esse resultado comprovou a eficiência com que esta bactéria penetra e coloniza a semente.

SILVA et al. (2002), avaliaram por meio de observações em microscopia eletrônica de varredura, a eficiência do tratamento térmico via calor seco ( $70 \pm 2^\circ\text{C}$  por 96 horas) na erradicação de *X. vesicatoria* em sementes de tomate inoculadas a vácuo e o efeito deste tratamento sobre a estrutura das sementes. Compararam eletromicrografias de seções transversais de sementes inoculadas e tratadas termicamente com seções de sementes inoculadas e não tratadas. Nas eletromicrografias observou-se que o tratamento térmico alterou a estrutura das sementes e das células bacterianas. O calor promoveu a fusão de tricomas e a desnaturação de células bacterianas. Porém, algumas células de *X. vesicatoria* localizavam-se, abrigadas, no interior de túneis de tricomas fundidos, criados pelo efeito do calor.

## 2.4 A Importância das Técnicas de Microscopia Utilizadas no Estudo das Interações de Bactérias com Órgãos de Planta

A utilização de técnicas de microscopia eletrônica associada a métodos de tratamentos de sementes permite aos pesquisadores conclusões mais concretas sobre as pesquisas, uma vez que são observados por meio de eletromicrografias o efeito dos tratamentos sobre a superfície das sementes e sobre a integridade dos patógenos. SILVA et al. (2002) detectaram a presença de células bacterianas aparentemente íntegras, abrigadas sobre túneis de tricomas fundidos, após a termoterapia. Essa eletromicrografia pode explicar a não erradicação completa de *X. vesicatoria* sobre as sementes de tomateiro. Esse tema tem sido explorado por diversos autores, que utilizando vários métodos de tratamentos de sementes constataram ineficiência desses procedimentos sem explicar o porquê. SILVA NETO et al. (2006) também, com auxílio desta técnica mostraram que células bacterianas de *A. avenae* subsp. *citrulli* colonizam todas as partes das sementes de melão.

Muitos autores que estudam o estabelecimento de bactérias usadas como biocontrole de patógenos de solo sobre as raízes de muitas espécies de plantas utilizam técnicas de microscopia eletrônica. *Pseudomonas* spp. compreende um grupo de bactérias que têm aumentado significativamente a produção de muitas culturas. Esse aumento de produção está relacionado com a capacidade de esses microrganismos estimular o crescimento de plantas e protegê-las contra patógenos de solo (LEMANCEAU, 1992). O sucesso da introdução de agentes do controle biológico na agricultura depende da habilidade dessas bactérias em se estabelecer e proliferar sobre as raízes (ASSMUS et al, 1997). As técnicas de microscopia eletrônicas têm auxiliado na seleção de estirpes da bactéria mais adaptadas.

HANSEN et al. (1997) relataram que a localização *in situ* de *Pseudomonas* spp. sobre raízes de cevada, a partir de observações em microscopia confocal a laser de varredura, tem mostrado a distribuição da bactéria em células isoladas e formação de microcolônias (agregados irregulares e ou células em fileiras formando tiras) entre as células epidérmicas das raízes. A população bacteriana tende a se concentrar nas áreas onde o mucigel (substância liberada pelas raízes) está presente. Esses mesmos autores também observaram que em raízes laterais de plantas velhas, foram encontradas populações de bactérias distribuídas em fileiras próximo ao topo da raiz (HANSEM et al., 1997).

BAHME e SCHHROTH (1987), observaram que 41% das estirpes de *Pseudomonas fluorescens* inoculadas sobre plantas de batatas foram associados com a região da rizosfera, 54% das células aderiram frouxamente a superfície das raízes e 5% das células ou aderiram fortemente a superfície das raízes ou localizaram-se na endorizosfera. MILLER et al. (1989) relataram que estirpes de *Pseudomonas fluorescens* foram mais detectadas na rizosfera que no rizoplano e com pouca frequência na endorizosfera.

Muitos autores estudaram a colonização radicular ao longo das raízes, do ápice até a semente (BAHME e SCHROTH, 1987; LOPER et al., 1984). Esses autores observaram que populações de rizobactérias foram presentes em maior número nos segmentos de raízes adjacentes às partes das sementes que próximas ao ápice das raízes. Entretanto, ROVIRA e CAMPBELL (1974); GUCKERT et al. (1975) e CAMPBELL e GREAVES (1990), após inoculações no solo com estirpes de *Pseudomonas* sp., detectaram maior número de bactérias sobre o ápice que na zona de alongamento das raízes. Próximo do ápice das raízes localiza-se área de liberação de exsudados que podem sustentar a atividade bacteriana (GUCKERT, 1992).

HANSEN et al. (1997), estudaram a colonização inicial de duas estirpes de *P. fluorescens*, DF57 e Ag1, sobre raízes de cevada após um e sete dias de germinação. A estirpe DF57 possui antagonismo contra o fungo *Pythium ultimum* e foi isolada da rizosfera de plantas de cevada, enquanto a estirpe Ag1, que não possui antagonismo conhecido, foi isolada

da solução do solo. Os autores investigaram a localização 'in situ' das duas estirpes sobre as raízes em desenvolvimento; e se a colonização simultânea das duas estirpes poderia afetar a distribuição de ambas sobre o rizoplane. Para tanto, utilizaram a técnica de microscopia confocal a laser de varredura. Os autores verificaram que a população da estirpe DF57, em raízes coletadas um dia após a germinação, tendeu a ser mais abundante próximo a ponta da raiz. Isso pode ser explicado por BENNETT e LYNCH (1981) que relatam que o ponto de liberação de exsudados se localiza um pouco atrás do ápice da raiz. HANSEN et al. (1997), observaram que no dia um, as bactérias migraram do ponto fonte (camada de mucigel) em direção às células epidérmicas no ápice da raiz e no dia sete, a população de DF57 continuou se desenvolvendo e se manteve dentro da camada de mucigel ao longo da raiz. Quanto à colonização simultânea das duas estirpes sobre as raízes de cevada, as eletromicrografias registraram, para ambas as estirpes, a ocorrência de células isoladas na mucilagem, próximo da ponta da raiz, células agrupadas formando tiras de células no rizoplane da raiz principal e células isoladas na superfície dos pêlos radiculares. Nesses locais, foram observadas áreas onde a estirpe DF57 foi mais abundante, áreas onde a estirpe Ag1 foi dominante e áreas onde as duas estirpes foram igualmente representadas. Os autores concluíram que a estirpe DF57 não foi afetada pela presença de Ag1 e vice versa.

LUBECK et al.(2000), investigaram se bactérias nativas do solo afetam o padrão de colonização da estirpe DR54 de *Pseudomonas fluorescens* sobre raízes de beterraba. A distribuição das células bacterianas na base das raízes e a atividade metabólica desses organismos foram observadas durante 20 dias de incubação, por meio da microscopia confocal a laser de varredura e pelo teste de hibridação 'in situ' por fluorescência (FISH), respectivamente. Os autores detectaram presença de DR54 tanto na forma de células isoladas como microcolônias até o dia dois de incubação. Do dia dois ao dia sete de incubação foram encontradas predominantemente células formando microcolônias. Após esse período, a população de DR54 diminuiu bruscamente e se manteve constante em baixa frequência. Esse fato foi explicado pelo aumento da distância entre o ápice (local de colonização inicial) e a base da raiz ao longo dos vinte dias. Todavia, a população de bactérias nativas do solo foi detectada sobre o rizoplane após o dia sete de incubação. Foram observadas três subpopulações de bactérias nativas do solo sobre as raízes. Os autores concluíram que a competição entre a estirpe DR54 de *P. fluorescens* e bactérias nativas do solo podem afetar o padrão de colonização, a sobrevivência e a eficiência do controle biológico. Concluíram ainda que a adição de grande volume de bactérias inoculantes ao solo, pode inativá-las devido a competição pelo substrato.

GAMALERO et al.(2004) estudaram o padrão de colonização da estirpe A6RI de *Pseudomonas fluorescens* sobre raízes primárias de tomate aos três, cinco e sete dias após a germinação das plântulas. A raiz principal foi dividida em três zonas: zona A (ápice + zona de alongamento + zona dos pelos absorventes jovens) zona B (zona dos pelos absorventes) e zona C (zona dos pelos absorventes velhos + collar). Observações sobre a distribuição e organização das células bacterianas foram feitas por meio da microscopia de fluorescência e microscopia confocal a laser de varredura. Os autores constataram que o padrão de colonização das raízes se modifica com o aumento da idade das plantas. Ao longo de sete dias, a densidade de bactérias localizadas na zona A diminuiu enquanto que nas zonas B e C não houve variação significativa. A sobrevivência da bactéria resulta do crescimento e diferenciação das raízes e da divisão e morte das bactérias. A variação na densidade bacteriana ao longo das raízes foi assumida como sendo relacionada a padrões de concentrações de exsudados.

RINCÓN et al (2005) investigaram a associação do fungo ectomicorriza *Suillus granulatus* com a estirpe Aur6 de *Pseudomonas fluorescens* sobre raízes de *Pinus halepensi* (pinheiro) por meio de observações em microscópio epifluorescente. Os autores constataram

que a presença do fungo sobre as raízes do pinheiro não afetou o padrão de colonização de *P. fluorescens*. A densidade de bactérias aumentou durante os 20 primeiros dias de crescimento das plântulas, independente da presença do fungo. Após 40 dias, a densidade bacteriana decresceu significativamente e as células concentraram-se dois terços acima da raiz. A presença do fungo estimulou a sobrevivência da bactéria na zona de alongamento da raiz, onde a colonização do fungo foi superior. O desenvolvimento do pinheiro não foi estimulado quando o fungo e a bactéria foram inoculados separadamente, porém o efeito do sinergismo foi observado sobre o desenvolvimento das plantas quando a inoculação foi em conjunto. Quanto à distribuição das células bacterianas sobre as raízes, a colonização de *Pseudomonas fluorescens* (Aur6) foi semelhante sobre os três segmentos de raízes (base, zona de alongamento e ápice) durante os primeiros vinte dias de experimento. Após quarenta dias, foi observado maior densidade de bactérias na porção dois terços superior das raízes. O padrão de colonização de *Pseudomonas fluorescens* (Aur6) não foi modificado com a presença do fungo indicando a compatibilidade entre esses microrganismos.

Diante de tantos exemplos da utilização de técnicas microscópicas no estudo microbiano em raízes, a utilização da microscopia eletrônica de varredura em sementes pode proporcionar aos pesquisadores condições de investigar os efeitos de tratamentos de erradicação de patógenos aplicados às sementes e ainda possíveis mecanismos de sobrevivência utilizados pelos agentes patogênicos para suportar as adversidades do meio enquanto esperam condições favoráveis para iniciar a infecção.

## **2.5 Biofilme como Mecanismo de Sobrevivência de Bactérias**

A parede celular é o sítio de contato na interação entre plantas superiores e microrganismos. O papel primário da parede celular é a proteção, funcionando como uma barreira estrutural contra a invasão da planta por microrganismos (OLIVARES et al., 2005). Sendo assim, quando uma célula bacteriana atinge um sítio favorável, sua habilidade para resistir a remoção é uma vantagem seletiva. A ligação da célula bacteriana na superfície da planta é caracterizada por uma fase reversível e inespecífica (adesão), sendo frequentemente seguida de uma adesão irreversível, que em certos casos é altamente específica (ancoragem). As células bacterianas aderem a superfície da planta por fixação apolar ou polar, como células isoladas, dispostas em monocamada, ou formando micro-colônias (OLIVARES et al., 2005).

Para se adaptar às condições do ambiente nem sempre favoráveis ao seu desenvolvimento, as células bacterianas se agregam embebidas em uma matriz exopolimérica secretada por elas próprias. Essa forma de aglutinação é chamada de biofilme. A formação de biofilmes por bactérias é a expressão de comportamento coletivo mais difundido das bactérias (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990; COSTERTON et al, 1995). Ocorre naturalmente em grande variedade de plantas, incluindo culturas agrícolas, herbáceas e árvores (MORRIS et al., 1997). A formação de biofilme oferece às células uma pressão de seleção que favorece o estabelecimento de determinadas populações de bactérias, que podem não ser encontradas na fase solitária. As células que integram o biofilme são protegidas da dessecação, exposição aos raios UV, predação e a ação de bactericidas; além de aumentar a troca genética entre esses indivíduos (COSTERTON et al, 1995, DAVEY e O'TOOLE, 2000). Além disso, elas podem também expressar fenótipos de densidade dependente. Os agregados bacterianos, de um modo geral, podem ser vistos em depressões formadas na junção das células epidérmicas. Essa reunião pode ser ocasionada pelo acúmulo de células depositadas pelo movimento da água ao longo da superfície foliar (via capilaridade) (FOSTER, 1986; LEBEN, 1969) ou pode estar relacionada com processos ativos de fixação de bactérias e da produção de substâncias exopoliméricas. Os biofilmes epífitos foram caracterizados por abrigar grandes variedades de microrganismos incluindo numerosas espécies de bactérias gram-positivas, gram-negativas,

bem como leveduras e fungos filamentosos (MORRIS et al., 1997). As populações de agregados constituem entre 30 e 80% do total da população de bactérias que ocorrem naturalmente sobre a superfície foliar de muitas espécies de plantas (BOUREAU et al., 2003; JACQUES et al., 2000; MORRIS et al., 1998; MORRIS et al., 1997). A distribuição de bactérias ao longo do filoplano não ocorre de maneira uniforme. A maioria das populações existentes apresenta-se formando agregados, até mesmo em pequenas escalas (KINKEL et al., 1995). Em média, esses agregados medem 100 microns de comprimento e apresentam diferentes matrizes exopoliméricas envolvendo suas células (CARMICHAEL et al., 1999; FETT, 2000; MORRIS et al., 1997).

Estudos sobre a distribuição de *Pseudomonas syringae* sobre folhas de feijoeiro inoculadas artificialmente, localizaram agregados da bactéria sobre todas as estruturas anatômicas da folha, porém esses agregados foram observados, preferencialmente, na base de tricomas glandulares, sendo o número de células por agregado, nesse apêndice, significativamente maior que os encontrados em outras partes das folhas (nervuras, tricomas unciformes ou fendas entre as células epidérmicas) (MONIER, 2002). Esse mesmo comportamento foi observado sobre folhas naturalmente colonizadas de plantas cultivadas em ambiente aberto (MORRIS et al., 1997). Os tricomas glandulares, provavelmente, oferecem condições ótimas para o crescimento microbiano devido a sua habilidade em reter gotas de água (BREWER et al., 1991) e secretar mucilagem e uma diversidade de compostos, incluindo açúcares simples e proteínas (ASCENSAO, 1998; SIMON, 1997), ao passo que outros sítios da folha podem oferecer somente uma quantidade limitada de nutrientes (MORRIS e MONIER, 2003).

Em biofilmes epífitos de ambientes insaturados, os tricomas, podem servir como fonte direcional de nutriente, nesse caso, espera-se que as células sejam longas ou aumentem o comprimento com o aumento da distância até o tricoma. Entretanto, se o biofilme for bem hidratado, espera-se que o tamanho das células diminua e aumente a espessura do biofilme (células menores e mais gordas) (MORRIS e MONIER, 2003).

A rara ocorrência de grandes agregados de bactérias sobre as folhas sugere que somente poucos microsítios sobre a superfície da folha oferecem condições adequadas para sobrevivência e subsequente crescimento da bactéria (MORRIS e MONIER, 2003).

Uma das vantagens dos agregados em biofilmes é a resistência à dessecação. Células de *P. putida* localizadas dentro de grandes agregados de biofilme (100 células ou mais) sobreviveram ao estresse da dessecação sobre folhas de feijoeiro enquanto células isoladas e agregados pequenos morreram, após repetidas exposições ao estresse (MONIER, 2002).

Nas interações do biofilme com a planta hospedeira, a fisiologia da mesma pode ser afetada pelo aumento da concentração e da ação de toxinas, enzimas e biosurfactantes produzidos pelas bactérias, levando ao vazamento ou degradação de células da planta (MORRIS, 2002). Uma das poucas observações desse fenômeno foi narrada por CARMICHEL et al. (1999) em folhas de alface. Utilizando a microscopia de varredura confocal a laser e o corante laranja de 'acridine', eles observaram biofilmes em diferentes tempos durante o armazenamento e lavagem das folhas. Constataram que, com o aumento do tempo de armazenamento, o centro dos tecidos começava a apresentar manchas, ao contrário das plantas colhidas e imediatamente processadas. Nessas manchas, foram encontrados sítios colonizados por biofilmes, sugerindo que os biofilmes produziram enzimas que degradaram a parede celular que se tornou permeável ao corante.

A aglomeração de células dentro de biofilmes pode contribuir para o processo de decolagem e aerossolarização, aumentando a disseminação aérea. Isso é possível graças à presença de exopolissacarídeos que protegem as células da dessecação (OPHIR e GUTNICK, 1994; ROBERSON e FIRESTONE, 1992; WILSON et al., 1965) e raios UV (ELASRI e MILLER, 1999).

A principal via de entrada de bactérias na atmosfera é a partir de fontes naturais (vegetais ou solo) (LIGHTHART, 1997). Entretanto, a liberação de bactérias no ar as expõe a intensa radiação UV e dessecação. Somente 0,02% a 11% das bactérias colocadas no ar podem ser cultivadas, o restante das células morre ou não são viáveis para o isolamento (LIGHTHART, 1997). Aproximadamente, 95% da população de bactérias no ar, que são cultiváveis, estão associadas com partículas que medem 2,1 µm ou mais de diâmetro aerodinâmico, sendo que 40% dessas partículas, tem o diâmetro maior ou igual a 7 µm (LINDOW, 2002). Muitas bactérias fitopatogênicas têm sido encontradas como partículas de agregados nos aerossóis. A maioria das células viáveis de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (sobre campos de crucíferas), *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* (sobre campos de tomate) (MCINNES et al., 1998), e *Erwinia carotovora* (arrastada sobre produção de batata) (PEROMBELON et al., 1979) foram encontradas em partículas de diâmetro igual ou maior que 3,3 µm.

## 2.6 Bactérias Endofíticas e o Controle de Fitopatógenos

Os principais mecanismos pelos quais as bactérias endofíticas promovem o crescimento de plantas são a fixação de nitrogênio (BODDEY e DOBERREINER, 1995) e o controle biológico de fitopatógenos, seja este pelo antagonismo direto da microflora deletéria ou pela indução da resistência sistêmica (HALLMANN et al., 1997). No entanto, as bactérias endofíticas podem também promover o crescimento de plantas pela produção de hormônios vegetais ou de substâncias análogas (ARSHAD e FRANKENBERGER, 1991).

Vários mecanismos estão envolvidos na promoção de crescimento das plantas por bactérias endofíticas. Estes porém, podem ser diretos e indiretos. Quando o estímulo do crescimento das plantas é direto, o antagonista produz fitormônios ou substâncias análogas destes reguladores de crescimento capazes de estimular o desenvolvimento de plantas (BASHAN e HOLDUIN, 1997). Quando o estímulo é indireto, o crescimento é estimulado pela redução da população de microrganismos deletérios ou patogênicos às plantas, ou seja, pelo controle biológico de fitopatógenos, sendo este pelo antagonismo direto ou pela indução de resistência sistêmica (HALLMANN et al., 1997).

Estudos apontam mecanismos importantes que microrganismos endógenos ou introduzidos na semente utilizam para suprimir infecções nas sementes provocadas por patógenos (NELSON, 2004). Observações descritas por HADAR et al. (1983) e NELSON et al. (1986) revelam um período bastante curto de vulnerabilidade de sementes em processo de germinação para a infecção de patógenos. Geralmente, esse período ocorre entre 12 e 24 horas, sendo esse período, o momento crítico para os organismos usados no controle biológico expressarem características de supressão. Ou seja, as características dos microrganismos necessárias para suprimir o patógeno ou ativar respostas de defesa da planta devem ser ativadas e expressas entre 12 e 24 horas após a semeadura (PARKE, 1990).

Alguns trabalhos têm sido feitos com bactérias endofíticas, algumas das quais tem se mostrado eficientes no controle de doenças, como *X. oryzae* pv. *oryzae* em arroz, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sependonicus*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* em batata, *X. campestris* pv. *campestris* em repolho (ASSIS et al., 1998; BUREN et al., 1993; STURTZ e MATHESON, 1996) e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomate (SILVA et al., 2008).

## 2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L. A. **Identificação de isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, agente de mancha-bacteriana do pimentão (*Capsicum annuum* L.), resistentes ao cobre e perspectivas de seu controle com formulações cúpricas e cuprorgânicas.** 1997 153 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Microbiol production of plant hormones. In: KEISTER, D. L.; CREGAN, P. B. (Eds.). **The rhizosphere and plant growth.** Dordrecht: **Kluwer Academic**, p. 327-334, 1991.
- ASCENSAO, L., PAIS, M. S. The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. **Annual Botany**, v. 81:263–71p, 1998.
- ASSMUS, B.; SCHLOTTER, M.; KIRCHHOF, G.; HUTZLER, P.; HARTMANN, A. Improved in situ tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA-targeted oligonucleotides. **Microbiology Ecology**, v. 33, p.32-40, 1997.
- ASSIS, S.M.P.; SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas: método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathológica**, v.24, n.3/4, p. 216-220, jul/dez, 1998.
- BAHME, J.B.; SCHROTH, M.N. Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. **Phytopathology**, v. 77, p. 1093–1100, 1987.
- BASHAN, Y.; HOLDUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- 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.; OKON, Y.; HENIS, Y. Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas vesicatoria* in tomato and pepper seeds. **Phytopathology**, n. 72, p. 1143-1144, 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.
- BELTRATI, C. M.; PAOLI, A. A. S. **Semente.** In: APPEZZATO – DA- GLÓRIA, B; CARMELL – GUERREIRO, S. M. ed Anatomia Vegetal. Viçosa, UFV. 399-424p, 2003.
- BENNETT, R.A.; LYNCH, J.M. Bacterial growth and development in the rhizosphere of gnotobiotic cereal plants. **Journal Gen. Microbiology**, v. 125, p. 95-102, 1981.
- BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for the future research. **Fertilizers Research**, v. 42, p. 241-250, 1995.

- BOUREAU, T.; JACQUES, M-A; BERRUYER, R.; DESSAUX, Y; DOMINGUEZ, H.; MORRIS, C. E. Comparison of the structures of biofilm and solitary components of epiphytic bacterial populations on broadleaved endive. **Microbiology Ecology**, In press. 2003.
- BUREN, A.M. van; ANDRE, C.; ISHIMARU, C.A. Biological control of bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. **Phytopathology**, Saint Paul, v.27 et al., 1993;
- CAMPBELL, R; GREAVES, M.P. Anatomy and community structure of the rhizosphere. In: LYNCH, JM (ed) **The rhizosphere**. Chichester, England: JohnWiley & Sons, p 11–34, 1990.
- CARMICHAEL, I.; HARPER, I .S.; COVENTRY, M. J.; TAYLOR, P. W. J.; HICKEY, M. W. 1999. Bacterial colonization and biofilm development on minimally processed vegetables. **J. Applied Microbiology. Symp.** Suppl. 85:45–51p, 1999.
- 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, jul-set, 2004.
- CARMO, M.G.F.; MACAGNAN, D.; CARVALHO, A. O. Progresso da mancha-bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inóculo e do emprego ou não do controle com oxicleto de cobre. **Horticultura Brasileira**, v. 19, n. 3, p. 342-347, nov., 2001.
- CARMO, M.G.F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L.A.; CARVALHO, A.O. O progresso da pústula bacteriana do pimentão causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em condições de viveiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n.1, p. 66-70, 1996a.
- CARMO, M, G. F.; SILVA, A. M. S. ; CARVALHO, S. ; CASTILHO, K. S. C. ; CARVALHO, A. O. Comparação de métodos de detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de pimentão. In: XXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1996, Campo Grande. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21. p. 342-342, 1996b.
- CICCARONE, A.; DAWSON, W. T. Nota sobre algumas bacterioses do tomateiro em São Paulo. **O Biológico**, n. 25, p. 131-133, 1959.
- CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. **Biofilms**. New York: Wiley, 1990.
- COSTERTON, J. W; LEWANDOWSKI, Z; CALDWELL, D. E; KORBER, D. R.; LAPPINSCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review. Microbiology**, 49:711–45 p, 1995.
- DAVEY, M. E; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Molecular Biology Review**, 64:847– 67 p, 2000.
- ELASRI, M. O; MILLER, R.V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. **Applied Environmental Microbiology**, 65:2025–31p, 1999.
- FETT, W. F.. Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. **Journal Food Protection**, v. 63, 625–32p, 2000.

FOSTER, R. C. The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. **Annual Review Phytopathology**, v. 24, 211–34 p, 1986.

GUCKERT, A. Bedeutung der Pflanzenwurzeln und ihrer Ausscheidungen als Quellen organischer Stoffe im Boden. **Der Landwirtsch**, v. 206, p. 97–113, 1992.

GUCKERT, A.; BREISH, H; REISINGER, O. Interface sol-racine I. Etude au microscope électronique des relations mucigel-argilemicroorganismes. **Soil Biology Biochemical**, v. 7, p. 241–250, 1975.

GAMALERO, E; LINGUA, G., CAPRÌ, F.G.; FUSCONI, A.; BERTA, G.; LEMANCEAU, P. Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. **Microbiology Ecology**, v. 48, p. 79-87, 2004.

HADAR, Y.; HARMAN, G.E.; TAYLOR, A.G.; NORTON, J.M. Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. **Phytopathology**, v. 73, p. 1322-1325, 1983.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HANSEN, M.; KRAGELUND, L.; NYBROE, O.; SØRENSEN, J. Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy. **Microbiology Ecology**, v. 23, p. 353–360, 1997.

HARMAN, G. E. Mechanisms of seed infection and pathogenesis. **Phytopathology**, n.73, p. 326-329, 1983.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário estatístico**, 2007.

JACQUES, M-A.; JOSI, K.; SAMSON, R. Structure des populations bactériennes épiphyllées du haricot et communication entre cellules bactériennes. **Proc. Rencontres Phytobacteriology**, 4th, p. 56, Aussois, France, 2000.

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.; WOLTZ, S.S.; JONES, J.P.; PORTIER, K.L. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato leaflets treated with copper bactericides. **Phytopathology**, v 81 p. 714-9, 1991.

KAVITHA, R. e 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.

KIMURA, O; CARMO, M.G.F . Doenças do pimentão causadas por bactérias. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 184, p 66-73, 1996.

- KIMURA, O. Enfermidades bacterianas do pimentão. **Informe Agropecuário**, n. 10, p. 39-41, 1984.
- KINKEL, L.L.; WILSON, M.; LINDOW, S.E. Effect of sampling scale on the assessment of epiphytic bacterial populations. **Microbiological Ecology**, n. 29, p. 283-297, 1995.
- KRAMER, M. Mancha bacteriana do tomateiro. **O Biológico**, n. 25, p. 149, 1959.
- LEBEN, C. Colonization of soybean buds by bacteria: observations with the scanning electron microscope. **Canadian Journal Microbiology**, v. 15, p. 319-20, 1969.
- LEMANCEAU, P. Effects bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes: exemple des *Pseudomonas* sp. fluorescents. **Agronomie**, v. 12, p.413-437, 1992.
- LIGHTHART, B. The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. **Microbiology Ecology**, v. 23, p. 263-74, 1997.
- LINDOW, S.E.; HECHT-POINAR, E.I.; ELLIOT, V.J. **Phyllosphere Microbiology**. St. Paul: APS Press. eds . 2002.
- LINDOW, S.E.; HECHT-POINAR, E.I.; ELLIOT, V.J. **Phyllosphere Microbiology**. St. Paul: APS Press. eds . 2002.
- LOPER, J.E.; SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N. Log normal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. **Phytopathology**, v. 74, p.1454- 1460, 1984.
- LOPES, C. A.; SANTOS, J. R. M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPA – CPNH EMBRAPA – SPI, 1994. 61p
- LUBECK, P.S.; HANSEN, M.; SØRENSEN, J. Simultaneous detection of the establishment of seed-inoculated *Pseudomonas fluorescens* strain DR54 and native soil bacteria on sugar beet root surface using fluorescence antibody and in situ hybridization techniques. **FEMS Microbiology Ecology**, v.33, p.11-19, 2000.
- MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: UFLA, 2000. 138p.
- MACHADO, J.C. Patologia de sementes: Significado e Atribuições . In: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes. Ciência, Tecnologia e Produção. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000. v. 1. 588 p.
- MARCO, G.M.; STALL, R. E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensibility to copper. **Plant Disease**, v. 67 n. 7, p. 779-781, 1983.
- 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.

MENTEN, J.O.M; BUENO, J.T. Transmissão de doenças pelas sementes. **In: SOAVE, J. e WETZEL, M.M.V.S. (ed) Patologia de sementes.** Campinas:Fundação Cargill.1987. p. 164-191.

MILLER, H.J.; LILJEROTH, E.; HENKEN, G.; VAN VEEN, J.A. Fluctuations in the fluorescent pseudomonad and actinomycete populations of rhizosphere and rhizoplane during the growth of spring wheat. **Canadian Journal Microbiology**, v. 36, p. 254–258, 1989.

MCINNES, T. B.; GITATIS, R. D.; MCCARTER, S. M.; JAWORSKI, C. A.; PHATAK, S.C. Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. **Plant Disease**, v.72, 575– 79 p, 1988.

MONIER, J.M. Biological significance of bacterial aggregation of leaf surfaces: The social life of epiphytic bacteria. **In: Environmental Science, Policy and Management.** Berkeley: University California, 176 p. 2002.

MORALES, CO.; POSADA, J.; MACNEALE, E.; FRANKLIN, D.; RIVAS, I.; BRAVO, M.; MINSAVAGE, J.; STALL, R.E.; WHALEN, M.C. Functional analysis of the early chlorosis factor gene. **Molecular Plant-Microbiological Interaction**, n. 18, p. 477-486, 2005.

MORRIS, C.E.; MONIER, J.M.; JAQUES, M.A. Methods for observing microbial biofilms directly on leaf surfaces and recovering them for isolation of culturable microorganism. **Applied Environmental Microbiological**, v. 63, p. 4789-4795, 1998.

MORRIS, C.E.; MONIER, J-M.; JACQUES, M-A. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p.4789–4795, 1998.

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 microorganism. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, 1570–76 p, 1997.

NELSON, E.B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual. Review Phytopathology**, n. 42, p. 271-309, 2004.

NELSON, E.B.; CHAO, W.L.; NORTON, J.M.; NASH, G.T.; HARMAN, G.E. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: possible role in biological control of *pythium* pre-emergence damping-off. **Phytopathology**, v.76, p. 327-335, 1986.

OLIVEIRA, I.S.; SALES JÚNIOR, R.; MARIANO, R.L.R.; Ocorrência da mancha-aquosa causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, em melão-pepino no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28 n.6, p.686, 2003

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S.; MEZENCIO, J. M. S.; MIGUEL, D. S. Comparação de métodos para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, n. 20, p. 377, 1995. (Resumo).

OLIVARES, F.L.; SILVA, L.G.; BORGES, L.E.; SILVA, R.A.; MIGUENS, F.C.; JAMES, E.K. Abordagens estruturais e implicações fisiológicas da adesão bacteriana a parede celular dos vegetais. In: **I Simpósio Brasileiro de Biologia Celular Vegetal**, 2005, Teresópolis. I Simpósio Brasileiro de Biologia Celular Vegetal, v. 1. p. 1-5, 2005.

OPHIR, T.; GUTNICK, D.L. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p.740–745, 1994

PARKE, J.L.; RAND, R.E.; JOY, A.E.; KING, E.B. Biological control of Pythium damping-off and Aphanomyces root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P.fluorescens* to seeds. **Plant Disease**, v. 75, p. 987-992, 1991.

PÉROMBELON, M.C.M.; FOX, R.A.; LOWE, R. Dispersion of *Erwinia carotovora* in aerosols produced by the pulverization of potato haulm prior to harvest. **Phytopathology**, v. 94, p.249–260, 1979.

POHRONEZNY, K.; HEWITT, M.; INANTE, J.; DATANOFF, F. Wind and wind-generated sand injuri as factors in infection of pepper by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Plant Disease**, v. 76., n. 10, p. 1036-1039, 1992.

RICHARDSON, M. J. **An annotated list os seed-borne disease**. Kew, Comonwealth Mycological Institute 3. 1979.

RINCÒN, A.; RUIZ-DÍEZ, B.; GARCÍA-FRAILE, S.; GARCÍA, J.A.L.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; PUEYO, J.J.; FELIPE, M.R. Colonisation of Pinus halepensis roots by *Pseudomonas fluorescens* and interaction with the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*, **Microbiology Ecology**, v.51, p. 303-311, 2005.

ROBBS, C. F; NETO, J. R.; RIBEIRO, R. L. D.; KIMURA, O. Anotated list of bacterial plant pathogens in Brazil. In: **Proc. 5<sup>th</sup> Int. Conf. Pl. Pathogen. Bactéria**, p. 01-613, 1981.

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

ROBBS, C. F. A “Mancha bacteriana” do pimentão (*Capsicum annuum* L.). **Agricultura e Pecuária**, n. 25, p. 22, 1953.

ROBERSON, E.B.; FIRESTONE, M.K. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1284–1291, 1992.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2<sup>a</sup> ed. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 2005. 417p.

ROMEIRO, R. S. **Fundamentos de Bacteriologia de Plantas**. Viçosa, MG. Universidade Federal de viçosa. Imp. Univ. 1988.

ROVIRA, A.D.; CAMPBELL, R. Scanning electron microscopy of microorganisms on the roots of wheat. **Microbiology Ecology**, v. 1, p.15–23, 1974.

SCHAAD, N. W.; STALL, R. E. *Xanthomonas*: In: SCHAAD, N. W., ed. Laboratory guide for identification of plant pathogens bacteria. St. Paul, APS Press. n. 2 p. 81-94. 1988.

SCHAAD, N. W.; FORSTER, R. A semmi-seletive medium agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seed. **Seed science and Technology**, n. 8, p. 383-391. 1982.

SHEKHAWAT, P. S.; CHAKHAVARTI, B.P. Factors affeting development of bacterial leaf spot of chillies caused by *Xanthomonas vesicatoria* pv. *vesicatoria*. **Indian Phytopathology**, v.29, p. 392-397, 1976.

SILVA, J.R.C.; SOUZA, R.M; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciências Agronômicas**, v. 32, n.4, p. 1062-1072, jul/ago, 2008.

SILVA NETO, E.B.; SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R.L.R.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; SANTOS, L.A. Penetração e Colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em Folhas, Frutos e Sementes de Melão Amarelo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p.084-088, 2006.

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. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. **Fitopatologia Brasileira**, n. 27, n. 6, p.587-593, 2002.

SILVA, A.M.S. **Deteção e erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomate**. 1999. 96 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia): Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SIMON, L.E. Morphologie, ontogenie et valeur adaptative des surfaces glandulaires mucilagène dans le genre *Chenopodium* L. (Chenopodiaceae). **C. R. Acad. Sci.**,v. 320, p. 615-620, 1997)

STALL, R.E. *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*: Cause of bacterial spot to tomato and pepper. In SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (Eds.). **Xanthomonas**. London. CHAPMAN & HALL, p. 57-60, 1993.

STURTZ, A.V.; MATHESON, B.G. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant Soil**, v. 184, n. 2, p. 265-271, 1996.

TRIGALLET, A.; BIDAUD, P. Some aspects of epidemiology of bean hoalo blight. In: **Proceedings of Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Station of Pathologic Vegetable et Phytopathologic**. Anger. França, 1978.

VALARINI, P. Métodos de deteccão de *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* e *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, n. 17, p. 179-186. 1995.

VALTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWING, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 45, p. 472-489, 1995.

WILSON, H.A.; LILLY, V.G.; LEACH, J.C. Bacterial polysaccharides IV. Longevity of *Xanthomonas phaseoli* and *Serratia marcescens* in bacterial exudates. **Phytopathology**, v. 55, p. 1135-1138, 1965.

### **3 CAPÍTULO I**

## **MECANISMOS DE TRANSMISSÃO DE *Xanthomonas vesicatoria* DA PLANTA DE TOMATE PARA AS SEMENTES**

### 3.1 RESUMO

O presente trabalho foi feito com o objetivo de se determinar os mecanismos de transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* da planta para as sementes de tomate e a taxa de transmissão da fitobactéria para as sementes. Para tanto, foram realizados três experimentos nos quais foram comparados métodos de inoculação artificial (atomização e injeção) combinados com diferentes regiões de inoculação (cacho floral, mesocarpo e placenta) em diferentes fases do desenvolvimento (flor aberta, frutos verdes, frutos de vez e frutos maduros). Inicialmente, visando determinar a fase fenológica ideal de inoculação para uma maior recuperação de *X. vesicatoria* nas sementes foram avaliados dois métodos de inoculação combinados com diferentes regiões de inoculação ou fases de desenvolvimento do fruto. As avaliações foram feitas a partir do isolamento das frações do fruto: mesocarpo, placenta, líquido placentário, água proveniente da primeira lavagem das sementes, sementes inteiras e sementes trituradas, em meio de cultura Nutriente Agar. Em seguida, foram comparados os mesmos procedimentos de inoculação, porém, apenas em frutos verdes e em flores abertas. As avaliações foram feitas pelo isolamento das frações mesocarpo, líquido placentário mais água proveniente da primeira lavagem das sementes e sementes inteiras. E, finalmente, foram feitos estudos para caracterização dos frutos inoculados e da taxa de transmissão da fitobactéria para as sementes. Frutos verdes foram inoculados, ou não, por meio de injeção de suspensão bacteriana na região da placenta e as avaliações feitas pela avaliação visual dos frutos e das sementes e por isolamentos diretos a partir das sementes recém extraídas dos frutos. Os tratamentos aplicados aos frutos verdes (inoculação por atomização, injeção na placenta e injeção no mesocarpo) resultaram em maior taxa de transmissão da fitobactéria para as sementes que os tratamentos aplicados aos frutos de vez ou maduros. O tratamento de inoculação de flores abertas, apesar de permitir a recuperação da fitobactéria a partir das sementes, resultou em alta taxa de aborto floral e reduzida produção de sementes. A inoculação por injeção da suspensão bacteriana diretamente no tecido placentário de frutos verdes foi a que resultou em maior taxa de recuperação da fitobactéria nas sementes, principalmente, quando os isolamentos foram feitos a partir da mistura do líquido placentário mais água proveniente da primeira lavagem das sementes. Os frutos inoculados apresentaram várias alterações como, a da cor do tecido placentário (polpa esverdeada), comprometimento da integridade dos tecidos do mesocarpo e placenta e redução do tamanho dos frutos e do número de sementes viáveis em cerca de 50%, comparado aos frutos não inoculados. Nas sementes viáveis, foi observada uma taxa de infecção por *X. vesicatoria* igual a 98,7% e a presença de microflora residente que, aparentemente, compete com *X. vesicatoria*.

**Palavras chaves:** *Lycopersicon esculentum*; fitobactéria; mancha bacteriana, semente.

### 3.2 ABSTRACT

The present work has the objective of determining the mechanisms of transmission of *Xanthomonas vesicatoria* from the plant to the tomato seeds and the rate of transmission of the phyto-bacteria to the seeds. In order to do that, three experiments have been made in which we compared methods of artificial inoculation (atomization and injection) combined with different regions of inoculation (flower cluster, flesh and placenta) in different phases of development (open flower, unripe, firm ripe and ripe fruit). Initially, viewing to determine the ideal phenological phase of inoculation for a greater recovery of *X. vesicatoria* in the seed, we evaluated two methods of inoculation combined with different regions of inoculation or phases of fruit development. The evaluations were done out of the isolation of fractions of the fruit: flesh, placenta, placental liquid, water from the first wash of the seeds, entire seeds and grinded seeds, in an Agar Nutrient culture medium. Then, the same inoculation procedures were compared, but only on unripe fruit and open flowers. The evaluations were done by isolating the fractions of flesh, placental liquid plus water from the first wash of the seeds and entire seeds. Finally, studies were done to characterize the inoculated fruit and the rate of transmission from the phyto-bacteria to the seeds. Unripe fruit were inoculated or not, by injection of bacterial suspension in the placenta region and the evaluation was done by visual observation of fruit and seeds and by direct isolations of seeds just extracted from fruit. The treatments applied to unripe fruit (inoculation through atomization, injection in the placenta and injection in the flesh) resulted in a greater rate of transmission of the phyto-bacteria to the seeds than the treatments applied to the firm ripe or ripe fruit. The inoculation treatment of open flowers, although allowing the recovery of the phyto-bacteria from the seeds, resulted in a high ratio of floral abortion and in a reduced production of seeds. The inoculation by injection of the bacterial suspension directly into the placental tissue of unripe fruit resulted in the greater rate of recovery of the phyto-bacteria in the seeds, mainly when the isolations were done out of the mixture of placental liquid plus water from the first wash of the seeds. The inoculated fruit presented many alterations like: colour of the placental tissue (greenish pulp); compromising of the flesh and placental tissues integrity; and reduction of the fruit size and of the number of viable seeds in about 50% in comparison to the non-inoculated fruit. In the viable seeds, it was observed a rate of *X. vesicatoria* infection of 98.7% and the presence of resident microflora which apparently competes with *X. vesicatoria*.

**Key-words:** *Lycopersicon esculentum*, phyto-bacteria, bacterial stain, seed.

### 3.3 INTRODUÇÃO

A mancha bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas vesicatoria*, tem a semente como a principal fonte primária de inóculo. Sob condições desfavoráveis, a bactéria pode sobreviver em diferentes órgãos da planta como residente, sem causar sintomas. Porém, sob condições favoráveis a planta do tomate pode ser infectada em qualquer estágio de desenvolvimento com a formação de lesões em todos os órgãos aéreos da planta.

A redução da produção, tamanho e depreciação dos frutos que apresentam sintomas faz parte dos danos provocados pela doença. A bactéria pode colonizar os tecidos internos do fruto e atingir as sementes permitindo a sua contaminação direta ou no processo de extração (ROBBS, 1985) e reduzir do número de sementes viáveis produzidas por fruto (ARAÚJO e ROSSETO, 1997).

Patógenos que infectam sementes através do estigma da flor podem atingir o embrião ou ficar restritos a outras partes da semente. Relatos de infecção da semente através da flor são feitos para fungos e vírus (MENTEM e BUENO, 1987). Segundo esses autores, a infecção sistêmica da semente a partir da planta-mãe pode ocorrer através do pedúnculo de flores e frutos e do pedúnculo da semente (funículo), ou pela superfície íntegra da semente.

A infecção de flores, sementes e frutos por fitopatógenos a partir de uma fonte externa, pode ocorrer em diferentes fases de desenvolvimento dessas estruturas. A fonte de inóculo pode ser na mesma planta ou em outras ou até mesmo no solo. A disseminação do inóculo pode ser feita através do vento, água, insetos ou a própria semente, durante as operações de colheita e beneficiamento. Os principais pontos de entrada para patógenos são estigma, nectário, parede do ovário ou da semente, pedúnculo da flor ou fruto e aberturas do fruto (MENTEM e BUENO, 1987).

A infecção de patógenos em sementes pode ser intra-embriônica ou extra-embriônica, que podem ser seguidas por infecções sistêmicas ou locais. A infecção intra-embriônica seguida por infecção sistêmica ocorre quando o embrião é infectado e o patógeno torna-se ativo durante a germinação da semente, penetrando através da haste ou seguindo próximo aos pontos de desenvolvimento da planta. Neste caso, a planta colonizada pode exibir sintomas ou apresentar infecção latente. A infecção intra-embriônica seguida por infecções locais ocorre quando o embrião infectado dá origem a lesões localizadas na parte aérea da planta, que são disseminados por diversos agentes, atingindo outros órgãos da planta produzindo novas lesões localizadas.

A infecção extra-embriônica seguida por infecção sistêmica ocorre quando o patógeno infectante do endosperma ou tegumento da semente desenvolve-se durante a germinação, infectando a planta através do desenvolvimento nos tecidos da haste ou acompanhando o crescimento meristemático da planta. Neste caso a infecção pode ser ou não latente. Já a infecção extra-embriônica seguida por infecções locais, ocorre quando o patógeno está no interior de tecidos da semente, exceto o embrião, e durante a germinação da semente, é transportado passivamente, no endosperma ou tegumento, atingindo a planta jovem (MENTEM e BUENO, 1987).

O conhecimento das fases de formação da semente é importante para o entendimento dos efeitos de fitopatógenos sobre as mesmas, quando o inóculo tem origem no período pré-embriônico. Durante a fecundação do óvulo são formados dois zigotos, o esporofítico (embriônico) e o xenofítico (endosperma). Como resultado da dupla fecundação, o zigoto esporofítico entra em estado de dormência, enquanto o zigoto xenofítico germina, dividindo-se ativamente, dando início ao xenofito (endosperma) que capitaliza a função lítica dos tecidos do rudimento seminal. Assim que alcança a formação de um bom número de células, produz-se a germinação do zigoto esporofítico. A partir daí, as divisões continuam igualmente em ambas as estruturas. Então estabelece-se o termo 'germinação' para essas duas gerações,

pois os zigotos formados somente continuarão seu desenvolvimento se vencerem as barreiras impostas pelo ambiente interno da planta, a semelhança da germinação usualmente conhecida, como fenômeno que mantém relações diretas com o ambiente externo (COCUCCI e MARIATH, 2004).

Na maioria das plantas o desenvolvimento do endosperma precede o desenvolvimento do embrião e este encontra-se maduro no momento em que todas as estruturas vivas da semente entram em dormência seminal (MENTEM e BUENO, 1987), que é fundamental para perpetuação e o estabelecimento de muitas espécies vegetais nos mais variados ambientes (ZAIDAN e BARBEDO, 2004).

A germinação das sementes consiste na ruptura da dormência e no restabelecimento das atividades vitais, primordialmente a mitose. A diferenciação consiste na especialização das células meristemáticas em órgãos ou na formação de tecidos (primórdios cotiledonares ou foliares, tecido vascular, tecido de reserva) (MENTEM e BUENO, 1987).

Um dos danos das fitobactérias nas sementes pode ser manifestado pelo aborto das sementes (NEERGAARD, 1979). A infecção por bactérias, além de, em muitos casos, impedir a fertilização, pode também paralisar a formação da semente em início de desenvolvimento, culminando em aborto. Quando o inóculo entra em contato com sementes em estágio mais adiantado de formação, poderá não ocorrer o aborto, mas estas se tornam menores e enrugadas, depreciando sua produção e qualidade. Como exemplo, é citado *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* em semente de milho (ARAÚJO e ROSSETO, 1987).

Outros efeitos das bactérias sobre as sementes são manifestados por podridões, descolorações e exsudações. Por exemplo, as podridões em sementes de algodão e de crucíferas, causadas por *X. axonopodis* pv. *malvacearum* e *X. axonopodis* pv. *campestris*, respectivamente; descolorações causadas por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, ambos em sementes de feijão e exsudação causada por *Corynebacterium tritice* e *P. syringae* pv. *glycinea* em sementes de trigo e soja, respectivamente (ARAÚJO e ROSSETO, 1987). A prevalência desses sintomas dependerá do patógeno e das condições ambientais durante a maturação das sementes (NEERGAARD, 1979).

A eficiência da transmissão de um determinado patógeno pelas sementes depende do sistema patógeno x hospedeiro e do ambiente, principalmente, umidade e temperatura. Sementes de arroz contaminadas por *X. oryzae* pv. *oryzae* submetidas à temperatura de 30 ± 2° C transmitiram a fitobactéria para mais de 90% das plântulas (SING e RAO, 1977). Por outro lado, SCHAAD e FORSTER (1982) observaram que sintomas devido a *X. campestris* pv. *campestris* podem ser inteiramente mascarados quando as plantas de repolho são incubadas a 15-20° C e que os sintomas são severos quando a temperatura de incubação é elevada para 25-30° C. TSIANTOS (1987) investigando a dinâmica da transmissão de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* pelas sementes de tomateiro, observou baixa taxa de transmissão da fitobactéria a umidade relativa entre 40 e 82% e alta taxa de transmissão à umidade relativa acima de 90%.

UMESHA (2006) investigou, em condições de campo, a transmissão de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* em sementes de tomateiro naturalmente infectadas e constatou que 46% dessas sementes geraram plantas doentes.

ROMEIRO et al (1993) investigou a transmissão de *Pseudomonas gladioli* pv. *alliicola* em sementes de cebola a partir de plantas com sintomas da doença. As observações das plantas sintomáticas foram feitas em condições de viveiro e campo. A taxa de transmissão foi de cerca de 9,0%. WELLER e SAETTLER (1980) demonstraram experimentalmente que uma população mínima de 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> UFC de *X. campestris* pv. *phaseoli* por semente

contaminada externamente foi necessária para originar plantas doentes em condições de campo.

A identificação da fase de desenvolvimento do fruto em que a fitobactéria é melhor recuperada na semente, bem como observações de aspectos morfológicos dos frutos infectados por *X. vesicatoria*, como tamanho, lesões externas e internas e alterações na cor da polpa, pode auxiliar na seleção de frutos sem risco de infecção pelo patógeno.

O objetivo desse trabalho foi estudar a eficiência da transmissão de *X. vesicatoria* da planta para as sementes em tomateiro em diferentes métodos de inoculação artificial (atomização e injeção) combinados com diferentes regiões de inoculação (cacho floral, mesocarpo e placenta) em diferentes fases do desenvolvimento (flor aberta, frutos verdes, frutos de vez e frutos maduros).

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados em casa-de-vegetação do campo experimental do Setor de Horticultura e no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

O isolado de *X. vesicatoria* utilizado foi selecionado por testes de patogenicidade e velocidade do aparecimento dos sintomas em mudas de tomate, inoculadas aproximadamente aos 30 dias de idade após o semeio. Suspensões bacterianas de sete isolados preservados em água foram preparadas em solução salina, (NaCl a 0,85%) na concentração ajustada para aproximadamente  $10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>, e inoculadas por injeção com uma seringa hipodérmica na face inferior da folha. Aos 14 dias após a inoculação, colônias típicas de *X. vesicatoria* foram isoladas e preservadas em água esterilizada e óleo mineral (MARIANO, 2000).

#### 3.4.1 Experimento um: Seleção do estágio fenológico

O experimento foi realizado entre os meses de junho e dezembro de 2005 em condições de casa-de-vegetação. Foram utilizadas sementes da cultivar Santa Clara Miss Brasil, semeada em bandejas de isopor. Mudas com dois pares de folhas definitivas, foram transplantadas para vasos com capacidade para 2 litros, contendo solo e esterco (3:1) e mantidas em casa-de-vegetação durante todo o ciclo de desenvolvimento da cultura. A cada dois dias foi feita fertirrigação, conforme CARRIJO e MAKISHIMA, 2003. Foram anotados os dados de temperaturas máxima e mínima, diariamente.

Para controlar a ocorrência de pulgões e mosca branca, foi utilizado o inseticida sistêmico à base de Tiametoxam (20 g/100 litros de água) e para controlar a ocorrência de oídio foram feitas pulverizações com fungicida a base de enxofre (300 g/ 100 litros de água). Alguns frutos apresentaram podridão apical e foram eliminados.

Neste experimento, foram comparadas duas formas de inoculação artificial (atomização e injeção) combinadas com quatro regiões de inoculação (toda flor, epiderme, mesocarpo e placenta) em quatro fases de desenvolvimento (flor aberta, frutos verdes, de vez e maduros), totalizando dez tratamentos conforme descritos no quadro 1. Para cada tratamento utilizaram-se cinco plantas, num total de 50 plantas.

**Quadro 1.** Descrição dos tratamentos aplicados, de acordo com a época, tipo e parte da planta inoculada.

<b>Época de inoculação</b>	<b>Tipo de inoculação</b>	<b>Região inoculada</b>	<b>Tratamento</b>
Flores abertas (FA)	Atomização (A)	Toda flor	(1) FAA
Frutos verdes (FV)	Atomização (A)	Epiderme (E)	(2) FVAE
	Injeção (I)	Placenta (P)	(3) FVIP
		Mesocarpo (M)	(4) FVIM
Frutos de vez (FD)	Atomização (A)	Epiderme (E)	(5) FDAE
	Injeção (I)	Placenta (P)	(6) FDIP
		Mesocarpo (M)	(7) FDIM
Frutos maduros (FM)	Atomização (A)	Epiderme (E)	(8) FMAE
	Injeção (I)	Placenta (P)	(9) FMIP
		Mesocarpo (M)	(10) FMIM

As inoculações foram realizadas entre os meses de setembro e dezembro de 2005. Como fonte de inóculo, utilizou-se o isolado ENA 4336 de *X. vesicatoria*, em suspensão em NaCl (0,85%) e ajustada para aproximadamente  $10^8$  UFC/mL em espectrofotômetro (85% de transmitância).

As flores foram inoculadas, sempre na parte da manhã, por meio de atomização da suspensão bacteriana até o ponto de escorrimento.

Os frutos foram inoculados em três estágios de desenvolvimento: verdes, de vez ou maduros, utilizando-se dois procedimentos distintos, atomização e injeção. A atomização foi feita sobre os frutos previamente feridos com auxílio de um conjunto de agulhas diretamente na região do mesocarpo. A inoculação por injeção foi feita na região da placenta ou do mesocarpo pela infiltração da suspensão bacteriana nessas partes, utilizando seringa hipodérmica. Cada fruto foi previamente desinfestado com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5%.

Após as inoculações, os frutos permaneceram em suas matrizes até atingirem o ponto de maturação fisiológica, ou por um período mínimo de 60 horas, no caso da inoculação de frutos maduros, quando foram colhidos e acondicionados em sacos plásticos, etiquetados e armazenados em geladeira até o momento das avaliações, em um total de cinco colheitas. Os frutos foram colhidos e ensacados por tratamento, assim, cada tratamento representou uma amostra.

Foram realizadas cinco avaliações, sendo que nas avaliações 1, 2 e 5 os isolamentos foram feitos por meio do plaqueamento em meio Nutriente Agar (FAHY e HAYWARD, 1983) e na terceira e quarta avaliações nos meios NA e MTA (GOSZCZYNSKA e SERFORTEIN, 1998). Em todos os casos, os frutos foram previamente desinfestados utilizando-se detergente, água corrente e pulverização com solução de hipoclorito de sódio (NaClO (0,5%)) e secos naturalmente sobre papel germitest esterilizado em fluxo laminar.

As avaliações foram feitas por isolamentos a partir do mesocarpo (M), placenta (P), líquido placentário (LP), da água proveniente da primeira lavagem das sementes (APPLS), sementes inteiras (SI) e sementes trituradas (ST). Sob condições assépticas, os frutos foram seccionados ao meio com um bisturi e com uma espátula foi retirado o conteúdo placentário e depositado em uma peneira fina para a separação das sementes. O líquido extraído desse processo (líquido placentário) foi acondicionado em um Becker esterilizado e as sementes submetidas a sucessivas lavagens em água destilada estéril. A remoção da mucilagem das sementes foi feita por ácido clorídrico a 36% (CAÇANDO JR. et al., 2003) na primeira avaliação e por fricção nas avaliações subsequentes devido à ação bactericida do ácido clorídrico (CARMO, 2004). A fricção das sementes foi feita utilizando-se papel germitest esterilizado para remoção da mucilagem. A água proveniente da primeira lavagem das sementes (APPLS) foi reservada em um Becker. As sementes foram acondicionadas em placa de Petri até o início dos isolamentos.

Os isolamentos a partir do mesocarpo e da placenta foram realizados conforme MARIANO (2000). Os fragmentos do mesocarpo que apresentavam sintomas típicos de mancha bacteriana e fragmentos de placenta foram sequencialmente mergulhados em álcool, hipoclorito de sódio (NaClO a 0,5%), por três minutos, em seguida lavados em água destilada estéril, por duas vezes, e finalmente depositados em solução salina (0,85% NaCl, 0,85% p/v), onde permaneceram por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, retiraram-se alíquotas dessa suspensão que foram espalhadas em três placas de Petri contendo o meio de cultura, com uma alça de “Drigalski”.

O isolamento do líquido placentário (LP) e da água proveniente da primeira lavagem das sementes (APPLS), foi feito com uma “alça de Drigalski”, retirando-se alíquotas da suspensão e espalhado em três placas de Petri contendo o meio de cultura.

O isolamento a partir das sementes inteiras (SI) foi feito por meio da distribuição direta de nove sementes por amostra em três placas de Petri contendo os diferentes meios de cultura. O isolamento a partir das sementes trituradas (ST) foi realizado a partir de sementes inteiras previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO (0,5%) por três minutos e lavadas em água destilada estéril e secas em papel germitest esterilizado. Em seguida, estas sementes foram seccionadas em várias porções com um bisturi e os diferentes fragmentos colocados em placas de Petri contendo solução salina (NaCl 0,85%) por 20 minutos. Após esse período, retiraram-se alíquotas da suspensão que foram espalhadas com uma “alça de Drigalski” em três placas de Petri contendo os meios de cultura.

Após o procedimento de isolamento, as placas foram acondicionadas em câmara BOD com temperatura regulada para  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas.

As avaliações estão descritas no quadro 2.

**Quadro 2.** Avaliações realizadas durante o experimento um.

Avaliação	Meio de cultura	Tratamentos avaliados	Frações isoladas
1	NA	(1) FAA, (2) FVAE, (3) FVIP, (4) FVIM, (5) FDAE, (6) FDIP, (7) FDIM, (8) FMAE, (9) FMIP e (10) FMIM	SI, ST, M, P,
2	NA	(1) FAA, (2) FVAE, (3) FVIP e (4) <u>FVIM</u>	LP APPLS
3	NA e MTA*	(5) FDAE, (6) FDIP, (7) FDIM, (8) FMAE, (9) FMIP e (10) FMIM	SI*, ST*, M, P, LP e APPLS
4	NA e MTA	(5) FDAE, (6) FDIP, (7) FDIM, (8) FMAE, (9) FMIP e (10) FMIM	SI e APPLS
5	NA	(1) FAA, (2) FVAE, (3) FVIP, (4) FVIM, (5) FDAE, (6) FDIP, (7) FDIM, (8) FMAE, (9) FMIP e (10) FMIM	SI, LP e APPLS

(1) FAA – Flor aberta por atomização; (2) FVAE – Fruto verde por atomização da epiderme; (3) FVIP – Fruto verde por injeção da placenta; (4) FVIM – Fruto verde por injeção no mesocarpo; (5) FDAE – Fruto de vez por atomização da epiderme; (6) FDIP – Fruto de vez por injeção da placenta; (7) FDIM – Fruto de vez por injeção no mesocarpo; (8) DMAE – Fruto maduro por atomização da epiderme; (9) FMIP – Fruto maduro por injeção da placenta; (10) FMIM – Fruto maduro por injeção no mesocarpo; SI – Semente inteira; ST - Semente triturada; M – Mesocarpo; P – Placenta; LP - Líquido placentário; e APPLS – Água proveniente da primeira lavagem das sementes.

### 3.4.2 Experimento dois: Seleção do método e da região de inoculação

O experimento dois foi realizado entre os meses de fevereiro e agosto de 2006, com o objetivo de selecionar o método de inoculação e a região do fruto a ser inoculada com *X. vesicatoria* que resultam em maior recuperação da bactéria a partir das sementes. As plantas foram conduzidas em casa-de-vegetação no Setor de Horticultura e as avaliações feitas no laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia.

Neste experimento foram avaliados os tratamentos flor aberta inoculada por atomização (FAA), frutos verdes inoculados por atomização do epicarpo (FVAE), frutos verdes inoculados por injeção da suspensão na placenta (FVIP) e frutos verdes inoculados por injeção da suspensão no mesocarpo (FVIM) (Quadro 1), previamente selecionados no experimento um.

Para cada tratamento, utilizaram-se dez plantas e como fonte de inóculo o isolado ENA 4336 de *X. vesicatoria* em suspensão em NaCl (0,85%) à concentração de  $10^8$  UFC/mL.

As inoculações foram realizadas durante o mês de maio de 2006 seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 3.4.1.

Foram realizadas sete colheitas e 16 avaliações, onde cada fruto foi considerado uma amostra. Assim, de uma mesma planta, retiraram-se várias amostras diferenciadas, conforme sua capacidade de produção. Os frutos foram acondicionados, separadamente, em sacos plásticos e levados até o laboratório e armazenados em geladeira até o início das avaliações.

Antes de se iniciar os isolamentos, os frutos foram desinfetados conforme descrito no item 3.4.1. Em seguida, foram feitos isolamentos das frações mesocarpo (M), líquido placentário mais água proveniente da primeira lavagem das sementes (LP + APPLS) e sementes inteiras (SI) conforme descrito no item 3.4.1. As sementes foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio (NaClO 0,5%) por três minutos, seguido de duas lavagens em água destilada esterilizada.

Utilizou-se o meio de cultura Nutriente Agar em todos os isolamentos e as placas foram acondicionadas em câmara BOD com temperatura regulada para  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas.

As avaliações foram realizadas entre os meses de maio a agosto de 2006 por meio de isolamentos em meio NA a partir do mesocarpo, semente inteira e líquida placentário mais água proveniente da primeira lavagem das sementes (Quadro 3).

### 3.4.2 Experimento dois: Seleção do método e da região de inoculação

**Quadro 3** - Descrição das avaliações realizadas durante o experimento dois.

Avaliações	Meio de cultura	Tratamento avaliado	Fração isolada
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16.	NA	(1) FAA, (2) FVAE, (3) FVIP e (4) FVIM	SI, M e (LP + APPLS)

FAA – Flor aberta por atomização; (2) FVAE – Fruto verde por atomização da epiderme; (3) FVIP – Fruto verde por injeção da placenta; (4) FVIM – Fruto verde por injeção no mesocarpo; SI – Semente inteira; M – Mesocarpo; (LP + APPLS) - Líquido placentário mais Água proveniente da primeira lavagem das sementes.

Os resultados referentes às inoculações dos frutos verdes foram submetidos a análise da variância. A variância foi calculada pelo método dos quadrados mínimos de dados não balanceados do número de colônias de *X. vesicatoria*, referente aos diferentes métodos de inoculação e diferentes regiões do fruto. A inoculação das flores não foi analisada estatisticamente.

Os dados foram analisados estatisticamente usando o método dos quadrados mínimos, admitindo um modelo linear onde  $Y_{ijkl} = m + MI_i + FI_j + DC_k + DI_l + MIFII_{ij} + e_{ijkl}$ , onde  $Y_{ijkl}$  é o logaritmo Neperiano do número de unidades formadoras de colônias + 2,  $m$  é uma constante (média),  $MI$  é o método de inoculação (atomização da epiderme ou injeção na placenta ou injeção no mesocarpo),  $FI_j$  é a fração do fruto (mesocarpo, LP + APPLS),  $DC_k$  é a data de colheita dos frutos (até o dia 15 de junho de 2006),  $DI_l$  é a data de isolamento das frações dos frutos (até o dia 23 de julho), isolada e  $e_{ijkl}$  é o erro ou resíduo do experimento.

Os dados foram transformados para logaritmo Neperiano  $[\text{LN}(X+2)]$ , pois em uma análise prévia, verificou-se a não normalidade dos dados, tendo o teste de Lilliefors indicado valor altamente significativo.

### 3.4.3 Experimento três: Determinação da taxa de infecção das sementes e das alterações morfológicas dos frutos

O experimento três foi realizado entre os meses de março e dezembro de 2007 com o objetivo de determinar a taxa de infecção de *X. vesicatoria* de sementes extraídas de frutos frescos previamente inoculados e de comparar diferenças morfológicas entre frutos sadios e inoculados com a fitobactéria. As plantas foram conduzidas em casa-de-vegetação no Setor de Horticultura e as avaliações foram feitas no laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia.

Os frutos foram inoculados quando ainda verdes (FVIP) por meio da injeção da suspensão do isolado ENA 4483 de *X. vesicatoria*, à concentração de  $10^8$  UFC/mL, na região da placenta. Esse tratamento foi selecionado no experimento dois.

Utilizaram-se 80 plantas, das quais 50 tiveram os frutos inoculados e as 30 restantes não tiveram frutos inoculados.

As inoculações foram realizadas entre os meses de maio e novembro de 2007 e a colheita dos frutos, realizada entre os meses de julho a novembro de 2007. Os frutos colhidos foram acondicionados em sacos plásticos, individuais, etiquetados e armazenados em geladeira até o início das avaliações. Neste ensaio, assim como no segundo, cada fruto foi considerado uma amostra.

Os frutos foram previamente desinfestados (item 3.4.1) e em seguida efetuados o isolamento a partir das frações Mesocarpo (M) e Líquido Placentário mais Água Proveniente da Primeira Lavagem das Sementes (LP+APPLS), conforme descrito no item 3.2.2. Efetuou-se também o isolamento das Sementes Inteiras (SI) por meio do plaqueamento direto sobre o meio de cultura NA e por isolamento indireto. Neste, as sementes individuais foram distribuídas em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina (NaCl a 0,85%), seguido de repouso por 20 minutos. Em seguida, tomaram-se três alíquotas de 0,1 mL que foram espalhadas em três placas de Petri contendo o meio NA.

As placas foram acondicionadas em câmara BOD com temperatura regulada para  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas, quando foram feitas avaliações por meio de isolamentos diretos e indiretos das frações para identificação e contagem de *X. vesicatoria*.

Paralelamente, coletaram-se amostras de frutos sadios (não inoculados) e inoculados para observações das características dos frutos como tamanho, número de sementes, presença de lesões.

As variáveis avaliadas foram: número de sementes por fruto e taxa de infecção das sementes por *X. vesicatoria*, determinada com base nos isolamentos diretos e indiretos.

Determinaram-se diferenças morfológicas entre frutos sadios e inoculados quanto ao tamanho, cor da polpa, presença de lesões internas e externas e integridade do fruto.

Os dados foram analisados de forma descritiva com cálculo das médias das variâncias e apresentação gráfica.

Para observar possível competição entre a flora microbiana encontrada sobre as sementes de frutos não inoculados e *X. vesicatoria*, sementes extraídas manualmente de frutos sadios foram inoculadas com *X. vesicatoria* pelo procedimento a vácuo (BASHAN e ASSOULINE, 1983) e em seguida depositado diretamente sobre o meio de cultura NA.

Para testar a presença da flora microbiana em sementes comerciais de tomate tomaram-se uma amostra de 200 sementes que foram depositadas diretamente sobre o meio de cultura NA. Em seguida as sementes foram acondicionadas em câmara BOD ajustada para temperatura de  $28^\circ\text{C}$  por 48 horas. Após esse período, procedeu-se a observação de possíveis colônias.

## 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.5.1 Seleção do isolado de *X. vesicatoria*

Dos sete isolados testados, quatro apresentaram virulência ao tomateiro, ENA 4336, ENA 4344, ENA 4463 e ENA 4483. Destes, dois foram selecionados, ENA 4336 e ENA 4483, para as inoculações dos frutos e de flor aberta por terem proporcionado o aparecimento de sintomas em menor número de dias após a inoculação na avaliação de patogenicidade.

### 3.5.2 Experimento um: Seleção da fase fenológica do tomateiro

Foram realizadas ao todo cinco avaliações e os isolamentos foram feitos a partir do mesocarpo (M), placenta (P), líquido placentário (LP), água proveniente da primeira lavagem das sementes (APPLS) (Tabela 1), sementes inteiras (SI) e sementes trituradas (ST) (Tabela 2). Todos os resultados são baseados nos isolamentos feitos no meio NA, uma vez que não houve crescimento da fitobactéria no meio MTA. O antibiótico ácido nalidixico, adicionado ao meio de cultura MTA, provavelmente inibiu o crescimento da fitobactéria. SILVA (1999) relatou a inibição parcial do crescimento de *X. vesicatoria* em meios semi-seletivos pela adição de substâncias químicas, antibióticos e antifúngicos. OLIVEIRA (1995) também relatou inibição do crescimento de *X. vesicatoria* pela adição do ácido nalidixico. Provavelmente, a utilização do meio de cultura MTA teria sido eficiente se este fosse modificado com a retirada desse antibiótico.

Na primeira avaliação, não houve recuperação de *X. vesicatoria* a partir da placenta e das sementes, provavelmente pela ação bactericida do HCl, utilizado na remoção da mucilagem. CARMO et al (2004), relatam ação bactericida do ácido clorídrico sobre *X. vesicatoria*. Todos os isolamentos realizados a partir da fração mesocarpo (M) apresentaram crescimento de *X. vesicatoria*.

As avaliações a partir de sementes e frutos produzidos a partir de flores inoculadas por atomização foram dificultadas pelo reduzido número de frutos devido ao abortamento das flores inoculadas. A taxa de aborto floral, provavelmente, foi agravada pelas altas temperaturas observadas durante o período de inoculação. Segundo NASCIMENTO (2000), a temperatura noturna ideal para o pegamento dos frutos encontra-se entre 14 e 17° C, com máxima de 20°C; e diurna entre 19 e 24°C, com máxima de 30°C. No dia da inoculação das flores (30 de agosto), as temperaturas máxima e mínima registradas na casa-de-vegetação foram de 46 e 17°C, respectivamente. As médias registradas durante o mês de agosto foram de 37 e 21°C. Acredita-se que a associação de temperaturas altas com a inoculação da bactéria aplicada diretamente na flor, tenha causado queda dessas flores.

Na segunda avaliação, foram avaliados os frutos inoculados ainda verdes com a fitobactéria por meio de atomização superficial, injeção na região da placenta e do mesocarpo. Observou-se o crescimento de *X. vesicatoria* a partir de todas as regiões isoladas, mesocarpo, placenta, líquido placentário, água proveniente da primeira lavagem das sementes, sementes inteiras e sementes trituradas (Tabelas 1 e 2). No entanto, foi a inoculação destes frutos por injeção na região da placenta que proporcionou a maior recuperação da fitobactéria a partir das diferentes regiões do fruto e sementes. Este resultado indica que quando a infecção dos frutos ocorre com estes ainda verdes, pode ocorrer também a colonização dos tecidos e a dispersão da fitobactéria no interior dos frutos, atingido a região da placenta e as sementes. No entanto, a recuperação da fitobactéria a partir do líquido placentário e da água proveniente da primeira lavagem das sementes, foi significativamente maior nos frutos inoculados por injeção na placenta do que por meio de injeção na região do mesocarpo ou por atomização na

superfície dos frutos. Com base neste resultado pode-se afirmar que a inoculação por injeção na placenta é o método que resulta em mais rápida colonização da região interna dos frutos e infecção das sementes.

Estes resultados foram confirmados por meio dos isolamentos diretos, feitos pela deposição das sementes inteiras ou trituradas sobre o meio de cultura, nas avaliações 2 e 3 (Tabela 2).

Na terceira avaliação, ocorreu uma baixa taxa de recuperação de *X. vesicatoria* em decorrência de a maioria dos frutos estarem em estágio avançado de maturação e início de senescência, evidenciado pela presença de sementes em processo de germinação e fungos colonizando a região do epicarpo. Os isolamentos a partir das sementes desses frutos resultaram em alta taxa de recuperação de outras bactérias, indicando a sua associação com as sementes. Esta flora microbiana interferiu negativamente no crescimento de *X. vesicatoria*.

A baixa recuperação da fitobactéria em frutos inoculados nos estágios de vez e maduros, independente dos métodos de inoculação utilizados, pode ser atribuído ao curto intervalo de tempo entre a inoculação e a colheita dos frutos. O intervalo entre a inoculação e o início dos isolamentos provavelmente não foi suficiente para o estabelecimento da fitobactéria. Além do mais, a flora microbiana residente nas sementes aumentou com o avançar do desenvolvimento do fruto, o que provavelmente dificultou o estabelecimento de *X. vesicatoria*. Testes posteriores revelaram que o crescimento da microflora bacteriana das sementes é muito mais rápido que o de *X. vesicatoria*. Enquanto o crescimento de colônias da fitobactéria é comumente observado entre 36 e 48 horas após a repicagem, o crescimento da flora microbiana foi observado em apenas duas horas de repicagem em tubo. Sementes de cevada foram colonizadas por populações de bactérias e actinobactérias endógenas poucas horas após a semeadura (KUTSCHERA, 2002; MCKELLAR e NELSON, 2003; NORMANDER e PROSSER, 2000; PARKE et al, 1991). MCKELLAR e NELSON (2003) registraram, ainda, que essas populações podem alcançar densidades de  $10^5$  a  $10^7$  células por semente às 12 horas após a semeadura. A presença da microflora sobre as sementes obtidas a partir de frutos inoculados nos estágios fisiológicos de vez e maduros, dificultou o estabelecimento de *X. vesicatoria* devido ao rápido crescimento da microflora residente.

O aumento da flora microbiana nos frutos maduros deve-se, principalmente, às sementes que germinaram no seu interior (sementes com emissão de radículas) liberando exsudados que, provavelmente foram utilizados pela flora bacteriana para se multiplicar e suprimir *X. vesicatoria*. Altíssimos níveis de exsudação ocorrem minutos após o início da embebição das sementes (LYNCH, 1978; SIMON e MATHAVAN, 1986; SIMON e RAJA HARUN, 1972), seguido por um aumento secundário em torno de seis horas. No final da germinação (protusão da radícula), exsudados são liberados novamente (NELSON, 2004). Então, conclui-se que quando a *X. vesicatoria* foi inoculada em frutos maduros, provavelmente, a flora microbiana já havia se estabelecido.

Na quarta avaliação, foram utilizados frutos inoculados nos estágios de vez e maduros por atomização da epiderme, injeção da placenta e injeção do mesocarpo e colhidos completamente maduros. Observou-se a recuperação de *X. vesicatoria* apenas nos isolamentos feitos a partir das frações água proveniente da primeira lavagem das sementes (APPLS). O crescimento da flora microbiana, principalmente, sobre sementes extraídas de frutos completamente maduros e amolecidos, provavelmente, interferiu no desenvolvimento de *X. vesicatoria*.

Durante a leitura das placas referentes ao isolamento das sementes inteiras extraídas de frutos inoculados de vez por injeção no mesocarpo, foi observado crescimento de colônias de bactérias brancas, classificadas como Gram-negativas, ao redor das sementes. Nas placas referentes aos isolamentos das sementes inteiras extraídas de frutos inoculados maduros por injeção na placenta ou mesocarpo, foram observados fungos ao redor das sementes.

**Tabela 1** – Número médio de colônias de *Xanthomonas vesicatoria* (UFC/mL) obtidos a partir de isolamentos indiretos em meio Nutriente Ágar de diferentes partes de frutos de tomate coletados de plantas em diferentes fases fisiológicas (floração, frutos verdes, frutos de vez e frutos maduros) e inoculados por diferentes procedimentos (atomização, injeção na placenta e injeção no mesocarpo).

Estado fisiológico /método de inoculação	Região de isolamento	Nº de UFC/mL – média de três repetições				
		1	2	3	4 **	5
Flor aberta/ atomização	Mesocarpo	>400	*	*	*	*
	Placenta	0	*	*	*	*
	Líquido placentário	0	*	*	*	0
	APPLS	0	*	*	*	0,67
Fruto verde/atomização	Mesocarpo	>400	264,00	*	*	*
	Placenta	0	18,67	*	*	*
	Líquido placentário	0	28,67	*	*	0
	APPLS	0	72,00	*	*	100,00
Fruto verde/injeção na placenta	Mesocarpo	>400	333,33	*	*	*
	Placenta	0	300,00	*	*	*
	Líquido placentário	0	400,00	*	*	0
	APPLS	0	200,00	*	*	100,00
Fruto verde/injeção no mesocarpo	Mesocarpo	>400	306,67	*	*	*
	Placenta	0	200,00	*	*	*
	Líquido placentário	0	400,00	*	*	0
	APPLS	0	400,00	*	*	100,00
Fruto de vez/atomização	Mesocarpo	>400	*	0	*	*
	Placenta	0	*	1,00	*	*
	Líquido placentário	0	*	0	*	100,00
	APPLS	0	*	0	(-)	100,00
Fruto de vez/injeção na placenta	Mesocarpo	>400	*	0	*	*
	Placenta	0	*	0	*	*
	Líquido placentário	0	*	0	*	0
	APPLS	0	*	0	(+)	0
Fruto de vez/injeção no mesocarpo	Mesocarpo	>400	*	166,67	*	*
	Placenta	0	*	17,33	*	*
	Líquido placentário	0	*	0	*	0
	APPLS	0	*	1,67	(-)	0
Fruto maduro/atomização	Mesocarpo	>400	*	0	*	*
	Placenta	0	*	0	*	*
	Líquido placentário	0	*	0	*	0

	APPLS	0	*	0	(-)	0
Fruto maduro/injeção na placenta	Mesocarpo	>400	*	0	*	*
	Placenta	0	*	11,00	*	*
	Líquido placentário	0	*	0	*	0
	APPLS	0	*	1	(+)	0
Fruto maduro/injeção no mesocarpo	Mesocarpo	>400	*	0	*	*
	Placenta	0	*	0	*	*
	Líquido placentário	0	*	0	*	0
	APPLS	0	*	0	(-)	0

\* - Dados não avaliados; \*\* - Avaliação qualitativa, com anotação apenas de presença (+) ou ausência (-).

**Tabela 2** – Detecção de *X. vesicatoria* a partir do isolamento direto de sementes inteiras e sementes trituradas, em meio Nutriente Ágar, de frutos de tomate coletados de plantas em diferentes fases fisiológicas (floração, frutos verdes, frutos de vez e frutos maduros) e inoculados por diferentes procedimentos (atomização, injeção na placenta e injeção no mesocarpo).

Estado fisiológico /método de inoculação	Região de isolamento	Nº de UFC/mL durante as amostragens – média de três repetições				
		1	2	3	4	5
Flor aberta/ atomização	Sementes inteiras	0	*	*	*	*
	Sementes trituradas	0	*	*	*	*
Fruto verde/atomização	Sementes inteiras	0	264,00	*	*	*
	Sementes trituradas	0	18,67	*	*	*
Fruto verde/injeção na placenta	Sementes inteiras	0	333,33	*	*	*
	Sementes trituradas	0	300,00	*	*	*
Fruto verde/injeção no mesocarpo	Sementes inteiras	0	306,67	*	*	*
	Sementes trituradas	0	200,00	*	*	*
Fruto de vez/atomização	Sementes inteiras	0	*	0	*	*
	Sementes trituradas	0	*	1,00	*	*
Fruto de vez/injeção na placenta	Sementes inteiras	0	*	0	*	*
	Sementes trituradas	0	*	0	*	*
Fruto de vez/injeção no mesocarpo	Sementes inteiras	0	*	166,67	*	*
	Sementes trituradas	0	*	17,33	*	*
Fruto maduro/atomização	Sementes inteiras	0	*	0	*	*
	Sementes trituradas	0	*	0	*	*
Fruto maduro/injeção na placenta	Sementes inteiras	0	*	0	*	*
	Sementes trituradas	0	*	11,00	*	*
Fruto maduro/injeção no mesocarpo	Sementes inteiras	0	*	0	*	*
	Sementes trituradas	0	*	0	*	*

\* - Dados não avaliados

Na quinta e última avaliação, foram utilizados frutos inoculados em todos os estágios de desenvolvimento da planta (flor aberta, frutos verdes, de vez e maduros), inoculados por atomização da flor ou epiderme, injeção da placenta ou do mesocarpo e a recuperação de *X. vesicatoria* foi feita, unicamente, a partir dos isolamentos a partir da amostra APPLS e, eventualmente, do líquido placentário dos tratamentos de inoculação de vez por atomização e frutos ainda verdes por atomização e injeção no mesocarpo e na placenta (Tabela 1). Nestas amostras de frutos, porém, não se conseguiu a recuperação de *X. vesicatoria* a partir dos isolamentos das sementes inteiras ou trituradas (Tabela 2). Este resultado deve-se, provavelmente, a realização da assepsia da semente por meio da aplicação de NaClO (0.5%) para reduzir a população de outros microrganismos observados nestas amostras e que interferiram negativamente nos isolamentos de *X. vesicatoria* na avaliação quatro. Provavelmente o tratamento com NaClO também reduziu ou eliminou a população de *X. vesicatoria* associada superficialmente às sementes.

Sementes inteiras, extraídas de frutos inoculados ainda verdes e que não foram tratadas com solução de NaClO (0,5%), quando semeadas sobre o meio NA apresentaram crescimento de *X. vesicatoria* ao seu redor, exceto quando em presença de alta carga microbiana (avaliação 4) ou previamente tratada com NaClO (avaliação 5) (Tabela 2). Concluiu-se assim que, os métodos de inoculação por atomização na superfície dos frutos ou injeção no mesocarpo ou na placenta em frutos verdes foram os mais eficientes e que melhor permitiram a transmissão e recuperação de *X. vesicatoria* a partir das sementes.

Quanto às inoculações em frutos de vez e maduros, o método injeção na região do mesocarpo, apresentou várias colônias de bactérias associados às sementes. A transmissão de *X. vesicatoria* dos frutos para as sementes foi menor se comparado com a inoculação em frutos verdes. O aumento da flora microbiana sobre os frutos maduros pode ter suprimido o crescimento de *X. vesicatoria*.

A inoculação da fitobactéria em flores abertas permitiu recuperação de *X. vesicatoria* apenas da fração água proveniente da primeira lavagem das sementes, confirmando a possibilidade da infecção das sementes de tomate ocorrer por meio de infecção das flores e transmissão de *X. vesicatoria* da planta para as sementes via infecção das flores. A avaliação deste procedimento ou tratamento, no entanto, foi prejudicado pela alta taxa de aborto floral.

De uma forma geral, as inoculações realizadas em frutos verdes forneceram melhores condições de isolamento de *X. vesicatoria* a partir das frações mesocarpo, placenta, líquido placentário, água proveniente da primeira lavagem das sementes e sementes inteiras quando não tratadas previamente com solução de NaClO. As inoculações realizadas em frutos de vez e maduros não foram eficientes no processo de transmissão de *X. vesicatoria* da planta para as sementes devido, provavelmente, ao aumento da população microbiana residente nas sementes e supressão de *X. vesicatoria*.

### **3.5.3 Experimento dois: Seleção do método e da região de inoculação mais eficiente na recuperação de *X. vesicatoria* aplicada em frutos verdes e flor aberta**

No experimento dois, foram avaliados os métodos de inoculação por atomização (flor e epiderme) e injeção (mesocarpo e placenta) em frutos verdes sobre as frações selecionadas no experimento um. A data de isolamento não afetou os resultados (F ns), porém, a data da colheita apresentou efeito altamente significativo. Além disso, os valores de F para tipo de inoculação, para região de isolamento e para interação desses dois fatores foram altamente significativos ( $P < 0,001$ ) confirmando os resultados do experimento um de que existem diferenças significativas entre os métodos de inoculação e as frações de isolamento dos frutos (APPLS, mesocarpo e semente) quanto a recuperação de *X. vesicatoria* (Tabela 3).

**Tabela 3** - Análise da variância dos métodos de inoculação aplicados aos frutos verdes (atomização da epiderme, injeção na placenta e injeção no mesocarpo) sobre as frações isoladas dos frutos (mesocarpo, LP + APPLS e semente).

	ANOVA			
	GL	SQ	QM	F
Método de inoculação (MI)	2	338.33	169.17	81.43***
Fração do fruto isolada (FI)	2	267.49	133.74	64.37***
MI x FI	4	111.75	27.94	13.45***
Data de colheita (DC)	3	27.90	9.30	4.48**
Data de isolamento (DI)	4	12.25	3.06	1.47 ns
Resíduo	150	308.83	2.06	-

Ao se analisar os resultados dos isolamentos de *X. vesicatoria* a partir de amostras de frutos e sementes dos diferentes tratamentos, observou-se, de forma geral, maior recuperação de *X. vesicatoria* das amostras obtidas de frutos verdes inoculados por injeção da suspensão bacteriana no mesocarpo, porém com diferença não significativa em relação à placenta. Esses dois métodos de inoculação foram superiores ao método de inoculação por atomização da suspensão bacteriana na epiderme, tendo permitido a recuperação da fitobactéria nos isolamentos a partir do líquido placentário e da fração água proveniente da primeira lavagem das sementes, mesocarpo e semente. Os isolamentos a partir de amostras de frutos inoculados por atomização resultaram em muito baixa recuperação de *X. vesicatoria* com valores próximos a zero em todas as frações isoladas (Tabela 4).

Comparando-se as diferentes partes dos frutos da quais foram realizados os isolamentos, pode-se constatar significativamente maior taxa de recuperação de *X. vesicatoria* dos isolamentos realizados a partir do líquido placentário e da água resultante da primeira lavagem das sementes (LP + APPLS) em comparação àqueles realizados a partir da fração mesocarpo, que por sua vez foi superior àqueles realizados a partir das sementes (Tabela 4). Este resultado mostra que *X. vesicatoria* está associada às sementes superficialmente, visto que a fração referida (LP + APPLS) compreende a mistura do líquido placentário com a água proveniente da primeira lavagem das sementes.

**Tabela 4** – Médias do número de colônias de *X. vesicatoria* (UFC/mL), obtidos a partir do isolamento das frações mesocarpo, líquido placentário + água proveniente da primeira lavagem das sementes (LP+APPLS) e sementes inteiras (SI) de frutos verdes inoculados por diferentes métodos (atomização (AE), injeção na placenta (IP) e injeção no mesocarpo (IM)).

Tratamento	Fração do fruto isolada						Médias	
	LP+APPLS		Mesocarpo		Semente			
(2) FVAE	1,045 d	0,843	1,012 d	0,751	0,693 d	0	0,917B	0,501
(3) FVIP	5,344 a	207,348	2,901 c	16,192	0,794 d	0,212	3,013A	18,348
(4) FVIM	4,254 b	68,386	4,228 b	66,580	0,693 d	0	3,058A	19,292
Médias	3,548 A	32,732	2,714 B	13,084	0,727 C	0,068		

Valores em caracteres normais foram obtidos da transformação dos dados pela expressão  $\ln(x+2)$ . Valores em negrito foram destransformados a partir dos resultados transformados. Letras diferentes, minúsculas no interior da tabela e maiúsculas na última linha ou coluna, indicam médias que diferem pelo teste “t”, a 5%.

Considerando apenas os tratamentos de inoculação em frutos verdes, por injeção da suspensão bacteriana na região da placenta (FVIP) e do mesocarpo (FVIM), a melhor fração para a realização dos isolamentos foi a partir do líquido placentário mais água proveniente da primeira lavagem das sementes.

Considerando a combinação método de inoculação e fração de isolamento, a melhor recuperação de *X. vesicatoria* foi a partir de amostras extraídas de frutos verdes inoculados por meio de injeção da suspensão bacteriana na região da placenta e o isolamento a partir da fração LP+APPLS, indicando que esse método de inoculação possibilita estabelecimento mais rápido de *X. vesicatoria* nas regiões próximas e na superfície da semente.

Quando os frutos verdes foram inoculados por injeção na região do mesocarpo, observou-se que a fração da qual mais se recuperou a bactéria foi o mesocarpo, porém houve migração da bactéria para o interior do fruto e colonização das regiões adjacentes às sementes. Da mesma forma, a inoculação por atomização da epiderme, apesar de menos eficiente que as inoculações por injeção, também permitiu a transmissão até a semente.

A inoculação de flores abertas, também resultou em desenvolvimento de *X. vesicatoria* na região interna dos frutos, comprovada pela recuperação de *X. vesicatoria* da fração LP+APPLS em duas amostras de frutos o que prova a transmissão de *X. vesicatoria* da planta para a semente a partir da infecção de flores abertas. No entanto, dada a baixa frequência dos isolamentos optou-se por excluir essas amostras das análises estatísticas.

### 3.5.4 Experimento três: Determinação de taxa de infecção das sementes e das alterações morfológicas dos frutos

Os procedimentos de inoculação dos frutos verdes por injeção na região da placenta promoveram fermentos que resultaram em apodrecimento de alguns frutos, decorrentes, provavelmente da entrada de patógenos causadores de podridão. Estes apodrecimentos resultaram em queda prematura dos frutos. Naqueles frutos que permaneceram na planta, observou-se redução de tamanho, comparado aos frutos não inoculados, em cerca de 50% (Figura 1). Ou seja, a bactéria acelerou o processo de maturação, resultando em redução do tamanho do fruto, ou em alguns casos, queda prematura. A redução do tamanho dos frutos na presença da fitobactéria, foi acompanhada pela redução do número de sementes viáveis (aptas a germinar) em cerca de 50%. Desta forma, em frutos não inoculados, foram observados em média, 100 sementes por fruto, enquanto que em frutos inoculados, esse valor foi da ordem de 49 sementes por fruto. Em muitos casos, observou-se a interrupção do crescimento dos frutos após a inoculação ou a sua queda.



**Figura 1** – Frutos de tomateiro colhidos no Setor de Horticultura da UFRRJ. Da esquerda para a direita: fruto não inoculado (sadio); fruto inoculado apresentando lesão provocada pela infecção de *X. vesicatoria*.

Quanto à cor da polpa, observou-se que os frutos sadios apresentaram cor de polpa vermelho intenso enquanto os frutos inoculados apresentaram cor vermelho esverdeada e lóculos danificados, lembrando o ataque de brocas (Figura 2). Muitos frutos inoculados, externamente se apresentavam como íntegros, exceto pelo sinal do ferimento da inoculação, porém, ao serem cortados, constatavam-se alterações internas como cor de polpa esverdeada e o número de sementes reduzido.



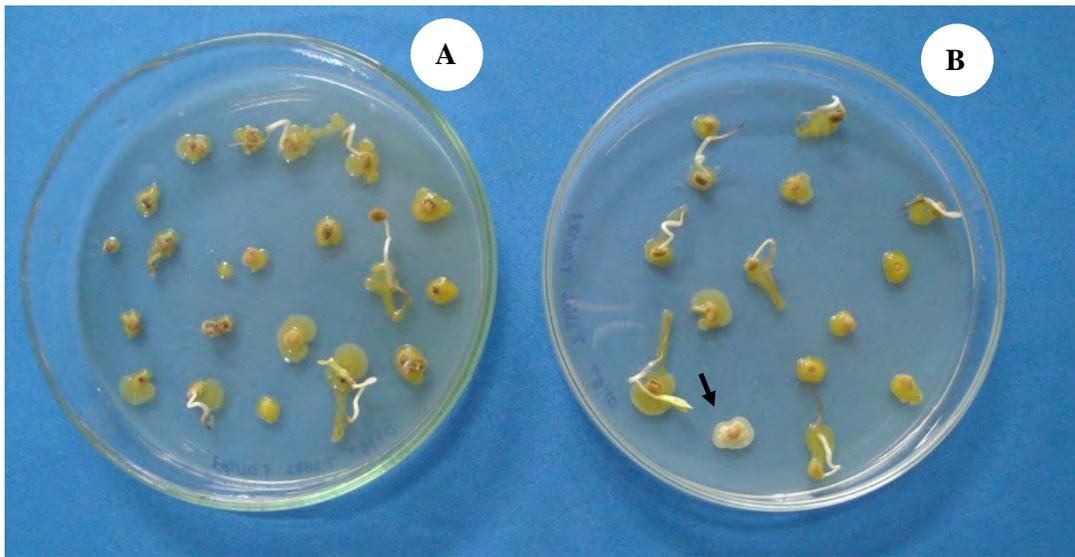
**Figura 2** – Seção longitudinal de frutos de tomate mostrando: A) - Corte longitudinal de fruto sadio, polpa de cor vermelho intenso e sementes íntegras; B) Corte longitudinal de frutos, ainda verdes, inoculados com *X. vesicatoria* por injeção da suspensão bacteriana na região da placenta com alterações na cor da polpa e lesões internas com a polpa destruída (1B) e fruto com polpa de cor esverdeada próximo da área de inoculação (2B).

Além da redução do tamanho do fruto, aproximadamente à metade do tamanho de um fruto sadio, observou-se também redução do número de sementes viáveis por fruto, também reduzido à metade. Acredita-se que a introdução do patógeno tenha acelerado o processo de maturação e interrompido a translocação de assimilados e, conseqüentemente, o desenvolvimento do fruto e formação das sementes. Nestes frutos, observou-se maior número de sementes vestigiais em comparação com frutos não inoculados, sugerindo que o processo de formação das sementes foi interrompido.

Durante a formação da semente, o endosperma e o embrião não se desenvolvem ao mesmo tempo. Na maioria das plantas o desenvolvimento do endosperma precede o desenvolvimento do embrião (MENTEN E BUENO, 1987). Quando *X. vesicatoria* é inoculada em frutos verdes, a planta, provavelmente, aciona mecanismos de defesa contra a bactéria, fazendo com que o processo de germinação dos zigotos (xenofítico e esporofítico)

seja interrompido. Provavelmente, o processo de germinação do endosperma (zigoto xenofítico) se inicia, mas não produz o número de células suficiente para ativar a geminação do zigoto esporofítico (embrião). Como resultado, o número de sementes com o embrião maduro ou pronto para germinar é reduzido e o surgimento de sementes vestigiais, abortadas na fase de desenvolvimento proembrionário, aumenta.

Algumas sementes extraídas de frutos inoculados apresentavam características normais quanto ao tamanho e à cor, porém, quando semeadas em meio NA, apresentaram crescimento de *X. vesicatoria* ao seu redor. Outras sementes apresentavam cor verde escuro e crescimento de *X. vesicatoria* quando semeadas sobre NA. As sementes de frutos não inoculados apresentavam-se, em sua maioria, viáveis e sempre isentas de contaminação por *X. vesicatoria* (Figura 3).



**Figura 3** – Sementes de tomateiro semeadas em placas de Petri vertidas com meio NA. (A) Sementes inteiras extraídas do fruto n. 1, inoculado por *X. vesicatoria* ainda verde, por injeção na região da placenta exibindo infecção; (B) semente colonizada por microflora residente que suprimiu o crescimento de *X. vesicatoria* (seta).

Os frutos inoculados por injeção na placenta apresentavam lesões externas típicas da doença, como manchas necróticas ao centro e bordas amarelas. Ao redor do local de inoculação formavam-se área de aparência escura e encharcada (sintoma de anasarca) (Figura 1). Segundo ROBBS (1985), os sintomas iniciais da doença em frutos surgem na forma de pequenas áreas encharcadas e escuras e com halos amarelados que com o tempo aumentam de tamanho e passam a apresentar bordos ligeiramente elevados e aparência áspera, irregular e com o centro deprimido, lembrando crateras escurecidas.

Foi observado o crescimento de *X. vesicatoria* em praticamente todas as sementes (Tabela 5, Figura 3), após os isolamentos diretos a partir das sementes em meio de cultura NA. No plaqueamento direto das sementes observou-se crescimento de bactérias, leveduras e bacilos associados ou não à presença de *X. vesicatoria*. O número médio de sementes colonizadas por esses microrganismos foi de 19,67% por fruto. Dos isolamentos diretos realizados a partir de sementes extraídas de frutos saudáveis, foi observado crescimento da mesma flora (Figura 4), o que permite concluir que esses microrganismos são residentes das sementes, ou as colonizam sem causar doença ou danos.

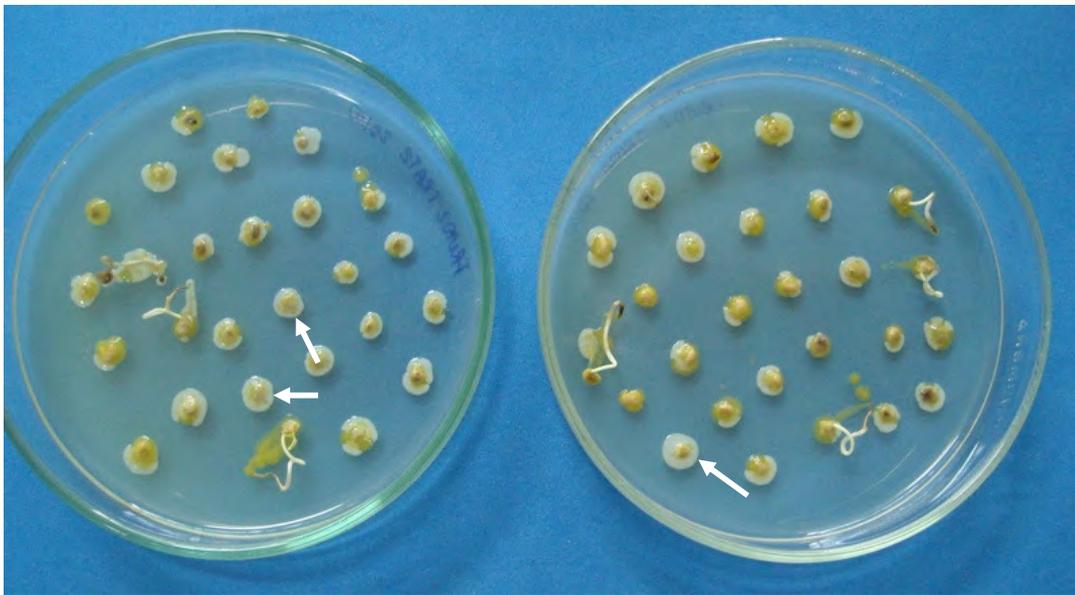


**Figura 4** – Sementes de tomate extraídas de frutos sadios e semeadas em placas de Petri vertidas com meio de cultura NA. Observa-se crescimento de microrganismos residentes ao redor das sementes.

Após semeio das sementes em meio NA, observou-se crescimento de microflora residente sobre as sementes extraídas tanto de frutos inoculados quanto de frutos não inoculados. Foi observado que, as sementes de alguns frutos inoculados apresentavam somente crescimento de *X. vesicatoria*, enquanto que em sementes de outros frutos, a fitobactéria se desenvolveu associada a leveduras, bactérias e bacilos. Em algumas sementes, observou-se maior presença de *X. vesicatoria* do que desses microrganismos e em outras, mais bactérias, bacilos e leveduras do que *X. vesicatoria* (Figuras 3, 5, 6 e 7). Foram observadas também, sementes colonizadas apenas por essa microflora, sem a presença de *X. vesicatoria* (Figura 5), sugerindo a possibilidade de competição entre a microflora e *X. vesicatoria*. Esta hipótese foi confirmada pelo teste de inoculação de sementes extraídas de frutos sadios com *X. vesicatoria* quando foi observado o crescimento da microflora sobre as sementes e redução do crescimento de *X. vesicatoria* (Figura 2A), o crescimento da microflora sobre as sementes foi mais agressivo que o de *X. vesicatoria*. Esses microrganismos cresceram e as colônias foram visíveis após 12 horas do semeio, enquanto que as colônias de *X. vesicatoria* somente foram visíveis cerca de 48 horas após a incubação. A identificação desta flora residente em sementes de tomate pode ser importante no desenvolvimento de controle biológico da mancha bacteriana, uma vez que o seu estabelecimento é mais rápido que o do patógeno. Ou seja, os sítios de ação da bactéria serão rapidamente ocupados dificultando o estabelecimento de *X. vesicatoria*. Ji et al. (2006), constataram que o tratamento de sementes com *Bacillus pumilus* suprimiu a mancha bacteriana em campos de cultivo de tomateiro no Alabama, EUA.



**Figura 5** - Sementes de tomate extraídas de frutos inoculados com *X. vesicatoria* por injeção na placenta e semeadas em placas de Petri vertidas com meio de cultura NA. As sementes extraídas desse fruto possuem maior número de sementes colonizadas pela microflora que infectadas por *X. vesicatoria*.



**Figura 6** - Sementes de tomate extraídas de fruto inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por injeção na região da placenta que foram semeadas em placas de Petri vertidas com meio NA. Algumas sementes são infectadas apenas por *X. vesicatoria* (colônia amarela), outras colonizadas pela flora residente (colônia branca) e a maior parte por ambas (colônias amarela e branca). Nota-se crescimento de *X. vesicatoria* reduzido em sementes colonizadas pela microflora.



**Figura 7** – Sementes de tomateiro extraídas de fruto inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por injeção na região da placenta que foram semeadas em placas vertidas com meio NA. Nota-se que todas as sementes estão infectadas por *X. vesicatoria* e que apenas uma semente apresenta crescimento de outro microrganismo (seta).

Quanto ao crescimento da flora microbiana a partir de sementes comerciais, não foi observado crescimento, possivelmente, as técnicas de beneficiamento aplicadas às sementes comerciais eliminaram essa microflora.

O número de sementes por fruto infectado calculado a partir de uma lote de 15 frutos, foi de 49,27 sementes. Dessa mesma amostra, o número médio de sementes infectadas por fruto foi de 48,53 sementes, o equivalente a 98,70% das sementes existentes em cada fruto (Tabela 5). Os frutos inoculados por *X. vesicatoria* apresentaram número de sementes aproximadamente 50% menor que frutos saudáveis.

**Tabela 5** – Número médio de sementes por frutos, extraídas de frutos frescos inoculados ainda verdes por injeção na região da placenta; número médio de sementes infectadas por *X. vesicatoria*; porcentagem do número de sementes por fruto infectadas por *X. vesicatoria*; número de sementes por fruto colonizadas pela flora microbiana; e número médio de sementes por fruto, extraídas de frutos frescos saudáveis.

	Número médio de sementes por fruto	Sementes infectadas com <i>X. vesicatoria</i> (semente/fruto)		Microflora residente
		Número médio	Porcentagem	
Frutos inoculados	49,267	48,533	0,987	19,667
Frutos saudáveis	100,000	0	0	0

### 3.6 CONCLUSÕES

- 1) A inoculação da flor com *X. vesicatoria* promove alta taxa de abortamento e queda de flores;
- 2) As inoculações em frutos verdes são mais eficientes no processo de transmissão da bactéria da planta para a semente do que a inoculação de frutos de vez ou maduros.
- 3) A baixa recuperação de *X. vesicatoria* a partir da inoculação de frutos de vez ou maduros, provavelmente, está associado ao aumento da população microbiana residente das sementes, que inibe o desenvolvimento da fitobactéria..
- 4) Os três métodos de inoculação em frutos verdes testados, atomização na epiderme, injeção no mesocarpo e injeção na placenta proporcionaram a transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* da planta para a semente.
- 5) A inoculação por injeção na região da placenta, foi a mais eficiente, permitindo uma taxa de infecção de semente de 98%;
- 6) A transmissão de *X. vesicatoria* da planta para a semente pode ocorrer via infecção das flores, pois a inoculação de *X. vesicatoria* em flor aberta permitiu a transmissão da fitobactéria para a semente.
- 6) A inoculação por injeção na região da placenta paralisa o crescimento do fruto e acelera o processo de maturação resultando em redução de tamanho do fruto e número de sementes por fruto.

### 3.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, E.; ROSSETO, E.A. Doenças e injúrias de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. **Patologia de sementes**. Campinas:Fundação Cargill.1987. p. 164-191.
- 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. **Phytoparasítica**, n.11, p. 187-193, 1983.
- CAÇANDO JR., F.L.; CAMARGO FILHO, W.P.; ESTANISLAU, M.L.L.; PAIVA, B.M.; MAZZEI, A. R.; ALVES, H.S. Aspectos econômicos da produção e comercialização do tomate para a mesa. **Informe Agropecuário**. v. 24, n. 219, 2003.
- 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, jul-set, 2004.
- CARRIJO, O. A. e MAKISHIMA, N. cultivo do tomateiro em casa de vegetação. **Informe Agropecuário**. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, v. 24, p. 98-107. 2003.
- COCUCCI, A.J.; MARIATH, J.E.A. **Gametogênese, fecundação, seleção do gametófito mais apto, embriogênese e diásporo maduro**. IN: Ferreira, A. G; Borghetti, F. Germinação: Do básico ao aplicado. p. 15-30, 2004.
- FAHY, P.C.; HAYWARD, A.C. Media an 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.
- GOSZCZYNSKA, T.; SERFORTEIN, J.J. Milk-Tween agar, a semiseletive medium for isolation and different action of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *phaseicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Jornal of Microbiological Methods**. v. 32, p. 65-62, 1998.
- JI, P.; CAMPBELL, H.L; KLOEPPER, J.W.; JONES, J.B.; SUSLOW, T.V.; WILSON, M. Integrad biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological agents and plant growth promoting rhizobacteria. **Biological control**, n. 36, p. 358-367, 2006.
- KUTSCHERA, U. Bacterial colonization of sunflower cotyledons during seed germination. **Journal Applied Botany**, v.76, p. 96-98. 2002.
- LYNCH, J.M. Microbial interactions around imbibed seeds. **Annual Applied Biology**, v. 89, p. 165-67. 1978.
- MARIANO, R.L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife, UFRPE. 2000. 171p.

MCKELLAR, M.E.; NELSON, E.B. Compost-induced suppression of Pythium damping-off is mediated by fatty-acid-metabolizing seed-colonizing microbial communities. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 452-460, 2003.

MENTEN, J.O.M; BUENO, J.T. Transmissão de doenças pelas sementes. **In:** SOAVE, J. e WETZEL, M.M.V.S. (ed) **Patologia de sementes**. Campinas:Fundação Cargill.1987. p. 164-191.

NASCIMENTO, W.M. Produção de sementes. **In:** SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L. **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa Comunicações para transferência de tecnologia/Embrapa Hortaliças, p. 144-149, 2000.

NEERGAARD, 1979. **Seed Pathology**. London e Basingstoke, The Mac Millan Press, Ltd., v. I e II., 1979. 1187 p.

NELSON, E.B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual. Review Phytopathology**, n. 42, p. 271-309, 2004.

NORMANDER, B.; PROSSER, J.I. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p.4372-4377, 2000.

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S.; MEZENCIO, J. M. S.; MIGUEL, D. S. Comparação de métodos para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, n. 20, p. 377, 1995. (Resumo).

PARKE, J.L.; RAND, R.E.; JOY, A.E.; KING, E.B. Biological control of Pythium damping-off and Aphanomyces root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P.fluorescens* to seeds. **Plant Disease**, v. 75, p. 987-992, 1991.

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

ROMEIRO, R. S.; OLIVEIRA, J.R.; MELO, L. M.M. Etiologia e transmissão pela semente de uma bacteriose da cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 15, n 2, p. 221-226, 1993.

SCHAAD, N. W.; FORSTER, R. A semmi-seletive medium agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seed. **Seed science and Technology**, n. 8, p. 383-391. 1982.

SILVA, A.M.S. **Deteção e erradicação de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomate**. 1999. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências): Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SIMON, E.W. e MATHAVAN, S. The time course of leakage from imbibing seeds of different species. **Seed Science Technology**, v. 14, p. 9-13. 1986.

SIMON, E.W. e RAJA HARUN, R.M. Leakage during seed imbibition. **Journal of Experimental Botany**, v. 23, p. 1076-85, 1972.

SING, R. A.; RAO, M. H. S. A simple technique for detecting *Xanthomonas oryzae* in rice seeds. **Seed science and Technology**, n.5, p. 123-127, 1977.

TSIANTOS, J. Transmission of bacterium *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis* by seeds. **Phytopathology**, n. 77, p. 142-146. 1987.

UMESHA, S. Occurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. **Crop Protection**, v.25, p. 375-381, 2006.

WELLER, D.M.; SAETTLER, A.W. Evaluation of seed- borne *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, p.148-152, 1980.

ZAIDAN, L.B.P.; BARBEDO, C.J. Quebra de dormência em sementes. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: Do básico ao aplicado**. p. 15-30, 2004.

## **4 CAPÍTULO II**

### **TRANSMISSÃO DE *Xanthomonas vesicatoria* DA SEMENTE PARA PLANTA DE TOMATE**

#### 4.1 RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar o processo de transmissão de *Xanthomonas vesicatoria* de sementes para plântulas de tomate, cultivar Santa Clara Miss Brasil. Para tanto, foi avaliada a taxa de recuperação de *X. vesicatoria* a partir de sementes e de partes das plântulas (raiz, tegumento, hipocótilo, folhas cotiledonares, epicótilo e folhas definitivas), germinadas e desenvolvidas em diferentes substratos (papel germitest, areia e substrato comercial para produção de mudas). As avaliações foram feitas por meio de isolamentos diretos e indiretos em meio de cultura Nutriente Agar (NA). Inicialmente, foram utilizadas sementes inoculadas a vácuo, mais duas testemunhas (sementes sem tratamento e sementes submetidas ao vácuo em solução tampão sem a fitobactéria). As avaliações foram feitas por isolamentos logo após a aplicação dos tratamentos e às 12, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas após incubação das sementes a 25° C. Os mesmos procedimentos foram também utilizados em sementes inoculadas por meio da injeção na placenta dos frutos. Em seguida, foram feitas avaliações em ensaios sob condições de câmara de crescimento, utilizando-se areia autoclavada como substrato, e de casa de vegetação, utilizando-se substrato comercial para produção de mudas. Em ambos os ensaios, foram utilizadas sementes extraídas de frutos, inoculados ou não pela bactéria, e sementes inoculadas à vácuo ou não. Nas plântulas originadas de sementes inoculadas, foi observada a presença de colônias de *X. vesicatoria* sobre as radículas em todos os tempos estudados e em hipocótilos e folhas cotiledonares a partir de 96 horas do semeio. No ensaio em condições de câmara de crescimento, a presença de *X. vesicatoria* colonizando o tegumento e a radícula pode ser observada a partir de 96 horas do semeio e, aos 14 dias, a fitobactéria pode ser re-isolada de todas as partes das plântulas, com maior população nas folhas, seguido do hipocótilo e raízes. Aos 30 dias após o semeio, observou-se presença de *X. vesicatoria* sobre as folhas definitivas. No teste em condições de casa de vegetação, pode-se re-isolar a fitobactéria de todas as partes das plântulas aos sete, 14 e 21 dias após o semeio. Aparentemente, a colonização por *X. vesicatoria* do tegumento da semente e dos órgãos emitidos é apenas superficial, com maior população bacteriana no tegumento às 48 horas após o semeio, nas raízes e hipocótilo a partir de 96 horas, nas folhas cotiledonares às 168 horas, no epicótilo às 336 horas e nas folhas definitivas a partir deste período. A população da bactéria foi, em geral, maior nas regiões próximas aos sítios de liberação de exsudados como a região de protusão e alongamento das raízes.

**Palavras chave:** germinação, tomate, mancha bacteriana.

## 4.2 ABSTRACT

The present work has the objective of studying the process of transmission of *Xanthomonas vesicatoria* from the seeds to the seedlings of tomato, cultivar Santa Clara Miss Brasil. To this end, we evaluated the recovery rate of *X. vesicatoria* on seeds and parts of seedlings (root, tegument, radicles, hypocotyl, cotyledon leaves, epicotyl and definite leaves), germinated and developed in different substrata ("germitest" paper, sand, and commercialized substrate for saplings). The evaluations were made by direct and indirect isolations in an Agar Nutrient (AN) culture medium. Initially, we used vacuum inoculated seeds, plus two witnesses (untreated seeds and seeds which had been submitted to vacuum in a buffer solution without the phytobacteria). The evaluations were made through isolations soon after the application of treatments and at 12, 24, 30, 36, 48, 72, and 96 hours after the incubation of the seeds at 25°. The same procedures were used in seeds inoculated with injections in the fruit placenta. Then, evaluations were made in essays under growing chamber conditions, using autoclaved sand as substrate, and in greenhouse, using commercialized substrate to produce saplings. In both essays, were used seeds extracted from fruit, inoculated with the bacteria or not, and seeds inoculated by vacuum or not. In the seedlings originated from inoculated seeds, it was noticed the presence of colonies of *X. vesicatoria* on the radicles at all the times studied, and on hypocotyls and cotyledon leaves 96 hours after sowing. In the essay made under conditions of growing chamber, it could be noticed the presence of *X. vesicatoria* colonizing the tegument and the radicle 96 hours after the sowing and, after 14 days the phytobacteria could be isolated from every part of the seedlings, with a greater population on the leaves, followed by the hypocotyls and roots. Thirty days after the sowing, it was observed the presence of *X. vesicatoria* on the definitive leaves. In essay under greenhouse condition, we could re-isolate the phytobacteria from every part of the seedlings seven, 14, and 21 days after the sowing. Apparently, the colonization by *X. vesicatoria* of the seed tegument and of the sprouted organs is only superficial, with a greater bacterial population on the tegument 48 hours after the sowing; on the roots and hypocotyl after 96 hours; on the cotyledon leaves after 168 hours; on the epicotyl after 336 hours; and on the definitive leaves from this period on. The bacterial population was generally greater in the regions near the liberation sites of exudates like the region of protrusion and elongation of roots.

**Key-words:** germination, tomato, bacterial stain.

### 4.3 INTRODUÇÃO

Bactérias fitopatogênicas podem estar associadas às sementes tanto infectando quanto infestando-as e ser eficientemente transmitida (KAVITHA e UMESHA, 2007; KIMURA et al., 1989; SALES et al., 1991). ROMEIRO (2005) cita possibilidades de localização de fitobactérias em sementes: aderidas aos tricomas, debaixo do tegumento da semente, externamente aderidas ao tegumento e embrião. Segundo esse mesmo autor, a localização de fitobactérias em sementes ocorre em função do tipo de associação bactéria-planta, época em que ocorre a infecção, tipo de infecção (localizada ou sistêmica), condições ambientais, modo de coleta das sementes e outros.

De modo geral, a transmissão de fitobacterioses por sementes é baixa (SCHAAD, 1989), contudo, a utilização de sementes infectadas pode resultar na produção de mudas contaminadas, que sob condições favoráveis de temperatura e umidade, pode ocasionar sérios prejuízos ao produtor, como a destruição dos cotilédones e das folhas, retardando o crescimento das plantas e a introdução precoce da doença nas lavouras.

Para que a transmissão aconteça e dê origem a plantas doentes, é necessário que as condições do ambiente estejam favoráveis ao desenvolvimento da fitobactéria, tanto no que diz respeito a temperatura e umidade como pH e flora microbiana presente na semente e substrato. Também é preciso que a fitobactéria disponha de outros mecanismos de sobrevivência como no solo, restos culturais, rizosfera ou como população residente no filoplano (ROMEIRO, 2005). Observou-se, segundo LEBEN (1981), que *X. vesicatoria* podia se multiplicar na superfície de plantas sadias de tomate. SILVA (2004) também observou população residente de *X. euvesicatoria* sobre o filoplano de plantas sadias de pimentão.

Numerosos estudos têm fornecido evidências de que as sementes abrigam comunidades microbianas diversas, não só na superfície como também dentro do embrião (BACILIO-JIMENEZ et al., 2001; NORMANDER e PROSSER, 2000). A multiplicação dessas comunidades é estimulada durante o processo de germinação da semente (BUYER et al., 1999; SIMON et al., 2001), quando substâncias internas da semente são liberadas através do tegumento rompido pelo intumescimento da semente. Segundo NELSON (2004), minutos após o início da embebição das sementes, ocorre a liberação de altíssimos níveis de exsudados. Na maioria das espécies de plantas, a maior parte dos exsudados são liberados dentro das primeiras 12 horas de semeadura. Esses exsudados são utilizados como fonte de alimento por essas comunidades.

Pesquisas têm demonstrado que bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas e reduzir sintomas de doenças por diversos patógenos (HALLMANN et al., 1997). Espécies de microrganismos endógenos têm sido introduzidas em sementes com o objetivo de aumentar a fixação de nitrogênio (NORMANDER e PROSSER, 2000; BODDEY e DOBEREINER, 1995), promover o crescimento da planta ou promover o controle biológico de doenças, seja este pelo antagonismo direto da microflora deletéria ou pela indução da resistência sistêmica (NORMANDER e PROSSER, 2000; HALLMANN et al., 1997). Como consequência, tem-se observado efeitos significativos sobre a sanidade das sementes e o estabelecimento de longevidade de plântulas de sementes colonizadas por essas comunidades (NORMANDER e PROSSER, 2000). As bactérias endofíticas podem promover o crescimento de plantas pela produção de hormônios vegetais ou substâncias análogas (ASHAD e FRANKENBERGER, 1991).

SILVA (2004) observou que a altura de plantas de tomateiro foi afetada pela introdução de algumas bactérias endofíticas, sendo que *Acinetobacter johnsonii* e *Bacillus pumilus* promoveram a maior alturas das plantas em 9,5% e 20,2%.

Estudos apontam mecanismos importantes que microrganismos endógenos ou introduzidos na semente utilizam para suprimir as infecções provocadas por patógenos

(NELSON, 2004). Observações descritas por HADAR et al. (1983) e NELSON et al. (1986) revelam um período bastante curto de vulnerabilidade de sementes em processo de germinação para a infecção de patógenos, que em geral, ocorre entre 12 e 24 horas. Então, esse período é o momento crítico para os organismos usados no controle biológico expressarem características de supressão. Ou seja, as características dos microrganismos necessárias para suprimir o patógeno ou ativar respostas de defesa da planta devem ser ativadas e expressas entre 12 e 24 horas após a semeadura (PARKE, 1990). Essas características variam consideravelmente entre espécies e também entre estirpes dentro da mesma espécie (SIMON et al., 2001). Algumas espécies de bactérias são mais adaptadas para colonizar a espermosfera diretamente do solo, outras são mais adaptadas para colonizar a espermosfera vindo diretamente da semente (KLOEPER et al., 1985).

O desenvolvimento e a ecologia de microrganismos específicos que colonizam as sementes horas imediatamente após o semeio, pode ser uma estratégia interessante para evitar o estabelecimento de organismos fitopatogênicos em sementes recém germinadas. Por isso, o conhecimento das características da espermosfera e das interações entre a semente e os microrganismos nesse ambiente é importante em estudos de patologia de sementes ou que envolvam microrganismos benéficos.

Determinar o processo de colonização das sementes e plântulas de tomate por *X. vesicatoria* ao longo da germinação e desenvolvimento de plântulas de tomateiro é importante para o desenvolvimento de técnicas eficientes de controle da doença, além de se descobrir possíveis agentes endógenos que possam suprimir a fitobactéria no período inicial da germinação. O objetivo deste capítulo foi monitorar o processo de transmissão da fitobactéria da semente para a plântula, avaliando a população de *X. vesicatoria* desde o início do processo de embebição, germinação até a formação completa da plântula (raiz, tegumento, hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas).

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo do mecanismo de transmissão de *X. vesicatoria* da semente para a plântula foi realizado no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Utilizaram-se sementes da cultivar Santa Clara Miss Brasil, adquiridas de firma produtora de sementes, sem tratamento prévio com fungicidas, e sementes extraídas de frutos verdes inoculados com *X. vesicatoria* por infiltração na região da placenta.

Nos diferentes ensaios foram utilizados os isolados ENA 4336 e ENA 4483, previamente inoculados em plantas de tomate e re-isoladas em cultura pura (item 3.4.1).

As suspensões bacterianas foram preparadas utilizando-se culturas de *X. vesicatoria* com 48 horas de crescimento em meio NA a 28 °C e solução tampão fosfato mais cloreto de sódio (0,005N e pH 7,4 ( $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ )+ NaCl (0,85%)). Alíquotas da solução tampão foram adicionadas a tubos contendo a cultura seguido de repouso por 20 minutos, quando foram levemente agitadas e diluídas em solução tampão visando ajuste para concentração de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL em espectrofotômetro (85% de transmitância).

### 4.4.1 Experimento um: Inoculação a vácuo e por imersão

O experimento um, realizado em junho de 2007, teve como objetivo definir o método de inoculação a ser usado nos testes de transmissão.

De um lote de sementes de tomate, foram tomadas quatro amostras contendo 400 sementes cada e inoculada por imersão ou a vácuo, mais duas testemunhas correspondentes à aplicação dos mesmos procedimentos, utilizando-se a solução tampão.

A inoculação por imersão foi feita pela adição de 400 sementes em 30 ml de suspensão bacteriana seguido de repouso por 24 horas a 28 °C. Após esse período, as sementes foram retiradas e depositadas em placas de Petri contendo papel germitest esterilizado, sob condições assépticas e mantidas sob temperatura ambiente ( $\pm 30$  °C) por um período de 24 horas. A testemunha correspondente a esse método de inoculação, foi preparada a partir da imersão das sementes na solução tampão sem a bactéria. Após, as sementes foram submetidas ao mesmo tratamento descrito para as sementes inoculadas.

A inoculação a vácuo foi feita por meio da imersão das sementes na suspensão bacteriana seguido da aplicação de vácuo (680 mm de Hg) durante cinco minutos, com liberação lenta em três ciclos sucessivos. Como testemunha, para esse método de inoculação, foram utilizados os mesmos procedimentos, utilizando-se apenas a solução tampão sem a fitobactéria.

Sementes de cada um dos quatro tratamentos, foram semeadas em caixas gerbox, contendo duas folhas de papel germitest umedecido com água esterilizada, na quantidade equivalente a duas vezes e meia o peso do papel (BRASIL, 1992). A seguir, as caixas foram acondicionadas em câmara BOD ajustada para temperatura de 28 °C e umidade relativa de 70%, com fotoperíodo de 12 horas. Retiraram-se amostras de sementes e de diferentes partes das plântulas (raiz, hipocótilo, tegumento e folha cotiledonar) as zero, 12, 24, 30, 36, e 48 horas após o semeio para isolamentos diretos e indiretos.

Os isolamentos diretos consistiram no plaqueamento das sementes diretamente sobre o meio de cultura NA. De cada tratamento e para cada tempo avaliado, foram utilizadas 30 sementes, distribuídas em três placas de Petri.

Nos isolamentos indiretos, de cada tratamento e para cada tempo avaliado, tomaram-se cinco sementes que foram imersas na seqüência em álcool (70%), hipoclorito de sódio (NaClO 0,5%) e água destilada estéril (MARIANO, 2000). Em seguida, as sementes foram

adicionas a tubos de ensaio contendo 5,0 ml de solução salina (NaCl (0,85%)) onde ficaram em repouso por 20 minutos, quando os tubos foram agitados e as amostras retiradas. Para cada tubo foram tomadas três alíquotas de 0,1 ml que foram distribuídas em três placas de Petri contendo meio NA e espalhadas com uma “alça de Drigalsky”.

As placas referentes aos isolamentos diretos e indiretos foram acondicionadas em câmara BOD regulada para temperatura de  $28 \pm 2^\circ \text{C}$ , por 48 horas, quando foram feitas as avaliações. Paralelamente, ao longo das seis avaliações, amostras de três sementes por tratamento foram retiradas e colocadas em tubos ependorf, contendo solução de gutaraldeído (2,5%), e armazenadas em geladeira para testes posteriores.

As avaliações nos isolamentos diretos foram feitas pela observação e confirmação da presença de *X. vesicatoria* em cada semente e nos isolamentos indiretos pela contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente pelos testes ‘F’ e ‘t’ a 5% de probabilidade.

#### **4.4.2 Experimento dois: Transmissão de *X. vesicatoria* de sementes inoculadas a vácuo para as plântulas**

No experimento dois, realizado em junho de 2007, utilizou-se o método de inoculação a vácuo, mais duas testemunhas, semente original (sem nenhum tratamento) e sementes submetidas ao procedimento a vácuo em solução tampão sem a fitobactéria (testemunha vácuo). Para tanto, foram tomadas três amostras contendo 850 sementes cada, das quais duas foram submetidas ao procedimento a vácuo (com e sem a fitobactéria) (item 5.3.1) e uma não. Logo em seguida, as sementes foram semeadas sobre duas folhas de papel germitest umedecido com água estéril na quantidade equivalente a duas vezes e meia o peso do papel (Brasil, 1992). A seguir, as caixas foram acondicionadas em câmara BOD ajustada para temperatura de  $25^\circ \text{C}$  e umidade relativa de 90%, com fotoperíodo de 12 horas. Para cada um dos três tratamentos, foram utilizadas 30 caixas gerbox contendo 25 sementes cada. As avaliações iniciaram-se no momento do semeio (zero hora) e prosseguiram às 12, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas após o semeio por meio de isolamentos diretos e indiretos em meio NA da semente e das diferentes partes da plântula (raiz, hipocótilo, tegumento e folhas cotiledonares).

Nos isolamentos ao longo das oito avaliações, desde o semeio e o desenvolvimento das plântulas até 96 horas, utilizaram-se as sementes ou partes das plântulas já formadas. Nos isolamentos diretos, utilizaram-se dois procedimentos. No primeiro, as sementes ou partes das plântulas foram depositadas diretamente no meio sem nenhum tratamento prévio. No segundo, as sementes ou partes das plântulas foram previamente submetidas à assepsia utilizando-se hipoclorito de sódio (NaClO 0,5%).

No isolamento direto simples as sementes ou partes das plântulas (raiz ou epicótilo ou folhas cotiledonares ou tegumento) foram depositadas diretamente sobre o meio de cultura NA. Para cada avaliação foram utilizadas 15 unidades (sementes ou partes de plântulas já formadas) para cada um dos três tratamentos.

Nos isolamentos diretos com assepsia as sementes ou partes da plântula (raiz ou hipocótilo ou folhas cotiledonares ou tegumento) foram imersas na seqüência álcool (70%), hipoclorito de sódio (NaClO (0,5%)) por 1 minuto e em seguida lavadas em água. Após esse processo, as sementes ou partes das plântulas foram depositadas diretamente sobre o meio NA, semelhante ao usado no procedimento anterior.

Nos isolamentos indiretos, em cada uma das oito avaliações, tomaram-se cinco sementes ou partes de 5 plântulas (raiz ou hipocótilo ou folhas cotiledonares ou tegumento) que foram imersas em tubos de ensaio contendo 5 ml de solução salina (NaCl 0,85%) seguido de

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo do mecanismo de transmissão de *X. vesicatoria* da semente para a plântula foi realizado no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Utilizaram-se sementes da cultivar Santa Clara Miss Brasil, adquiridas de firma produtora de sementes, sem tratamento prévio com fungicidas, e sementes extraídas de frutos verdes inoculados com *X. vesicatoria* por infiltração na região da placenta.

Nos diferentes ensaios foram utilizados os isolados ENA 4336 e ENA 4483, previamente inoculados em plantas de tomate e re-isoladas em cultura pura (item 3.4.1).

As suspensões bacterianas foram preparadas utilizando-se culturas de *X. vesicatoria* com 48 horas de crescimento em meio NA a 28 °C e solução tampão fosfato mais cloreto de sódio (0,005N e pH 7,4 ( $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ )+ NaCl (0,85%)). Alíquotas da solução tampão foram adicionadas a tubos contendo a cultura seguido de repouso por 20 minutos, quando foram levemente agitadas e diluídas em solução tampão visando ajuste para concentração de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL em espectrofotômetro (85% de transmitância).

### 4.4.1 Experimento um: Inoculação a vácuo e por imersão

O experimento um, realizado em junho de 2007, teve como objetivo definir o método de inoculação a ser usado nos testes de transmissão.

De um lote de sementes de tomate, foram tomadas quatro amostras contendo 400 sementes cada e inoculada por imersão ou a vácuo, mais duas testemunhas correspondentes à aplicação dos mesmos procedimentos, utilizando-se a solução tampão.

A inoculação por imersão foi feita pela adição de 400 sementes em 30 ml de suspensão bacteriana seguido de repouso por 24 horas a 28 °C. Após esse período, as sementes foram retiradas e depositadas em placas de Petri contendo papel germitest esterilizado, sob condições assépticas e mantidas sob temperatura ambiente ( $\pm 30$  °C) por um período de 24 horas. A testemunha correspondente a esse método de inoculação, foi preparada a partir da imersão das sementes na solução tampão sem a bactéria. Após, as sementes foram submetidas ao mesmo tratamento descrito para as sementes inoculadas.

A inoculação a vácuo foi feita por meio da imersão das sementes na suspensão bacteriana seguido da aplicação de vácuo (680 mm de Hg) durante cinco minutos, com liberação lenta em três ciclos sucessivos. Como testemunha, para esse método de inoculação, foram utilizados os mesmos procedimentos, utilizando-se apenas a solução tampão sem a fitobactéria.

Sementes de cada um dos quatro tratamentos, foram semeadas em caixas gerbox, contendo duas folhas de papel germitest umedecido com água esterilizada, na quantidade equivalente a duas vezes e meia o peso do papel (BRASIL, 1992). A seguir, as caixas foram acondicionadas em câmara BOD ajustada para temperatura de 28 °C e umidade relativa de 70%, com fotoperíodo de 12 horas. Retiraram-se amostras de sementes e de diferentes partes das plântulas (raiz, hipocótilo, tegumento e folha cotiledonar) as zero, 12, 24, 30, 36, e 48 horas após o semeio para isolamentos diretos e indiretos.

Os isolamentos diretos consistiram no plaqueamento das sementes diretamente sobre o meio de cultura NA. De cada tratamento e para cada tempo avaliado, foram utilizadas 30 sementes, distribuídas em três placas de Petri.

Nos isolamentos indiretos, de cada tratamento e para cada tempo avaliado, tomaram-se cinco sementes que foram imersas na seqüência em álcool (70%), hipoclorito de sódio (NaClO 0,5%) e água destilada estéril (MARIANO, 2000). Em seguida, as sementes foram

adicionas a tubos de ensaio contendo 5,0 ml de solução salina (NaCl (0,85%)) onde ficaram em repouso por 20 minutos, quando os tubos foram agitados e as amostras retiradas. Para cada tubo foram tomadas três alíquotas de 0,1 ml que foram distribuídas em três placas de Petri contendo meio NA e espalhadas com uma “alça de Drigalsky”.

As placas referentes aos isolamentos diretos e indiretos foram acondicionadas em câmara BOD regulada para temperatura de  $28 \pm 2^\circ \text{C}$ , por 48 horas, quando foram feitas as avaliações. Paralelamente, ao longo das seis avaliações, amostras de três sementes por tratamento foram retiradas e colocadas em tubos ependorf, contendo solução de gutaraldeído (2,5%), e armazenadas em geladeira para testes posteriores.

As avaliações nos isolamentos diretos foram feitas pela observação e confirmação da presença de *X. vesicatoria* em cada semente e nos isolamentos indiretos pela contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente pelos testes ‘F’ e ‘t’ a 5% de probabilidade.

#### **4.4.2 Experimento dois: Transmissão de *X. vesicatoria* de sementes inoculadas a vácuo para as plântulas**

No experimento dois, realizado em junho de 2007, utilizou-se o método de inoculação a vácuo, mais duas testemunhas, semente original (sem nenhum tratamento) e sementes submetidas ao procedimento a vácuo em solução tampão sem a fitobactéria (testemunha vácuo). Para tanto, foram tomadas três amostras contendo 850 sementes cada, das quais duas foram submetidas ao procedimento a vácuo (com e sem a fitobactéria) (item 5.3.1) e uma não. Logo em seguida, as sementes foram semeadas sobre duas folhas de papel germitest umedecido com água estéril na quantidade equivalente a duas vezes e meia o peso do papel (Brasil, 1992). A seguir, as caixas foram acondicionadas em câmara BOD ajustada para temperatura de  $25^\circ \text{C}$  e umidade relativa de 90%, com fotoperíodo de 12 horas. Para cada um dos três tratamentos, foram utilizadas 30 caixas gerbox contendo 25 sementes cada. As avaliações iniciaram-se no momento do semeio (zero hora) e prosseguiram às 12, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas após o semeio por meio de isolamentos diretos e indiretos em meio NA da semente e das diferentes partes da plântula (raiz, hipocótilo, tegumento e folhas cotiledonares).

Nos isolamentos ao longo das oito avaliações, desde o semeio e o desenvolvimento das plântulas até 96 horas, utilizaram-se as sementes ou partes das plântulas já formadas. Nos isolamentos diretos, utilizaram-se dois procedimentos. No primeiro, as sementes ou partes das plântulas foram depositadas diretamente no meio sem nenhum tratamento prévio. No segundo, as sementes ou partes das plântulas foram previamente submetidas à assepsia utilizando-se hipoclorito de sódio (NaClO 0,5%).

No isolamento direto simples as sementes ou partes das plântulas (raiz ou epicótilo ou folhas cotiledonares ou tegumento) foram depositadas diretamente sobre o meio de cultura NA. Para cada avaliação foram utilizadas 15 unidades (sementes ou partes de plântulas já formadas) para cada um dos três tratamentos.

Nos isolamentos diretos com assepsia as sementes ou partes da plântula (raiz ou hipocótilo ou folhas cotiledonares ou tegumento) foram imersas na seqüência álcool (70%), hipoclorito de sódio (NaClO (0,5%)) por 1 minuto e em seguida lavadas em água. Após esse processo, as sementes ou partes das plântulas foram depositadas diretamente sobre o meio NA, semelhante ao usado no procedimento anterior.

Nos isolamentos indiretos, em cada uma das oito avaliações, tomaram-se cinco sementes ou partes de 5 plântulas (raiz ou hipocótilo ou folhas cotiledonares ou tegumento) que foram imersas em tubos de ensaio contendo 5 ml de solução salina (NaCl 0,85%) seguido de

repouso por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram agitados e alíquotas de 0,1 ml retiradas e distribuídas em três placas de Petri contendo meio NA, e espalhadas com uma “alça de Drigalsky” (MARIANO, 2000). Em seguida, as placas foram acondicionadas em câmara BOD, regulada para temperatura de  $28 \pm 2$  °C, por 48 horas.

Em cada uma das oito avaliações (zero, 12, 24, 30, 36, 48, 72 e 96 horas) tomaram-se 50 sementes por tratamento para avaliar o teor de umidade. Utilizou-se o método de secagem em estufa a  $105$  °C, por 24 horas, seguido de pesagem em balança de precisão.

Paralelamente, em cada avaliação, tomaram-se três amostras de sementes que foram adicionados a tubos ependorf contendo solução de glutaraldeído (2,5%) e armazenadas em geladeira para testes posteriores.

#### **4.4.3 Experimento três: Inoculação de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes por meio de injeção na região da placenta de frutos verdes**

Este experimento foi montado nos meses de outubro a novembro de 2007, quando se monitorou o processo de transmissão de *X. vesicatoria* de sementes para plântulas de tomate em dois ensaios, durante os três primeiros dias (72 horas) e durante os seis primeiros dias (144 horas).

Em ambos os ensaios utilizaram-se sementes obtidas de frutos previamente inoculados por meio da infiltração da suspensão bacteriana diretamente na região da placenta de frutos verdes. Cada fruto representou uma amostra ou parcela e em cada avaliação, utilizaram-se sementes extraídas de seis frutos.

A extração das sementes foi feita por fricção, conforme descrito no item 3.4.1. do capítulo I.

Em ambos os ensaios, as sementes foram distribuídas em caixas gerbox (25 sementes por caixa) contendo quatro folhas de papel germitest umedecido com água esterilizada, na quantidade equivalente a duas vezes e meia, o peso do papel. As sementes foram separadas por fruto, onde cada gerbox correspondia às sementes de um único fruto. A seguir, as caixas foram acondicionadas em câmara BOD, regulada para temperatura de  $25$  °C e umidade relativa de 90%, com fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, iniciaram-se as avaliações as zero e prosseguiram às 24, 48, 36 e 72 horas no primeiro ensaio e a zero e prosseguiram às 24, 48, 96, 120 e 144 horas no segundo ensaio, por meio de isolamentos diretos e indiretos.

Nos isolamentos diretos tomaram-se três sementes ou três partes das plântulas (radícula, tegumento, hipocótilo e folhas cotiledonares) que foram depositados diretamente na superfície do meio de cultura NA.

Nos isolamentos indiretos, tomaram-se uma semente ou uma parte de uma plântula (radícula, tegumento, hipocótilo e folhas cotiledonares) de cada amostra que foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 5 ml de solução salina (NaCl 0,85%), seguido de 20 minutos de repouso. Após esse período, os tubos foram levemente agitados e retiraram-se 3 alíquotas de 0,1 ml, que foram espalhadas em placas de Petri, com uma alça de “Drigalsky”, contendo o meio NA.

As placas contendo os isolamentos foram acondicionadas em câmara BOD, regulada para temperatura de  $28$  °C  $\pm 2$  por 48 horas.

Dois sementes de cada fruto foram adicionadas a tubos ependorf contendo solução de glutaraldeído (2,5%) e armazenados em geladeira para testes posteriores.

Para confirmar a presença da fitobactéria nos frutos dos quais foram extraídas das sementes, foram feitos isolamentos utilizando amostras do líquido placentário de cada fruto.

Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste F e as média comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

#### 4.4.4 Experimento quatro: Estudo da transmissão de *X. vesicatoria* em sementes de tomate em testes de emergência em areia e em substrato para mudas

O experimento quatro, realizado em fevereiro de 2008, teve como objetivo avaliar o processo de colonização de *X. vesicatoria* nas diferentes partes das plântulas (raiz, tegumento, hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas) em testes de emergência em substrato de areia e em substrato próprio para produção de mudas. Para tanto, foram feitos dois ensaios com teste de emergência em areia e substrato em condições de câmara de crescimento e casa-de-vegetação, respectivamente.

No primeiro ensaio, foram utilizadas amostras de sementes frescas extraídas de frutos de tomate produzidos no setor de Horticultura da UFRRJ. Foram usados dois tipos de frutos, o primeiro consistiu de frutos inoculados por injeção na placenta, quando ainda verdes e o segundo de frutos não inoculados. As sementes dos frutos não inoculados, foram divididas em duas amostras, sendo uma delas inoculadas pelo procedimento de inoculação a vácuo (conforme item 4.5.1) e a outra usada como testemunha, totalizando três tratamentos com quatro repetições, totalizando 12 parcelas.

Cada parcela foi composta por 50 sementes semeadas em bandejas de alumínio contendo areia autoclavada e umedecida até 70% da capacidade de campo (TEBALDI et al., 2007).

As bandejas foram acondicionadas em câmara de crescimento regulada para temperatura diurna de  $23 \pm 2$  °C e temperatura noturna de  $20 \pm 2$  °C, umidade relativa de 90%, com fotoperíodo de 12 horas (JI et al., 2006) até 30 dias após o semeio. A alta umidade relativa foi proporcionada pela presença de dois umidificadores de nebulização contínua.

As avaliações iniciaram-se no momento do semeio e às 72, 96 e 144 horas para todos os três tratamentos e posteriormente aos 14 e 30 dias após o semeio para as mudas originadas de sementes extraídas de frutos inoculados. Nas avaliações efetuaram-se isolamentos indiretos em meio NA, utilizando-se sementes inteiras ou os diferentes fragmentos das plântulas ou mudas formadas (raiz, tegumento, hipocótilo, folha cotiledonar e folha definitiva).

Nas quatro primeiras avaliações utilizaram-se três fragmentos como amostras por parcela que foram adicionados a tubos contendo 5 ml de solução salina (NaCl 0,85%) seguido de repouso por 20 minutos. Após retiraram-se três alíquotas de 0,1 ml que foram espalhadas em placas de Petri, com uma alça de “Drigalsky”, contendo meio NA.

Na avaliação realizada aos 14 dias, utilizaram-se apenas as mudas desenvolvidas a partir das sementes extraídas de frutos inoculados por injeção na placenta. Tomaram-se 15 mudas por parcela que foram divididas em diferentes fragmentos (raiz, hipocótilo e folha cotiledonar) e em três subamostras de cinco unidades. Cada amostra contendo cinco fragmentos ou partes da muda foram colocadas em tubos de ensaio contendo 10 ml de solução salina (NaCl 0,85%), seguido de repouso por 20 minutos. De cada tubo foram tomadas três alíquotas de 0,1 ml que foram espalhadas em três placas de Petri, com uma alça de “Drigalsky”, contendo meio NA.

Para cada parcela foram realizados nove isolamentos sendo três para cada fragmento de muda, totalizando 27 placas de Petri.

As placas contendo os isolamentos foram incubadas a 28 °C por 48 horas quando foram feitas as observações e contagem do número de UFC de *X. vesicatoria*.

Os dados das quatro primeiras avaliações a zero e posteriormente às 72, 96 e 144 horas foram expressas de forma qualitativa, apenas para presença e ausência de *X. vesicatoria* nos diferentes isolamentos.

Os dados dos isolamentos aos 14 dias foram expressos quantitativamente e as médias, submetidas a análise de variância e teste ‘T’.

Aos 30 dias foram coletadas amostras de folha definitiva apresentando sintomas necróticos com bordos amarelados, típicos de mancha bacteriana. Destas amostras foram feitos testes de exsudação, movimento em água e coloração de Gram seguido de isolamento em cultura pura para confirmação da identidade do agente causal.

No segundo experimento, utilizaram-se sementes comerciais, cultivar Santa Clara Miss BRASIL, inoculada pelo método a vácuo (item 4.5.1) e como testemunha, sementes não inoculadas, totalizando dois tratamentos e quatro repetições.

Para cada parcela foram utilizadas 150 sementes semeadas em bandejas de isopor de 200 células contendo substrato comercial para produção de mudas (Plantmax) em um total de três sementes por célula e cinquenta por parcela.

As bandejas foram acondicionadas em casa-de-vegetação, seguida de formação de câmara úmida com um plástico transparente e nebulizador por cerca de 8-12 horas por dia.

As avaliações iniciaram-se aos sete dias e prosseguiram aos 14 e 21 dias após o semeio, quando foram feitos isolamentos indiretos a partir das diferentes pares de plântula ou muda (raiz, hipocótilo, folha cotiledonar e folha definitiva). Para cada parcela, foram tomadas três mudas, sendo uma depositada em frasco contendo solução fixadora de glutaraldeído para posterior observação em MEV e as duas restantes utilizadas em isolamentos indiretos em meio NA. Nos isolamentos indiretos, adicionaram-se dois fragmentos em tubo de ensaio contendo 10 ml de solução salina (NaCl 0,85%), seguido de repouso e semeio plaqueamento em placa de Petri contendo o meio NA, de 0,1 ml de suspensão por placa. As placas foram acondicionadas por 48 horas a 28°C, quando foi feita a contagem do número de UFC por cada parte de plântula ou muda.

Os dados foram transformados para log (UFC+2) e submetidos a análise de variância e teste 'T'.

## 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.5.1 Experimento um: Inoculação a vácuo e por imersão

Todas as sementes inoculadas, tanto pelo método a vácuo quanto por imersão apresentaram crescimento da fitobactéria nos isolamentos diretos e nenhum dos dois tratamentos testemunha apresentaram crescimento de *X. vesicatoria*. Nos isolamentos diretos, o crescimento de *X. vesicatoria* ao redor das sementes inoculadas a vácuo foi mais facilmente observado pelo maior desenvolvimento das colônias indicando maior população inicial da fitobactéria neste tratamento que no de inoculação por imersão. Nos dois tratamentos, foi observada, ao longo do processo de germinação, a emissão da radícula entre 24 e 48 horas.

Nos isolamentos indiretos, não se observou o crescimento de *X. vesicatoria* nos dois tratamentos testemunha e foram, portanto, retiradas das análises estatísticas (valores iguais a zero). O tempo zero que corresponde ao momento da montagem do teste de todos os tratamentos também foi retirado das análises.

Nos tratamentos com adição da fitobactéria, foi observado crescimento de *X. vesicatoria* em todas as seis avaliações. Observou-se efeito altamente significativo do método de inoculação, tempo após a inoculação e da interação entre eles (Tabela 6).

Os resultados dos isolamentos indiretos confirmam aqueles obtidos nos isolamentos diretos com maior recuperação de *X. vesicatoria* nas sementes inoculadas a vácuo do que por imersão (Tabela 7).

**Tabela 6** - Análise da variância para o efeito do método de inoculação das sementes de tomate do tempo após a inoculação e da interação entre estes sobre o crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*, em isolamentos indiretos em meio NA.

ANOVA						
FV	SQ	GL	QM	F	Valor - P	F crítico
Tempo	4,809	5	0,962	11,273	1,37E-06	2,477
Tratamento	15,721	1	15,721	184,243	9,97E-16	4,11
Interação	9,861	5	1,972	23,113	2,51E10	2,477
Dentro	3,072	36	0,085			
Total	33,463	47				

CV% = 21,582

Dados transformados para log (x+2)

**Tabela 7** - Número de UFC de *Xanthomonas vesicatoria* em sementes de tomate inoculadas a vácuo e por imersão a partir do isolamento indireto em diferentes épocas após a montagem do teste.

Tempo (horas)	Inoculação				Médias	
	Vácuo		Imersão		Log (x+2)	Dados não transformados
	Log (x+2)	Dados não transformados	Log (x+2)	Dados não transformados		
12	1,921534	84,25	0,508356	2,00	1,214945	43,13
18	1,171748	13,25	1,131067	12,00	1,151407	12,63
24	2,095494	132,50	0,914168	6,25	1,504831	69,38
30	3,310924	2069,00	0,680658	3,50	1,995791	1036,25
36	1,179833	68,00	1,151810	13,00	1,165821	40,50
48	1,875014	82,25	0,301030	0,00	1,088022	41,13
Média	1,925758	408,21	0,781182	6,13	1,353470	207,17
DMS (t 5%)	0,418903	-	0,418903	-	0,296209	-

Ao longo do processo de embebição e germinação das sementes, observou-se também diferença significativa quanto à população de *X. vesicatoria*, expressa pelo número de UFC recuperadas nos isolamentos indiretos. No método de inoculação a vácuo, observou-se a população significativamente maior da fitobactéria às 30 horas após o semeio, enquanto que no método de inoculação por imersão, observou-se maior população às 36 horas após a inoculação. A flutuação da população de *X. vesicatoria* ao longo de 48 horas após o semeio pode ser explicada, provavelmente, pela liberação gradual de exsudados em tempos diferentes pelas sementes. Segundo NELSON (2004), a atividade microbiana é em grande parte governada pela natureza e pelo fluxo de materiais liberados pelas sementes durante o processo de germinação. Esta se inicia com a entrada de água na semente e termina com a protusão da radícula, entre 24 e 48 horas do início da hidratação.

As sementes inoculadas a vácuo diferiram das sementes inoculadas por imersão quanto à velocidade de germinação e à população inicial de *X. vesicatoria*. A entrada de água nas sementes inoculadas pelo processo a vácuo provavelmente ocorre de forma mais rápida que na inoculação das sementes por imersão, pois além da pressão osmótica, dada pelo sal (NaCl), a aplicação do vácuo também exerce uma força física da água sobre as sementes. Então, provavelmente as sementes do tratamento a vácuo iniciam o processo de germinação mais cedo, culminando na ruptura do tegumento antes das sementes que foram inoculadas por imersão. Sendo assim, a liberação de exsudados ocorre mais cedo e em tempos diferente das sementes tratadas por imersão. Além disso, a população inicial de *X. vesicatoria* das amostras inoculadas a vácuo foi bem maior que das amostras de sementes inoculadas por imersão, devido a maior fixação das células da fitobactéria no tegumento pela aplicação do vácuo. Esse resultado difere de CORREA et al., (2008), que obtiveram maior recuperação de *X. vesicatoria* nas sementes inoculadas por imersão.

Em geral, as diferenças da população de *X. vesicatoria* ao longo do tempo foram significativas e estas diferenças provavelmente deve-se à liberação dos exsudados ao longo da germinação. Os períodos de aumento da população coincidem com momentos de liberação de exsudação descritos por NELSON (2004), ou seja, as primeiras 12 horas de hidratação e no momento da protusão da radícula, que nesse ensaio foi entre 24 horas e 30 horas. Durante o semeio direto das sementes em meio NA, observou-se o crescimento de *X. vesicatoria* acompanhando o alongamento da raiz. Provavelmente, esse comportamento de *X. vesicatoria* está relacionado com a liberação de exsudados por esse órgão, que são aproveitados pela fitobactéria.

#### **4.5.2 Experimento dois: Transmissão de *X. vesicatoria* de sementes inoculadas a vácuo para as plântulas**

Em todos os isolamentos observou-se a recuperação de *X. vesicatoria* apenas naqueles feitos nas amostras derivadas dos tratamentos com inoculação pela fitobactéria.

A assepsia das sementes antes dos isolamentos foi eficiente em eliminar a flora microbiana associada ao tegumento e as partes das plântulas. No entanto, nos isolamentos sem o uso da assepsia prévia, o crescimento de outros microrganismos foi reduzido e de forma geral, não interferiu nas avaliações. A aplicação da assepsia prévia, com hipoclorito de sódio (NaClO 0,5%) reduziu a população de *X. vesicatoria* e interferiu negativamente nas avaliações (Tabela 8), diferindo do resultados de TEBALDI et al. (2007), em ensaio com *X. campestris* pv. *campestris* em sementes de brássicas e confirma os resultados de UMESHA (2006) com *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em sementes de tomate.

Tendo como base a germinação e o desenvolvimento das plântulas nas caixas gerbox, foi possível efetuar isolamentos diretos das sementes na primeira avaliação (36 horas), da

semente e da raiz nas duas avaliações subseqüentes (48 e 72 horas) e do tegumento, radícula, hipocótilo e folha cotiledonar somente na última avaliação (às 96 horas) (Tabela 8).

No entanto, a partir da deposição das sementes em processo de germinação no meio de cultura, estas, continuaram o seu desenvolvimento, utilizando-se a água do meio de cultura. Durante o processo de germinação e emissão da radícula nas placas de Petri, observou-se o desenvolvimento de colônias de *X. vesicatoria* acompanhando o desenvolvimento da radícula, desde o isolamento realizado às 12 horas após o início da hidratação, em várias amostras, confirmando os resultados observados no experimento 1.

O processo de colonização da radícula por *X. vesicatoria* foi confirmado nos isolamentos feitos às 48, 72 e 96 horas após o semeio, com resultado positivo em 100% das amostras avaliadas sem o uso prévio da assepsia.

A partir de 96 horas as plântulas puderam ser divididas em quatro partes (radícula, tegumento, hipocótilo e folhas cotiledonares), com isolamentos de cada um destes fragmentos, separadamente. Nestes isolamentos, foram utilizados quatro explantes por parcela e apenas o isolamento direto sem tratamento prévio de assepsia.

Nos isolamentos a partir das raízes e hipocótilos de sementes do tratamento testemunha (semente original), observou-se o desenvolvimento de colônias bacterianas de cor amarelo vivo e de cor clara. Estes dois tipos de colônias também foram observadas em menor frequência nos isolamentos a partir do tegumento, enquanto que nos isolamentos a partir das folhas foi observada apenas a presença de bactérias com colônias de cor clara. Estas duas bactérias também foram isoladas do tratamento testemunha submetida a inoculação à vácuo. Nestes isolamentos, realizados 96 horas após o semeio, observou-se a recuperação de *X. vesicatoria* de todas as partes da plântula (radícula, tegumento, hipocótilo e folhas cotiledonares) em 100% das amostras. O isolamento a partir das folhas cotiledonares comprovou a transmissão da bactéria para a parte aérea da planta, a partir daí a infecção e o desenvolvimento da doença dependerão das condições de ambiente, virulência do isolado e susceptibilidade da cultivar.

A confirmação da identidade dos isolados de *X. vesicatoria* foi feita com base nas características da colônia, movimento em água e teste de Gram. Quanto à morfologia as colônias apresentavam cor amarela brilhante à luz, superfície e bordas lisas com centro da colônia mais alto que as extremidades (convexo). Quanto ao movimento em água e formato das células, foram observados bastonetes, com movimentos discretos. A coloração de Gram classificou a bactéria como Gram negativa.

**Tabela 8** - Porcentagem de recuperação de *Xanthomonas vesicatoria* em isolamentos diretos, com e sem assepsia das sementes e/ou partes das plântulas em meio NA de amostras de sementes inoculadas com a fitobactéria pelo método a vácuo e testemunhas, semente imersa em solução tampão submetida a vácuo sem a fitobactéria e semente original.

Tempo	Assepsia	Tegumento (%)					Raiz (%)					Hipocótilo (%)					Folha (%)				
		Orig		Test.vác.		Inoc	Orig.		Test.vác.		Inoc	Orig.		Test.vác.		Inoc.	Orig.		Test.vác.		Inoc.
		Xv	Fb	Xv	Fb	Xv	Xv	FB	Xv	FB	Xv	Xv	FB	XV	FB	XV	Xv	FB	XV	FB	XV
0	sem	0	0	0	0	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	com	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	sem	0	0	0	0	93,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	com	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	sem	0	0	0	0	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	com	0	0	0	0	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	sem	0	0	0	0	93,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	com	0	0	0	0	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	sem	0	0	0	0	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	com	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	sem	0	0	0	0	93,3	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	com	0	0	0	0	40	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	sem	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	com	0	0	0	0	80	0	0	0	0	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	sem	0	40	0	100	100	0	80	0	100	100	0	60	0	100	100	0	60	0	100	100

OBS.: Xv – *Xanthomonas vesicatoria*; FB – Flora bacteriana; -: Não avaliado

A detecção de outras bactérias colonizando o tegumento das sementes inoculadas a vácuo com *X. vesicatoria* a partir de 72 horas de germinação pode ser explicada pela redução da população de *X. vesicatoria* e pelo crescimento de bactérias saprófitas. O tegumento das sementes tem a função de proteger o embrião. A absorção de água ocorre por meio do tegumento, que concomitantemente libera exsudatos que servem de substrato para vários microrganismos, inclusive *X. vesicatoria*.

#### 4.5.2.1 Isolamentos indiretos

Os resultados indicam que *X. vesicatoria*, inicialmente, se localiza no tegumento da semente e que durante o processo de absorção de água e embebição das sementes, a população aumenta, provavelmente devido ao seu crescimento utilizando os exsudatos liberados. A absorção de água pelas sementes foi evidenciada pelo maior teor de umidade das sementes a cada tempo avaliado.

Nas primeiras cinco avaliações (até 36 horas após o semeio) foram realizados apenas isolamentos a partir de sementes inteiras, pois ainda não haviam sido emitidas a radícula e a parte aérea das plântulas. Desta forma, foram realizados oito isolamentos a partir das sementes sendo cinco antes do início da germinação, duas após a emissão da radícula e a oitava e última após a emissão da parte aérea, utilizando-se apenas tegumento remanescente. Nesta série de isolamentos, observou-se a recuperação de *X. vesicatoria* apenas a partir de 36 horas após o semeio com crescimento da população até 96 horas, evidenciando a multiplicação da bactéria ao longo do processo de germinação. Nos isolamentos a partir das sementes e, ou, do tegumento realizado em amostras de sementes dos tratamentos com a aplicação de vácuo na suspensão tampão, observou-se crescimento de várias colônias de bactérias de coloração creme, enquanto no tratamento testemunha não houve crescimento de qualquer microrganismo.

A partir de 48 horas de germinação, efetuaram-se também isolamentos e recuperação de *X. vesicatoria* a partir das radículas e às 72 horas após o semeio, recuperou-se *X. vesicatoria* de isolamentos a partir das radículas e sementes.

Às 96 horas após o semeio, efetuaram-se também isolamentos e recuperação de *X. vesicatoria* a partir do hipocótilo e folhas cotiledonares com crescimento de *X. vesicatoria* (Tabela 10), confirmando a passagem da fitobactéria para a parte aérea das plantas durante o processo de germinação.

A transmissão de *X. vesicatoria* do tegumento para as folhas, nas condições estudadas, poderia ocorrer no momento de sua emissão, uma vez que os tegumentos ficam aderidos temporariamente a ela, facilitando a transmissão das células bacterianas, que sob condições propícias poderiam penetrar nos tecidos foliares através dos estômatos ou hidatódios ou mesmo ferimentos ocasionados durante a sua emissão. Os estômatos se abrem para capturar CO<sub>2</sub>, preferencialmente, quando a umidade relativa do ar é alta. A entrada através de hidatódios, seria por meio do escurrimento das células da bactéria para a extremidade da folha em decorrência do congestionamento de água, células bacterianas entrariam por essas estruturas. Pequenas ranhuras durante a emissão das folhas são passíveis de ocorrer, então sob condições de alta umidade, esses ferimentos serviriam como porta de entrada para a fitobactéria.

**Tabela 9** - Quantificação de *X. vesicatoria* (UFC/semente), obtido a partir do isolamento indireto em três placas, de tegumentos de cinco sementes de tomate submetidas a três tratamentos: ‘testemunha’, ‘vácuo + solução tampão’ e inoculadas a vácuo com *Xanthomonas vesicatoria*.

Tempo (horas)	Original		(Vác.+Tampão)		Inoculadas	
	UFC/semente		UFC/semente		UFC/semente	
	FB	Xv	FB	Xv	FB	Xv
0	*	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
24	*	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	113,33
48	0	0	0	0	0	14.001,67
72	0	0	0	0	0	9.994,16
96	*	0	0	0	0	> 20.000,00

A contagem foi feita por amostragem. Uma área representativa de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup> foi contada e o resultado estendido para a placa inteira.

\* presença de inúmeras UFC de cor clara (creme), com tamanho de aprox. 0,3 mm, com aspecto diferente da *X. vesicatoria*.

Estes resultados indicam que logo após o semeio, com o início do processo de embebição das sementes e liberação de exsudados, a multiplicação de *X. vesicatoria* atinge o seu máximo por volta de 36-48 horas quando ocorre a emissão da radícula e subsequentemente a multiplicação da bactéria ao longo da mesma, acompanhando o seu crescimento. Da mesma forma, com a emissão da parte aérea e desenvolvimento das folhas cotiledonares, o tegumento permanece temporariamente aderido as mesmas, permitindo a passagem da bactéria do tegumento para as folhas. Este processo acredita-se é tão mais eficiente na medida em que ocorre acúmulo de água livre facilitando a penetração e posterior infecção das folhas.

**Tabela 10** - Quantificação de *Xanthomonas vesicatoria* nas partes das plântulas de tomates, obtidas de sementes originais, testemunha vácuo e sementes inoculadas a vácuo com *X. vesicatoria*, 96 horas após o início do ensaio.

Grupo de semente	Placa	Raiz	Hipo	Tegumento	Folha
Original	1	0*	0*	0*	0*
Original	2	0*	0*	0*	0*
Original	3	0*	0*	0*	0*
‘vácuo + solução Tampão’	1	0+	0**	0*	0**
‘vácuo + solução Tampão’	2	0+	0+	0*	0**
‘vácuo + solução Tampão’	3	0+	0+	0*	0**
vácuo + <i>X. vesicatoria</i>	1	9369,1	8432,2	>20.000,0	17020,6
vácuo + <i>X. vesicatoria</i>	2	9837,6	6089,9	>20.000,0	4528,4
vácuo + <i>X. vesicatoria</i>	3	10306,0	0	>20.000,0	3747,6
	Médias	9837,6	7261,0		8432,2

- \*Presença de numerosíssimas UFC de outras bactérias
- \*\* poucas UFC de outras bactérias
- + Placas completamente limpas (sem crescimento).
- A contagem foi feita por amostragem. Uma área representativa de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup> foi contada e o resultado estendido para a placa inteira.

### 4.5.3 Experimento três: Inoculação de *X. vesicatoria* em sementes por meio de injeção na região da placenta de frutos verdes

A realização de dois ensaios, com avaliações por até 72 e 144 horas ocorreu devido à disponibilidade de sementes obtidas de frutos inoculados. Como relatado no Capítulo I, o número de sementes produzidas por frutos inoculados por injeção na placenta é reduzido à metade em relação aos frutos não inoculados. Alguns frutos selecionados para a extração de sementes no primeiro ensaio, apresentaram número reduzido de sementes, fazendo as avaliações se cessassem ao final de 72 horas após o semeio. Nessa ocasião, as plântulas ainda não haviam desenvolvido todas as estruturas diferenciadas, o que ocasionou a necessidade do segundo ensaio.

A presença da fitobactéria foi confirmada em todos os frutos utilizados. Esta confirmação foi obtida pelo teste positivo nos isolamentos a partir do líquido placentário.

No ensaio um com avaliações até 72 horas após o semeio e nos isolamentos diretos das sementes foi detectada a presença de *X. vesicatoria* em 100% das sementes avaliadas.

Nos isolamentos indiretos, constatou-se que a população da fitobactéria na região do tegumento atingiu o seu valor máximo às 48 horas após o início da embebição ( $P < 0,01$ ) (Tabela 11). Aparentemente, a população da fitobactéria cresceu utilizando os exsudados liberados pela semente durante a germinação e decaiu (72 horas) com a exaustão do substrato decorrente do uso das reservas da semente com o desenvolvimento da plântula, semelhante ao observado no item 3.6.2. A partir deste período a fitobactéria provavelmente poderá ser mais facilmente recuperada a partir da radícula e da parte aérea. Não se observou diferença significativa entre os tempos 48 e 72 horas pelo teste de Tukey (Tabela 11).

**Tabela 11** - Número médio de colônias de *X. vesicatoria* (UFC/semente) obtidas do isolamento de sementes extraídas de frutos inoculados, ainda verdes, por infiltração na placenta, em diferentes tempos após a semeadura.

Tempo	Número de amostras	Média dos valores transformados $\text{Log}(x)$		Média dos valores destransformados $10^{\text{Log}(x)}$
O	6	3,814676	B	6526
24	6	3,845729	B	7010
48	6	6,747717	A	5593933
72	4	6,406886	A	2552031
Geral	22	5,094376		124272,8
CV%	11,31			

Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

O tempo de avaliação deste ensaio não foi suficiente para a ocorrência da emergência e desenvolvimento da parte aérea que impediu o estudo do processo de colonização da parte aérea.

No ensaio dois, a detecção de *X. vesicatoria*, feita por meio dos isolamentos diretos permitiu recuperar a fitobactéria a partir de 100% das sementes e das partes das plântulas avaliadas (raiz, hipocótilo e folhas cotiledonares).

Nos isolamentos indiretos a partir do tegumento, observou-se o valor “F” altamente significativo ( $P < 0,01$ ), indicando que a população de *X. vesicatoria* recuperada desta parte, variou nos seis tempos estudados, com níveis mais baixos a zero e 24 horas, atingindo o máximo às 48 horas após o semeio, decrescendo em seguida (96, 120 e 144 horas), porém para um nível superior ao encontrado as zero e 24 horas (Tabela 12). Esse resultado foi semelhante ao ensaio um, porém até as 72 horas. As médias apresentadas nos tempos 48, 96,

120 e 144 horas após o semeio não diferiram entre si (Tukey 5%), enquanto a dos tempos 120 e 144 horas não diferiram dos tempos zero e 24 horas (Figura 9).

**Tabela 12** - População de *X. vesicatoria* (média de Log(UFC+2)), obtida do isolamento indireto de sementes extraídas de frutos previamente inoculados em diferentes tempos após a semeadura.

Tempo (horas)	Raiz	Tegumento	Hipocótilo	Folhas cotiledonares
O		2,344 B		
24		2,377 B		
48		5,023 A		
96	4,298 A	4,532 A	8980 A	3100 A
120	4,215 A	3,781 AB	80500 A	7200 A
144	2,609 A	3,468 AB	6750 A	62375 A
Geral	3,786	3,566	33885	21500
CV%	30,05	32,44	21,30	21,45

Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

Após 96 horas de crescimento, a divisão das diferentes regiões das plântulas tornou-se possível e *X. vesicatoria* foi recuperada em todas as partes das mesmas (radícula, hipocótilo, tegumento e folhas cotiledonares). As médias da população, porém, não diferiram significativamente nos diferentes tempos (Tabela 12).

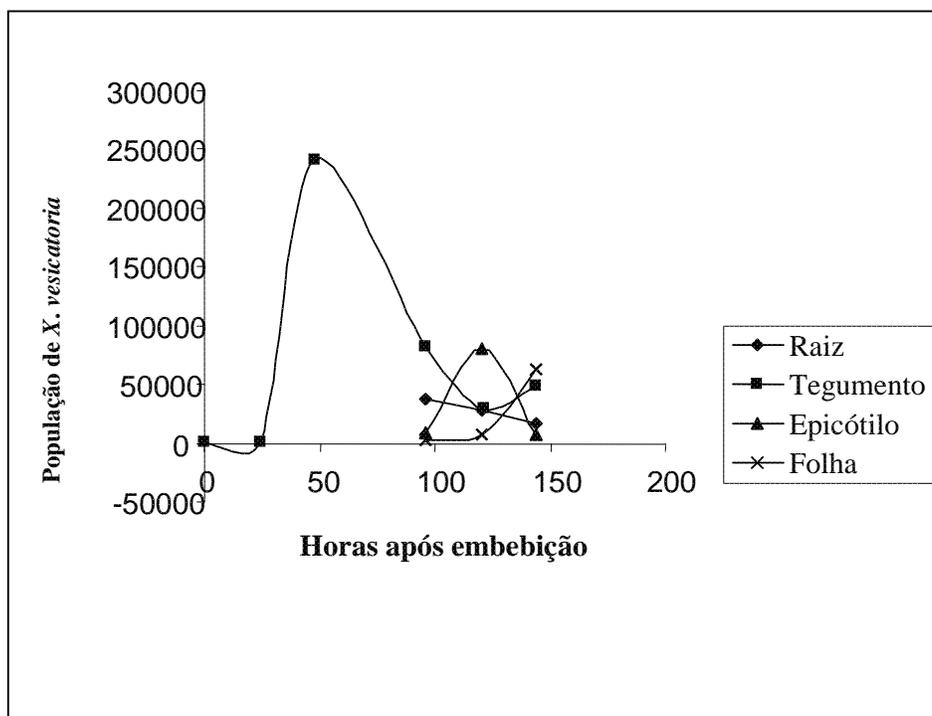
*Xanthomonas vesicatoria* foi recuperada a partir das radículas em todos os tempos avaliados após a sua emissão. A população da fitobactéria esteve presente nas raízes, sem variar significativamente de um tempo para o outro, tendo uma leve tendência a diminuir ao longo do ensaio (Figura 9). Essa tendência está de acordo com a natureza da doença causada, uma vez que a fitobactéria é encontrada sobre a parte aérea do hospedeiro.

Nos hipocótilos, *X. vesicatoria* foi recuperada em todos os tempos avaliados (Tabela 12) sendo que a sua população aumentou às 120 horas após a semeadura e diminuiu às 144 horas (Figura 9). As diferenças observadas, porém, não foram significativas. Aparentemente o crescimento das bactérias foi exponencial, com máximo em 48 horas (como foi observado no tegumento, nos ensaios um e dois). A avaliação do hipocótilo foi feita às 96 horas, porém às 72 horas o hipocótilo das plântulas já estava exteriorizado. O tempo avaliado, às 120 horas, correspondeu a 48 horas de crescimento da bactéria no referido órgão, momento em que ocorrem a máxima população, tendendo a partir daí a diminuir. Até esta fase, a bactéria aparentemente sobrevive na parte externa das plântulas como residente, aproveitando os exsudatos liberados durante o desenvolvimento da plântula sem causar sintomas. Na emergência do hipocótilo, observada a partir de 72 horas após a semeadura, durante o alongamento e desenvolvimento desse órgão, provavelmente são liberados exsudatos que favorecem a multiplicação de *X. vesicatoria*. Com o final do desenvolvimento do hipocótilo, o nível de exsudatos liberados tende a diminuir, limitando-se aos micro-sítios de exsudação, base dos tricomas e próximo aos estômatos. Como os nutrientes do ambiente externo da planta, após o desenvolvimento do hipocótilo, se tornam limitados, a população de *X. vesicatoria* tende a diminuir ao longo do seu comprimento e concentrar próximo as áreas de exsudação, base dos tricomas e estômatos.

*Xanthomonas vesicatoria* foi recuperada nos isolamentos a partir das folhas cotiledonares em todos os tempos avaliados a partir da sua emergência 96 horas após o semeio. A diferença entre os tempos não foi significativa, porém, a população tendeu a aumentar ao longo dos tempos (Tabela 12 e Figura 10). O tempo de avaliação das folhas cotiledonares não excedeu a 48 horas de sua emissão o que somente ocorreria às 168 horas

após o semeio. No entanto, as avaliações foram feitas até 144 horas. Se o padrão de colonização de *X. vesicatoria* sobre as folhas for o mesmo das outras partes da plântula (radícula, tegumento e hipocótilo), a partir de 168 horas após o semeio, a população de *X. vesicatoria* tenderia a diminuir e, provavelmente, se concentrar próximos aos sítio de exsudação, base dos tricomas e áreas próxima aos estômatos.

O padrão de colonização de *X. vesicatoria* sobre as partes da plântula (tegumento, radícula e hipocótilo) parece ser o mesmo, com aumento exponencial da população até 48 horas, seguido de diminuição a partir desse tempo (Figura 9). Os órgãos das plântulas estão em processo de formação, com intensa multiplicação das células. Com o alongamento dos órgãos, provavelmente, ocorrem o rompimento dos tecidos culminando no extravasamento de substâncias (NELSON, 2004) que são aproveitadas por populações epífitas de *X. vesicatoria*. Provavelmente, ao final do desenvolvimento de cada órgão, a liberação de cessa, limitando-se a alguns pontos chamados nichos de liberação de exsudados onde a população da fitobactéria tende a se concentrar.



**Figura 8** - População de *X. vesicatoria* (UFC) recuperada dos tegumentos, radículas, hipocótilos e folhas cotiledonares de plântulas de sementes de tomates previamente inoculados (dados não transformados).

Esses resultados indicam que com o processo inicial de colonização e transmissão de *x. vesicatoria* parte do ciclo da relação patógeno-hospedeiro ocorre e que o surgimento da doença dependerá das condições do ambiente em que as plantas se desenvolvem. Provavelmente, o predomínio de alta umidade relativa e temperaturas amenas poderá favorecer a multiplicação e a penetração da fitobactéria no interior do tecido e dar início à infecção. Segundo MELOTTO et al. (2008), a entrada do patógeno dentro do tecido hospedeiro é o primeiro passo para causar a infecção. Em geral, os sintomas de mancha bacteriana de tomate ocorrem após 10 dias da inoculação, além do período de avaliação no presente ensaio.

#### **4.5.4 Experimento quatro: Estudo da transmissão de *X. vesicatoria* em sementes de tomate em testes de emergência em areia e em substrato para mudas**

No teste em areia a porcentagem de emergência de plântulas dos três tratamentos não diferiu estatisticamente entre si com média de 53, 42 e 63% para sementes extraídas de frutos inoculados ainda verdes, por infiltração na placenta, de sementes extraídas de frutos não inoculados e de sementes inoculadas a vácuo, extraídas de frutos não inoculados, respectivamente.

Os isolamentos diretos foram feitos apenas nas amostras de sementes no momento da semeadura. Nesses, *X. vesicatoria* apresentou crescimento em apenas uma semente referente às sementes inoculadas a vácuo extraídas de frutos não inoculados. As demais, não apresentaram crescimento da fitobactéria. No entanto, foi observado vasto crescimento de outros microrganismos, que na sua maioria, apresentavam colônias de cor clara. Esse resultado revela alta concentração inicial de microrganismos sobre as sementes, de crescimento mais agressivo que *X. vesicatoria*, que provavelmente interferem no processo de colonização pela fitobactéria.

Nos isolamentos indiretos a partir das sementes, na avaliação do tempo zero, também observou-se grande número de colônias de bactérias sobre o meio de cultura NA. Ao longo de 144 horas foram observadas colônias de bactérias de cor branca brilhante, outras de cor branca leitosa e muitas colônias de cor com diversos tons de amarelo. As diferentes tonalidades de amarelo dificultaram a identificação de *X. vesicatoria* e portanto a sua quantificação. Optou-se apenas pela análise qualitativa para a sua presença ou ausência nas partes das plântulas (Tabela 13).

As avaliações de *X. vesicatoria* sobre as partes das plântulas, foram feitas por meio de isolamentos indiretos ao longo de 144 horas. Tanto nos isolamentos a partir de sementes ou partes de plântulas oriundas de frutos inoculados ainda verdes por infiltração na placenta, quanto nos isolamentos a partir de sementes ou partes de plântulas de sementes inoculadas a vácuo extraídas de frutos não inoculados, observou-se a presença da fitobactéria as amostras a partir de 96 horas após o semeio (Tabela 13). Nos isolamentos a partir de frutos não inoculados, não foi detectada a presença da fitobactéria em nenhum tempo avaliado. No entanto a flora microbiana foi observada em todas as avaliações.

Observou-se que as sementes utilizadas no ensaio apresentavam alta concentração de microrganismos. Essa observação foi feita em todos os tratamentos desde o primeiro isolamento. Já a colonização de *X. vesicatoria* foi observada somente a partir dos isolamentos realizados 96 horas após o semeio. Esses resultados sugerem que a semente fresca pode carrear microrganismos que podem suprimir o desenvolvimento inicial de *X. vesicatoria*.

Numerosos estudos têm fornecido evidências de que as sementes abrigam comunidade microbiana diversificada, não só na superfície como também dentro do embrião (BACILIO-JIMENEZ et al., 2001; NORMANDER e PROSSER, 2000). Durante a germinação da semente, a proliferação dessas comunidades e de outros microrganismos existentes no solo é estimulada (BUYER et al., 1999; SIMON et al., 2001). O desenvolvimento e a ecologia de microrganismos específicos que colonizam as sementes horas imediatamente após o semeio, tem sido raramente estudado (NELSON, 2004) e poucos exemplos atuais estão disponíveis.

**Tabela 13** – Isolamentos indiretos das sementes e diferentes partes das plântulas de tomate proveniente de sementes extraídas de frutos cultivados na estufa, inoculados ou não com *X. vesicatoria* ao longo de 144 horas.

Tratamento	Momento do semeio (tempo zero)							
	<i>X. vesicatoria</i>				Flora bacteriana			
	Rad.	Teg.	Hipo.	Fcot.	Rad.	Teg.	Hipo.	Fcot.
Sem. extr. de fruto inoc.	Na	-	na	na	na	+	na	na
Sem. extr. de fruto não inoc.	Na	-	na	na	na	+	na	na
Sem. inoc. à vác.	Na	-	na	na	na	+	na	na
72 horas após o semeio								
Sem. extr. de fruto inoc.	+	+	na	na	+	+	na	na
Sem. extr. de fruto não inoc.	-	-	na	na	+	+	na	na
Sem. inoc. à vác.	-	-	na	na	+	+	na	na
96 horas após o semeio								
Sem. extr. de fruto inoc.	+	+	+	na	+	+	+	na
Sem. extr. de fruto não inoc.	-	-	-	na	+	+	-	na
Sem. inoc. à vác.	+	+	+	na	+	+	-	na
144 horas após o semeio								
Sem. extr. de fruto inoc.	+	na	+	+	+	na	+	+
Sem. extr. de fruto não inoc.	-	na	-	-	+	na	+	+
Sem. inoc. a vácuo	+	na	+	+	+	na	+	+

Sem. extr. de fruto inoc. – Sementes extraídas de frutos inoculados, ainda verdes, por injeção na placenta; Sem. extr. de fruto não inoc. – Sementes extraídas de frutos não inoculados; Sem. inoc. à vác – Sementes inoculadas a vácuo extraídas de frutos não inoculados; e na – Dados não avaliados.

Quando as plântulas obtidas a partir de sementes extraídas de frutos inoculados ainda verdes por infiltração na placenta atingiram 14 dias de idade, foram feitos isolamentos indiretos das partes das mudas (raiz, hipocótilo, folha cotiledonar e folha definitiva). Observou-se a presença de *X. vesicatoria* em todas as partes das plântulas, com maior população nas folhas, seguido do hipocótilo que não diferiu estatisticamente das raízes (Tabela 14).

**Tabela 14** – Quantificação de *X. vesicatoria* (UFC/parte de plântula) sobre as partes de plântulas (raiz, hipocótilo e folha cotiledonar) obtidas a partir de sementes extraídas de frutos inoculados com a fitobactéria, ainda verdes, por infiltração da placenta com 14 dias de idade em testes de emergência em areia.

Parte da plântula	Médias (log x+2)	* UFC/ parte de plântula
Folha	0,969711	A 146,53
Hipocótilo	0,551436	B 31,20
Raiz	0,313608	B 1,18
	0,644755	48,26

\*Médias de UFC desransformadas e convertidas para UFC por parte da plântula; Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste t.

Aos 30 dias após o semeio as plantas oriundas de sementes extraídas de frutos inoculados por infiltração na região da placenta já apresentavam o primeiro par de folhas definitivas e algumas delas tinham sintomas semelhantes aos da mancha bacteriana. Foram coletadas amostras de folhas com sintomas e em seguida realizaram-se isolamentos para detecção da fitobactéria. Sob o microscópio ótico, observaram-se exsudação abundante de células bacterianas com movimentos em água, semelhantes ao de *X. vesicatoria*. As bactérias foram classificadas em reação de coloração de Gram como negativas. Após foram realizados isolamentos em cultura pura sobre o meio NA e confirmou-se a presença de *X. vesicatoria* sobre as folhas definitivas.

Observou-se que tão logo a parte aérea se desenvolve, a fitobactéria é capaz de se estabelecer e sobreviver como residente até a ocorrência de condições favoráveis à infecção e que as raízes também podem abrigar colônias de *X. vesicatoria*, pelo menos até 14 dias após o semeio pois, estas se fixam sobre a epiderme vivendo no rizopiano como residente, sem aparentemente causar danos nessa parte da planta.

O experimento conduzido em casa-de-vegetação, onde utilizaram-se apenas sementes comerciais, avaliou a emergência e a população de *X. vesicatoria* sobre as sementes e partes de plântulas (raiz, tegumento, hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas), observou-se que a fitobactéria não afetou significativamente a emergência das plântulas (teste t 5%), com a percentagem de emergência de 78,17 % para sementes inoculadas e 75,50 %, para as não inoculadas.

Ao longo de 21 dias foram feitos isolamentos indiretos da parte aérea, de plântulas ou mudas (hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas) e observou-se que a umidade das folhas interferiu muito na população da bactéria no filopiano. A população da bactéria decaiu na medida em que as bandejas ficavam mais distantes do aparelho umidificador. Observaram-se, nos isolamentos feitos da parte aérea das parcelas retiradas de bandejas afastadas do aparelho, colônias de cor branca, semelhantes às encontradas nos isolamentos da raiz. Em contrapartida, sobre as amostras retiradas de bandejas próximas ao umidificador, foram observadas grande diversidade de colônias em diferentes tons de amarelo.

Nos isolamentos realizados em plântulas ou mudas de sementes não inoculadas, foram observadas colônias semelhantes à de *X. vesicatoria* que dificultou o teste de quantificação da população.

Ao longo de todo o experimento, todas as colônias semelhantes à *X. vesicatoria* foram inoculadas em mudas de tomate para observação dos sintomas. A contagem do número de UFC só foi feita após a confirmação da presença da fitobactéria sobre as plantas teste que apresentaram os sintomas de mancha-bacteriana.

A tabela 15 apresenta a quantificação de *X. vesicatoria* sobre as partes das plântulas ou mudas, oriundas de sementes comerciais inoculadas á vácuo. Aos 7 dias as plântulas apresentaram crescimento de *X. vesicatoria* em todas as partes desenvolvidas sem diferir

estatisticamente entre si, com número de colônias maior sobre as folhas cotiledonares. Nesse período, as folhas definitivas ainda não estavam formadas. Aos 14 dias, com as folhas definitivas já formadas observou-se que estas também estavam colonizadas por *X. vesicatoria*. A fitobactéria se comportou como epífita sem necessariamente causar sintomas da doença. Nesse mesmo período (14 dias), observaram-se populações de *X. vesicatoria* significativamente alta sobre o epicótilo, seguido das folhas cotiledonares, raízes e folhas definitivas (Figura 10). O aumento da população sobre esse órgão, provavelmente, deve-se a liberação de exsudados liberados pelos tricomas, cuja base é um importante sítio de liberação de exsudados. A população da fitobactéria residente, provavelmente se utilizou desses exsudados para sobreviver.

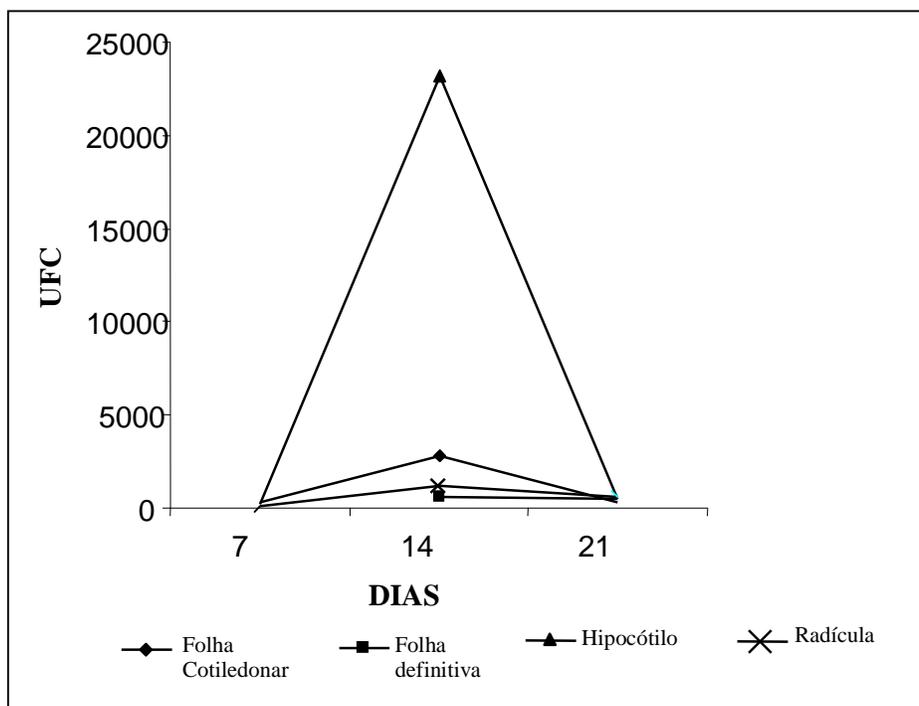
Aos 21 dias a população na região do hipocótilo diminuiu e a população das demais partes se manteve, não diferindo estatisticamente entre si. Note no gráfico 1 que a população sobre as folhas definitivas tende a se manter. Até os 21 dias não foram observados sintomas sobre as folhas como anasarcas e manchas necróticas no limbo foliar.

De modo geral aos 21 dias foram identificadas colônias de *X. vesicatoria* sobre todas as partes da planta sendo o 14º dia o período em que as plântulas de tomate apresentavam população de *X. vesicatoria* mais alta em todas as partes isoladas.

**Tabela 15** – Quantificação de *X. vesicatoria* sobre as diferentes partes das plântulas (raiz, hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas) aos 7, 14 e 21 dias de germinação em substrato comercial para mudas. A análise foi feita com a transformação dos dados para log (UFC+2) e os valores apresentados foram destransformados.

Dias	Partes da planta					Média				
	Folha Cot		Folha def		hipocótilo		Raiz			
7	293	B	-	-	228	b	86	b	188	B
14	2856	Ab	642	Ab	23201	a	1172	ab	4341	A
21	281	B	547	B	507	b	583	b	441	B
Médias	662		593		1568		444		785	

Médias seguidas da mesma letra (minúsculas no interior da tabela e maiúsculas na margem) não diferiram significativamente pelo teste t a 5%



**Figura 9** – População de *X. vesicatoria* (UFC/parte de plântula ou muda) sobre as partes das plântulas (radícula, tegumento, hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas) ao longo de 21 dias. Os valores de UFC não foram transformados.

#### 4.6 CONCLUSÕES

*Xanthomonas vesicatoria* multiplica-se no tegumento durante a fase de embebição e coloniza todos os órgãos formados (radícula, tegumento, hipocótilo, folhas cotiledonares, epicótilo e folhas definitivas). Sobre o tegumento, a população de *X. vesicatoria* é maior às 48 horas após o semeio enquanto nas radículas, hipocótilos e folhas cotiledonares esta foi maior a partir de 96 horas e se manteve sem variações significativas até 144 horas.

O processo de colonização de sementes e plântulas, observados em ensaios *in vitro*, é observado também em condições de viveiro com alta população da fitobactéria na região do hipocótilo aos 14 dias após o semeio.

#### 4.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Microbiol production of plant hormones. In: KEISTER, D. L.; CREGAN, P. B. (Eds.). **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: **Kluwer Academic**, p. 327-334, 1991.
- BACILIO-JIMENEZ, M.; AGUILAR-FLORES, S.; DEL VALLE, M.V.; PEREZ, A.; ZEPEDA, A.; ZENTENO, E. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33 p. 167-172, 2001.
- BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for the future research. **Fertilizers Research**, v. 42, p. 241-250, 1995.
- BRASIL. **Regras para Análises de Sementes**. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Brasília, SNDA/DNDV/CLAV. 365P, 1992.
- BUYER, J.S.; ROBERTS, D.P.; RUSSEK-COHEN, E. Microbial community structure and function in the spermosphere as affected by soil and seed type. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, p. 138-144, 1999.
- CORRÊA, 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.
- HADAR, Y.; HARMAN, G.E.; TAYLOR, A.G.; NORTON, J.M. Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. **Phytopathology**, v. 73, p. 1322-1325, 1983.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.
- KAVITHA, R. e 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.
- 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. (Resumo).
- KLOEPPER, J.W.; SCHER, F.M.; LALIBERTE, M.; ZALESKA, I. Measuring the spermosphere colonizing capacity (spermosphere competence) of bacterial inoculants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31p. 926-929, 1985.
- JI, P.; CAMPBELL, H.L; KLOEPPER, J.W.; JONES, J.B.; SUSLOW, T.V.; WILSON, M. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological agents and plant growth promoting rhizobacteria. **Biological control**, n. 36, p. 358-367, 2006.
- LEBEN, C. How plant-pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, v. 65, p. 633-637, 1981.

- MARIANO, R.L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife, UFRPE. 2000. 171p.
- MELOTTO, M; UNDERWOOD, W.; HE, S.Y. Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. **Annual Review Phytopathology**, v. 46, p.101–122, 2008.
- NELSON, E.B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. **Annual Review Phytopathology**, n. 42, p. 271-309, 2004.
- NELSON, E.B.; CHAO, W.L.; NORTON, J.M.; NASH, G.T.; HARMAN, G.E. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: possible role in biological control of *pythium* pre-emergence damping-off. **Phytopathology**, v.76, p. 327-335, 1986.
- NORMANDER, B.; PROSSER, J.I. Bacterial origin and community composition in the barley phytosphere as a function of habitat and presowing conditions. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p.4372-4377, 2000.
- PARKE, J.L. Population dynamics of *Pseudomonas cepacia* in the pea spermosphere in relation to biocontrol of *Pythium*. **Phytopathology**, v. 80, p. 1307-1311, 1990.
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**. 2<sup>a</sup> ed. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 2005. 417p.
- SALLES, M. R. M.; KIMURA, O.; RIBEIRO, R. L. D.; AKIBA, F. Sementes: importante fonte de inóculo de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* para culturas comerciais de pimentão no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, n. 16, p. 41, 1991. (Resumo).
- SCHAAD, N.W. Detection and identification of bacteria. In: SAETLLER, A.W.; SCHAAD, N.W. & ROTH, D.A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. Minneapolis: APS Press, 1989. 122p.
- SILVA, D.A.G. **Dinâmica populacional de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e da flora microbiana residente em plantas de pimentão submetidas a pulverizações com diferentes defensivos químicos e biológicos**. 2004. 68 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.
- SIMON, H.M.; SMITH, K.P.; DODSWORTH, J.A.; GUENTHNER, B.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M.. Influence of tomato genotype on growth of inoculated and indigenous bacteria in the spermosphere. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p.514-520, 2001.
- TEBALDI, N.D., PANIZZI, R.D.E C., SADER, R. Detecção, transmissão e efeito de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade fisiológica de sementes de brócolis. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.3, p.290-293, 2007.
- UMESHA, S. Ocurrence of bacterial canker in tomato fields of Karnataka and effect of biological seed treatment on disease incidence. **Croop Protection**, v.25, p. 375-381, 2006.

## **5 CAPÍTULO III**

### **LOCALIZAÇÃO DE *Xanthomonas vesicatoria* EM SEMENTES DE TOMATEIRO POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

## 5.1 RESUMO

Visando localizar, por meio da microscopia eletrônica de varredura, células de *Xanthomonas vesicatoria* colonizando e infectando sementes e as partes da plântula de tomate (raiz, hipocótilo, tegumento, folha cotiledonar, epicótilo e folha definitiva), foram selecionadas amostras de sementes extraídas de frutos inoculados com *X. vesicatoria* (ENA 4483), ainda verdes, por infiltração na região da placenta. Utilizaram-se amostras de sementes em diferentes fases do processo de germinação, cuja presença de *X. vesicatoria* foi previamente confirmada em isolamentos em cultura pura em meio NA. Em sementes em fase de embebição (até 24 horas após o semeio), observou-se arquitetura caracterizada por um emaranhado de tricomas que favorecem o estabelecimento e a sobrevivência de patógenos e que podem contribuir para reduzir a eficiência de tratamentos de erradicação. Este emaranhado é caracterizado pela alta densidade de tricomas cuja base apresenta formato de anel e presença de cavidade que, provavelmente, servem como sítios protetores para patógenos. No interior destas cavidades foram observadas células de *X. vesicatoria*. Além deste sítio, foi observada a formação de biofilmes de *X. vesicatoria*, provável mecanismo de sobrevivência da fitobactéria a condições adversas. A formação de fibrilas, importante no ancoramento das células entre si e sobre o hospedeiro, também foi observada. Em radículas, oriundas de plântulas com sete dias de idade, bem como de mudas com 20 dias de idade, foi observada a presença de estômatos estando vários destes colonizados por *X. vesicatoria*. Estômatos nesta região, ainda não relatados na literatura em plantas de tomate, podem ser importantes sítios de infecção para vários patógenos. No hipocótilo, em regiões próximas a estômatos, foram observadas poucas células de *X. vesicatoria* o mesmo não ocorrendo nos epicótilos, folhas cotiledonares e definitivas, apesar de resultados positivos em testes de isolamento. Em várias amostras de sementes, após o início do processo de embebição, foi detectada a presença de bactérias endofíticas, que formavam agregados com características de crescimento agressivo, posteriormente, identificada como sendo do gênero *Acinetobacter*. Esta mesma bactéria foi detectada em vários testes de germinação e isolamentos interferindo negativamente no desenvolvimento e recuperação de *X. vesicatoria*.

**Palavras chaves:** *Lycopersicon esculentum*; mancha bacteriana; *Acinetobacter* sp.; transmissão; ultra estrutura.

## 5.2 ABSTRACT

Aiming to locate, by means of electron microscopy scan, *Xanthomonas vesicatoria* cells colonizing and infecting seeds and parts of tomato seedlings (root, hypocotyl, tegument, cotyledon leaf, epicotyl and definitive leaf), there were selected samples of seeds, extracted from unripe fruit inoculated with *X. vesicatoria* (ENA 4483) through infiltration in the placenta region. Samples of seeds in different stages of the germination process were used, in which the presence of *X. vesicatoria* had been previously confirmed by pure culture isolations in AN medium. In seeds in imbibition stage (up to 24 hours after the sowing), it was observed an architecture characterized by an entanglement of trichomes that favour the establishing and the survival of pathogens and that may contribute to a reduction in the efficacy of eradication treatments. That entanglement characterizes itself by a high density of trichomes whose basis presents a ring shape and a cavity which probably serve as sheltering sites for pathogens. Inside those cavities there were noticed *X. vesicatoria* cells. Besides that site, it was noticed the formation of *X. vesicatoria* biofilms, a probable survival mechanism of the phyto bacteria under adverse conditions. The formation of fibrils, important to the anchoring of the cells among themselves and on the host, was also noticed. In radicles from seven day old seedlings, and 20 day old saplings, there was noticed the presence of stomata, many of which were colonized by *X. vesicatoria*. The presence of stomata in this region, not yet stated in the literature about tomato plants, may furnish important sites for infection to many pathogens. In the hypocotyl, in regions near the stomata, few cells of *X. vesicatoria* were noticed, what did not happen in the epicotyls, cotyledon and definitive leaves, in spite of positive results in isolation tests. In many samples of seeds, after the beginning of the process of imbibition, there was detected the presence of endophytic bacteria which made aggregates with aggressive growth characteristics, later identified as being of *Acinetobacter* gender. These same bacteria were detected in many germination tests and isolations, interfering negatively in the development and recovery of *X. vesicatoria*.

**Key-words:** *Lycopersicon esculentum*; bacterial stain; *Acinetobacter* sp.; transmission; ultra structure.

### 5.3 INTRODUÇÃO

A mancha bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas vesicatoria* (DOIDGE) (VALTERIN et al., 1995; JONES et al., 1998), tem a semente como uma das principais fontes primárias de inóculo (KIMURA, 1984; SCHAAD, 1982; SCHAAD, 1988; SHARON et al., 1982; SHEKHAWAT e CHACKRAVARTI, 1979). Apesar da importância a doença (JONES et al., 1998) e da semente como veículo do patógeno existem poucos trabalhos sobre os mecanismos de sobrevivência da bactéria pela semente. A utilização da microscopia eletrônica de varredura, apesar de usada por SILVA et al (2002) não tem sido muito empregada nestes tipos de estudos. Ela pode ser utilizada para a descrição da morfologia das sementes, uma vez que existe grande variação nos detalhes morfológicos e anatômicos entre diferentes espécies plantas, particularmente em suas estruturas envoltórias, que podem servir como abrigo de patógenos. Segundo MENTEM e BUENO (1987), a taxa de aderência de propágulos é consideravelmente influenciada pelas características da superfície da semente. Sendo assim, a identificação de microsítios de fixação e sobrevivência e de proteção por meio da microscopia eletrônica de varredura poderá vir a auxiliar no desenvolvimento de técnicas mais eficientes de tratamento, detecção do patógeno e de tratamentos de erradicação.

Trabalhos conduzidos por SILVA et al. (2002), por meio da microscopia eletrônica de varredura, evidenciaram que a ação do calor (70° por 96 horas) aplicado às sementes para erradicar *X. vesicatoria* danificou a estrutura das sementes de tomateiro, promovendo a fusão dos tricomas, criando domínios estruturais que podem servir de abrigo para as células sobreviventes de *X. vesicatoria*.

Entre os detalhes importantes observados em avaliação ultra estrutural das sementes de tomate está a descoberta de estômatos (SILVA et al, 2002) e o seu possível papel como porta de entrada para *X. vesicatoria* no interior das sementes. Os estômatos são definidos como estruturas primárias existentes na epiderme de órgãos aéreos da planta. A sua distribuição ocorre frequentemente nas partes aéreas fotossintetizantes, principalmente na lâmina foliar, e podem também ser encontrados, em menor número, nos pecíolos, caules jovens e partes florais, como pétalas, estames e gineceu. Segundo BELTRATI e PAOLI (2003), os estômatos em sementes aparentemente são rudimentares. Apesar da informação de que estão ausentes na rizoderme (ESAÚ, 1965; FAHN, 1982), estômatos têm sido relatados sobre a rizoderme de raiz primária de algumas espécies de leguminosas *Pisum arvense* (ervilha forrageira), *Ornithopus annuus* (TARKOWSKA e WAKOWSKA, 1988), *Pisum sativum* (ervilha) (LEFEBVRE, 1985) e *Ceratonia siliqua* (alfarrobeira) (CHRISTODOULAKIS et al., 2002).

Além da estrutura anatômica da semente possibilitar a fixação do patógeno, muitas bactérias apresentam estratégias para a sua sobrevivência sob condições adversas, dentre elas a formação de agregados em biofilmes. As células bacterianas agregadas em biofilme são embebidas em uma substância composta de exopolissacarídeos, que as protegem principalmente da dessecação, radiação UV, ação de substâncias antibióticas. Essa condição permite a troca de material genético entre as células, garantindo maior variabilidade genética do que as células planctônicas ou em agregados fora do biofilme (COSTERTON et al, 1995, DAVEY e O'TOOLE, 2000). A expressão desse comportamento entre as bactérias reforça ainda mais a utilização da microscopia eletrônica de varredura como ferramenta no estudo da patologia de sementes.

Estudos da interação bactérias x sementes são importantes na área de patologia de sementes e podem subsidiar o desenvolvimento de métodos de tratamentos visando a redução ou erradicação do patógeno e causar menos danos às sementes. Com essa visão, estudos mais aprofundados sobre a morfologia ultra estrutural das sementes, a partir de técnicas de microscopia eletrônica de varredura, evidenciando sítios de proteção, bem como observações

do comportamento de *X. vesicatoria* sobre as estruturas das sementes, podem ser fundamentais para um maior entendimento sobre essas interações.

Os objetivos deste trabalho foram: a) descrever as estruturas da superfície das sementes de tomate e identificar os possíveis nichos de sobrevivência de *X. vesicatoria* e b) acompanhar o processo de colonização das sementes e plântulas de tomate por *X. vesicatoria* ao longo do processo de embebição e germinação.

## 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

Para estudar a morfologia das sementes de tomateiro *Lycopersicon esculentum* Mill, utilizaram-se diferentes amostras de sementes da cultivar Santa Clara Miss Brasil adquirida de firma produtora de sementes ou sementes extraídas de frutos inoculados, ainda verdes, por infiltração na região da placenta, cultivados em condição de casa-de-vegetação no campo experimental do Setor de Horticultura do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ.

As amostras de sementes observadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) do laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) – Campos – RJ foram previamente selecionadas em ensaios *in vitro* realizados no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) – Seropédica – RJ.

### 5.4.1 Inoculação artificial das sementes de tomateiro

Utilizaram-se amostras de sementes comerciais inoculadas artificialmente com o isolado ENA 4483 de *X. vesicatoria* por meio de infiltração a vácuo. Neste procedimento, as sementes foram imersas em suspensão bacteriana contendo aproximadamente  $10^8$  UFC/mL e após foi aplicado vácuo de 680 mm de Hg durante cinco minutos, seguido de liberação lenta. Esse procedimento foi repetido por três vezes. Completando o processo, as sementes foram peneiradas, colocadas em placas de Petri esterilizadas e mantidas em câmara de fluxo laminar à temperatura ambiente por 24 horas (item 4.4.1).

Utilizaram-se também amostras de sementes extraídas de frutos frescos produzidos no campo experimental da UFRRJ, inoculadas com o isolado ENA 4483 de *X. vesicatoria* por infiltração da suspensão bacteriana na região da placenta, quando ainda verdes. A suspensão bacteriana usada nas inoculações foi ajustada para aproximadamente  $10^8$  UFC/ml. Para descrição do processo de colonização das sementes e plântulas utilizaram-se sementes selecionadas ao longo dos ensaios de estudos dos mecanismos de transmissão da fitobactéria da planta para as sementes (capítulo I itens 3.4.1 e 3.4.2) e ensaios dos mecanismos de transmissão de *X. vesicatoria* da semente para planta (capítulo II itens 4.4.1 e 4.4.2) que apresentaram resposta positiva para a presença de *X. vesicatoria*.

Das diferentes amostras coletadas selecionaram-se algumas sementes obtidas de frutos desenvolvidos a partir de flores inoculadas e de frutos inoculados ainda verdes, de vez ou maduros e que apresentavam resultados positivos em isolamentos em meio de cultura (Tabela 16). Visando aumentar a população de *X. vesicatoria* nas amostras a serem analisadas sob MEV, em uma segunda etapa, efetuou-se a incubação prévia da semente em papel germitest por 36, 48, 120 e 168 horas e após em meio de cultura NA a 28 °C por 48 horas (Tabela 17). Visando acompanhar o processo de colonização de *X. vesicatoria* em plântulas ou mudas, ao longo de seu desenvolvimento, ainda foram retiradas amostras de partes de plântulas ou mudas (raiz, hipocótilo, folha cotiledonar e folha definitiva) de sementes inoculadas pelo procedimento à vácuo, cultivadas em casa-de-vegetação, aos 7, 14 e 21 dias (Tabela 18).

**Tabela 16** – Identificação das amostras de sementes de tomateiro extraídas de frutos inoculados, ainda verdes, com *X. vesicatoria* por diferentes métodos (atomização da flor, atomização da epiderme do fruto, infiltração no mesocarpo e infiltração na placenta), durante os estudos de transmissão da fitobactéria da planta para as sementes. As sementes foram extraídas dos frutos e imediatamente fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) sem colocação em substrato.

Identificação da planta	Tipo de inoculação
01-	Atomização da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na flor aberta
09-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região do mesocarpo
11-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região da placenta
12-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região do mesocarpo
14-	Atomização da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na flor aberta
18-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região da placenta
19-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região do mesocarpo
20-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região da placenta
24-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região do mesocarpo
25-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região da placenta
27-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região do mesocarpo
29-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região do mesocarpo
31-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região da placenta
33-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região do mesocarpo
34-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região do mesocarpo
36-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região da placenta
45-	Infiltração da suspensão de <i>X. vesicatoria</i> na região do mesocarpo

**Tabela 17** – Descrição das amostras selecionadas para eletromicrografia de varredura submetidas a diferentes períodos de incubação e diferentes substratos.

Material observado	Substrato usado	HAS	Tipo de inoculação	Protocolo
Tegumento	Papel germitest	zero	À vácuo	11848
Tegumento	Papel germitest	Zero	À vácuo	11849
Tegumento	Papel germitest	Zero	Infiltração na placenta	11850
Tegumento	NA	zero	Infiltração na placenta	11852
Tegumento	Papel germitest	zero	À vácuo	11859
Tegumento	NA	36	à vácuo	11853
Tegumento	NA	48	Infiltração na placenta	11855
Tegumento	NA	48	Infiltração na placenta	11857
Tegumento + radícula	NA	48 .	Infiltração na placenta	11851
Tegumento	NA	120	Infiltração na placenta	11854
Tegumento + radícula	NA	168	Infiltração na placenta	11858
Tegumento + radícula	NA	168	Infiltração na placenta	11856

HAS – Horas após o semeio

**Tabela 18** - Descrição das partes de plântulas (raiz, hipocótilo, folhas cotiledonares e folhas definitivas) desenvolvidas em substrato comercial oriundas de sementes inoculadas com *X. vesicatoria* por infiltração à vácuo.

Material observado	Dias após o semeio	Protocolo
Raiz	14	12056
Raiz	20	12060
Hipocótilo	14	12059
Hipocótilo	14	12061
Folha cotiledonar	20	12057
Folha definitiva	20	12058

#### **5.4.2 Preparo das amostras para observações no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).**

As amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram fixados em paraformaldeído [4%], glutaraldeído [2,5%] em tampão fostato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 M, pH 6,8). Em seguida, foram lavados em triplicata em tampão fostato (0,05 M). Procedeu-se nova lavagem no mesmo tampão. Logo após, foram desidratados em série acetônica crescente (15, 30, 50, 70, 90, 2x 100% e super seca) e, posteriormente completamente secos pelo ponto crítico do dióxido de carbono no *Critical Point Dryer* (CPD 030, BAL-TEC, Alemanha). Posteriormente, estes segmentos foram metalizados com ouro e observados em microscópio de varredura, modelo DSEM 962 Zeiss. As imagens (formato TIFF) digitalizadas foram armazenadas em disquete para impressão e reprodução dos resultados.

## 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.5.1 Localização de *X. vesicatoria* sobre o tegumento das sementes

Em micrografias eletrônicas de varredura (MEV) de sementes comerciais, observou-se que o tegumento possui várias estruturas anatômicas que podem servir de sítio de fixação para *Xanthomonas vesicatoria*. O tegumento possui duas zonas, uma pilosa, majoritária, e outra lisa. A zona pilosa apresenta muitos nichos para adesão microbiana, sendo os tricomas o principal sítio de aderência de microrganismos. As eletromicrografias de varredura mostram densidade muito alta de tricomas, dispostos tanto em posição paralela ao tegumento (Figura 11B), como perpendicular (Figura 10B). Os tricomas são constituídos de base em forma de anel com cavidades, que podem servir de abrigo para *X. vesicatoria* e outros microrganismos (Figura 10E).

A alta densidade de tricomas pode servir de barreira física a aplicação de tratamentos, como termoterapia via calor seco, reduzindo a eficiência de controle. Trabalhos conduzidos por SILVA et al. (2002) evidenciaram que a ação do calor danificou a estrutura das sementes de tomateiro com a fusão dos tricomas, criando domínios estruturais que podem servir de abrigo para as células sobreviventes de *X. vesicatoria*.

A zona lisa do tegumento apresenta algumas fissuras que também podem servir de abrigo para a fitobactéria, porém esta é uma região vulnerável para o estabelecimento de microrganismos, pois expõe às células a ação de substâncias erradicantes usadas no tratamento de sementes, como fungicidas/bactericidas, ou do calor usado na termoterapia, já que não oferece sítio de proteção.

Não foram observadas células de *X. vesicatoria* sobre as amostras de sementes selecionadas para MEV a partir de frutos inoculados com *X. vesicatoria* por diversos métodos (atomização da flor aberta, atomização da epiderme do fruto, infiltração na região do mesocarpo ou da placenta) e que foram extraídas e imediatamente fixadas em solução de glutaraldeído. No entanto, sementes pertencentes à mesma amostra apresentaram crescimento de *X. vesicatoria* quando foram depositadas diretamente sobre o meio de cultura. Provavelmente a concentração de inóculo nas sementes estava muito baixa, o que dificultou a localização de células de *X. vesicatoria*. O uso do MEV permite uma varredura de pelo menos um lado da semente. Portanto, as explicações mais razoáveis para isso denotam da baixa densidade de bactérias estabelecidas nesta condição e que podem estar endofiticamente localizadas (difíceis de ver). De outro lado, o preparo da amostra pode remover a bactéria da semente, pela lavagem, desidratação e ponto crítico. Neste caso, em função da baixa densidade, sua lixiviação do sítio pode levar a conclusão que não existe *X. vesicatoria* associada à semente, o que não é verdade já que a mesma foi recuperada em meio.

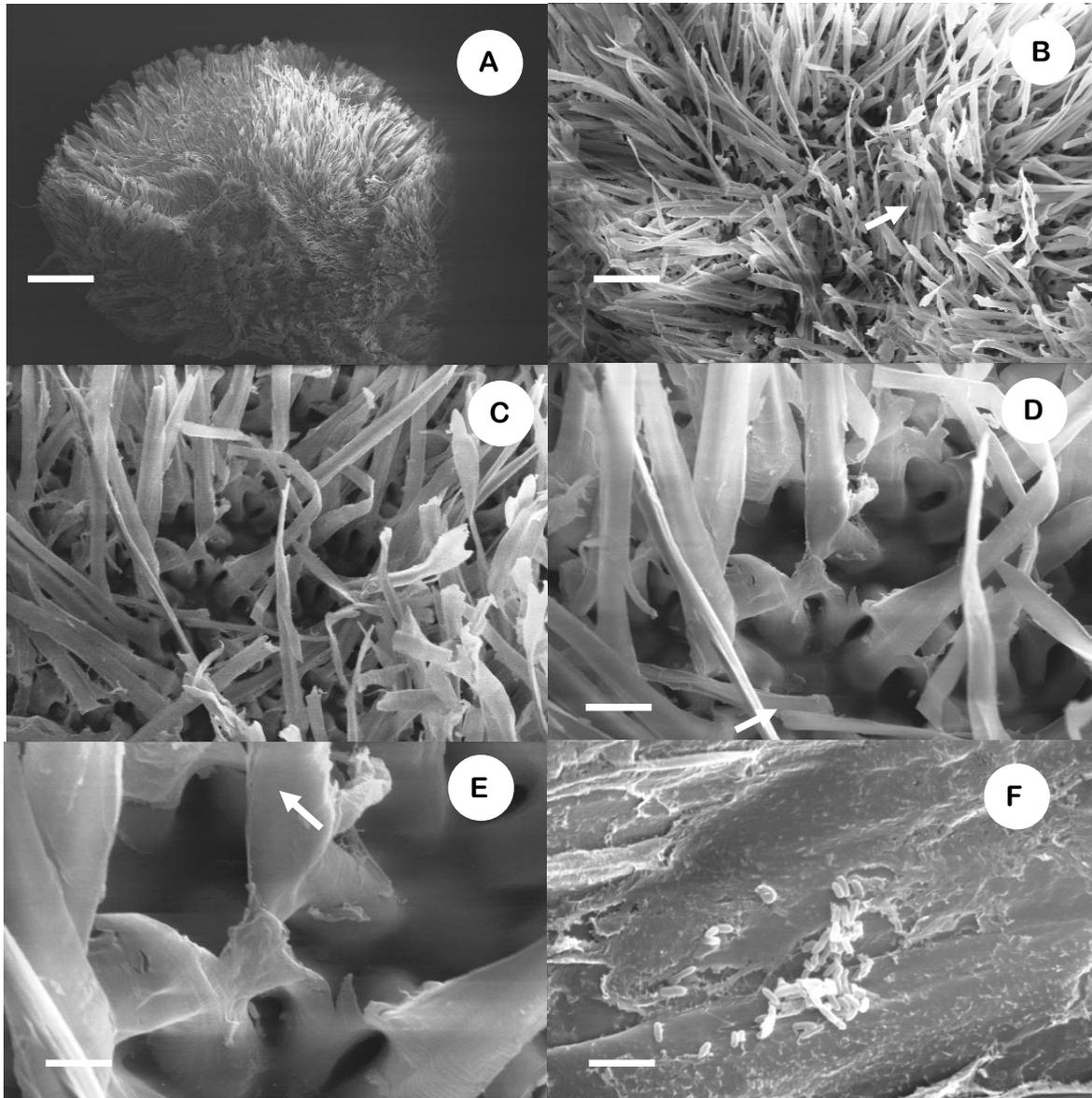
Esta hipótese foi confirmada pelas observações em amostras de sementes que foram inoculadas por infiltração a vácuo e fixadas em solução de glutaraldeído 36 horas após o semeio em papel germitest. O tempo de embebição das sementes em água provavelmente proporcionou a liberação de exsudados que foram utilizados por *X. vesicatoria* para multiplicação e aumento da concentração de inóculo, facilitando a localização a partir de MEV.

A figura 10 mostra a morfologia da superfície da semente comercial semeada em substrato de papel germitest umedecido com água esterilizada e fixado em solução de glutaraldeído 36 horas após o semeio. A superfície é caracterizada por um emaranhado de tricomas. A densidade de tricomas pode favorecer o estabelecimento e a sobrevivência de patógenos (Figuras 10A e 10B), por oferecer sítios de proteção e dificultar a remoção das células com a aplicação de tratamentos de erradicação. A estrutura da base desses tricomas possui um arranjo favorável à fixação de patógenos, com formato de anel e o interior da

cavidade oca, no qual foram localizadas células de *X. vesicatoria* aderidas ao interior do anel (Figuras 10D e 10E). Apesar dos tricomas servirem de barreira mecânica contra fatores externos do ambiente, a sua arquitetura forneceu abrigo para a fitobactéria.

Nesta mesma amostra foi localizada a região lisa da semente com células de *X. vesicatoria* aderidas à superfície, formando micro-colônias (Figura 10F). No entanto, esta é uma região vulnerável para estabelecimento de microrganismos que são expostos à ação de substâncias erradicantes como fungicidas/bactericidas ou do calor usado na termoterapia. SILVA et al. (2002) observaram em MEV, o efeito da termoterapia sobre a superfície de sementes de tomateiro inoculadas com *X. vesicatoria*. Os autores constataram que a superfície das sementes era caracterizada pela existência de inúmeras estruturas como arestas, depressões, cavidades, tricomas e estômatos, que favorecem a fixação do patógeno sobre a sua superfície. Os resultados também revelaram que a densidade de tricomas prejudicou o tratamento térmico, tendo o calor danificado a ultra estrutura dos tricomas que se fundiram criando túneis que poderiam servir de abrigo para as células sobreviventes.

No geral nas eletromicrografias de varredura foram observadas células de *X. vesicatoria* aderidas em vários microsítios por fixação apolar, como células isoladas ou em monocamada, ou formando agregados em micro-colônias.



**Figura 10** – Eletromicrografias de varredura (MEV) de semente comercial de tomate, cv. Santa Clara inoculada com *X. vesicatoria* por infiltração a vácuo. A – Visão geral da semente mostrando a densidade de tricomas em forma de cabeleira (Barra = 0,4 mm); B – Emaranhado de tricomas (Barra = 7  $\mu\text{m}$ ); C e D – Os tricomas arranjados em forma de anel. Estes podem constituir sítios de proteção para a fitobactéria contra diversos métodos de tratamento de sementes. (Barras = 2,7 e 1,5  $\mu\text{m}$ ); E - Células de *X. vesicatoria* aderidas no interior da cavidade da base do tricoma (Seta) (Barra = 2,7  $\mu\text{m}$ ). F – Superfície lisa da semente apresentando agregados de *X. vesicatoria* aderidos à superfície (Barra = 1,5  $\mu\text{m}$ ).

A figura 11 mostra a estrutura da semente comercial de tomate, inoculada com *X. vesicatoria* por infiltração a vácuo e semeada em papel germitest e após cinco dias de germinação (120 horas) foi depositada em meio NA. Após 48 horas essas amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído. Nessa amostra, foram localizadas células da fitobactéria aderidas em fixação apolar ao longo de toda a superfície dos tricomas, os quais encontravam-se dispostos horizontalmente (tricomas deitados) (Figuras 10B e 10C). Note que nessa amostra foi localizada maior população de *X. vesicatoria* sobre a superfície. A fitobactéria se desenvolveu ao longo de todo o comprimento dos tricomas. Esse fato deve-se provavelmente ao tempo que a fitobactéria teve para se multiplicar na fase de embebição das sementes (120 horas). *X. vesicatoria* provavelmente utilizou os exsudados liberados pela semente durante a fase de embebição e protusão da raiz para se multiplicar e se estabelecer sobre as sementes. A deposição em NA também favoreceu o aumento da população bacteriana. Esse procedimento empregado antes da fixação das sementes em solução de glutaraldeído promoveu maior facilidade na localização de *X. vesicatoria* pela multiplicação das células sobre as sementes.

As sementes que foram retiradas do gerbox após 168 horas de germinação (7 dias) e em seguida foram depositadas em meio NA, apresentaram população maior que as sementes com 120 horas de germinação (5 dias) (Figura 12). Foram localizadas células de *X. vesicatoria* entre os tricomas e sobre os tricomas (Figuras 12B, 12C e 12D). Observa-se células de *X. vesicatoria* por toda a superfície da semente. Durante o processo de emergência, resultando no desenvolvimento da radícula e do hipocótilo, a plântula provavelmente exsuda substâncias que são utilizadas por *X. vesicatoria* permitindo sua multiplicação e sobrevivência.

No geral, as células de *X. vesicatoria* foram localizadas mais facilmente em amostras de sementes no final do processo de germinação (a partir de 36 horas de embebição). O desenvolvimento da plântula forneceu condições de multiplicação de *X. vesicatoria* sobre o tegumento pela liberação de exsudados.

As eletromicrografias de varredura revelaram *X. vesicatoria* formando agregados em biofilmes, que é bastante freqüente entre as bactérias (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990; COSTERTON et al, 1995) (Figuras 11D, 11E e 11F). Essa característica é fundamental para a bactéria sobreviver em seu hospedeiro e manter o sítio de infecção, pois as células do biofilme são embebidas em uma matriz de exopolissacarídeos, secretada por elas próprias, que as protege de adversidades no hospedeiro, além de promover a troca de material genético entre suas células. Por isso, a formação de biofilme oferece às células vantagem seletiva que favorece o estabelecimento de determinadas populações de bactérias, que podem não ser encontradas na fase solitária. As células integrantes do biofilme são protegidas da dessecação, exposição aos raios UV, predação e a ação de bactericidas (COSTERTON et al, 1995, DAVEY e O'TOOLE, 2000).

Entre o emaranhado de tricomas foram observadas estruturas envolvidas na adesão como microfibrilas associadas ao biofilme (Figuras 11B e 11C). Essas estruturas de origem protéicas ou celulósica servem para ancorar as células entre si e no hospedeiro. OLIVARES et al. (2005) relataram que na fase de ancoragem (fase de adesão irreversível da bactéria à planta) é freqüente a presença de microfibrilas protéicas, associadas à biofilmes, interconectando bactérias e ancorando a bactéria a planta.

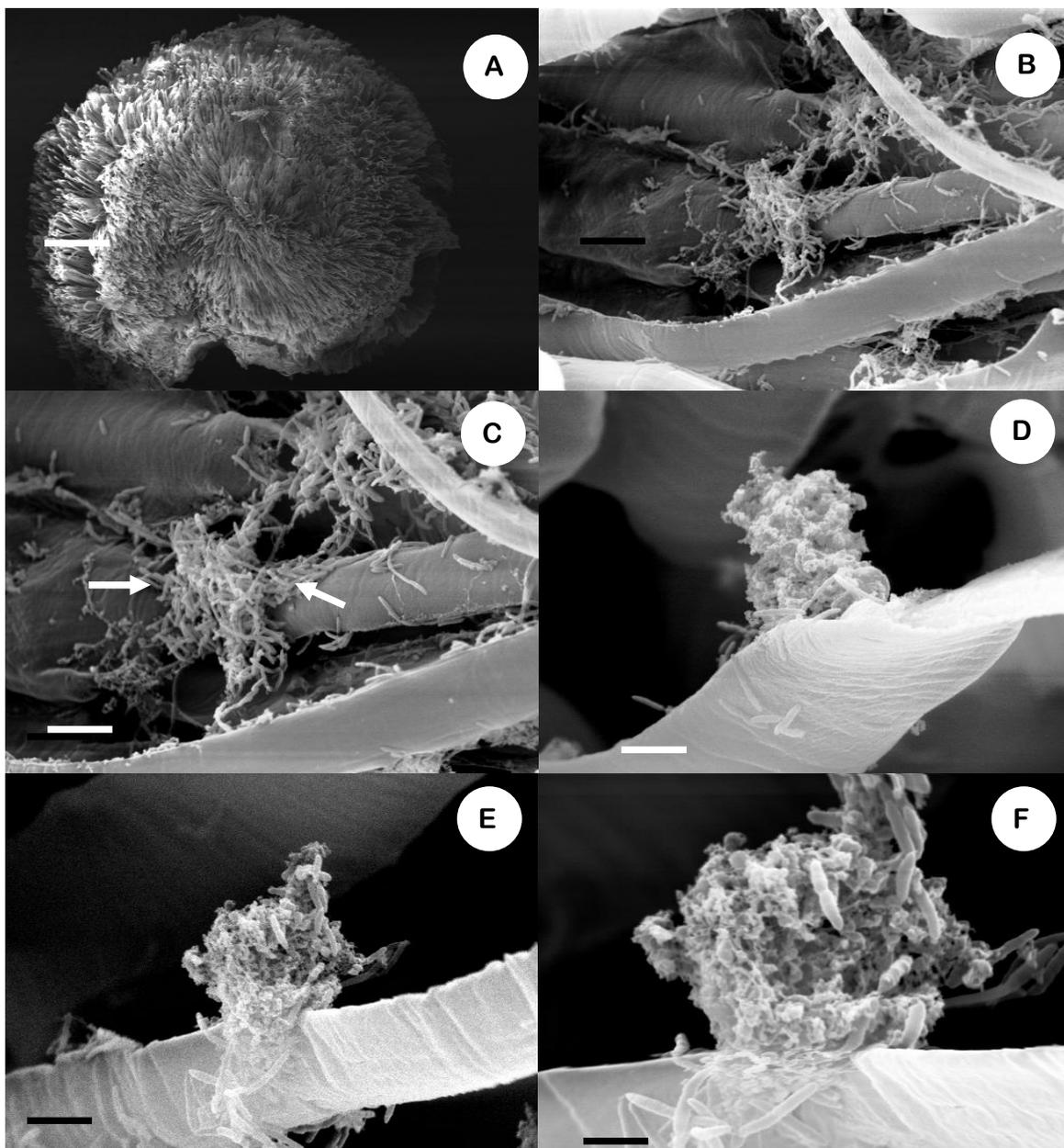
As células de *X. vesicatoria* agregaram-se em biofilmes como estratégia de sobrevivência e manutenção no sítio de infecção. A expressão desse comportamento pode acontecer em sementes produzidas comercialmente, uma vez que estejam associadas à fitobactéria. A eficiência das aplicações de substâncias erradicantes, como fungicidas/bactericidas e até mesmo da utilização da termoterapia em sementes de tomate, pode ser afetada negativamente, pois os biofilmes de grandes agregados protegem as células bacterianas contra todas essas adversidades. A ineficiência do tratamento térmico, citada por

vários autores, pode ser explicada pela expressão desse comportamento (formação de biofilmes), e não porque as células bacterianas encontram-se no interior da semente.

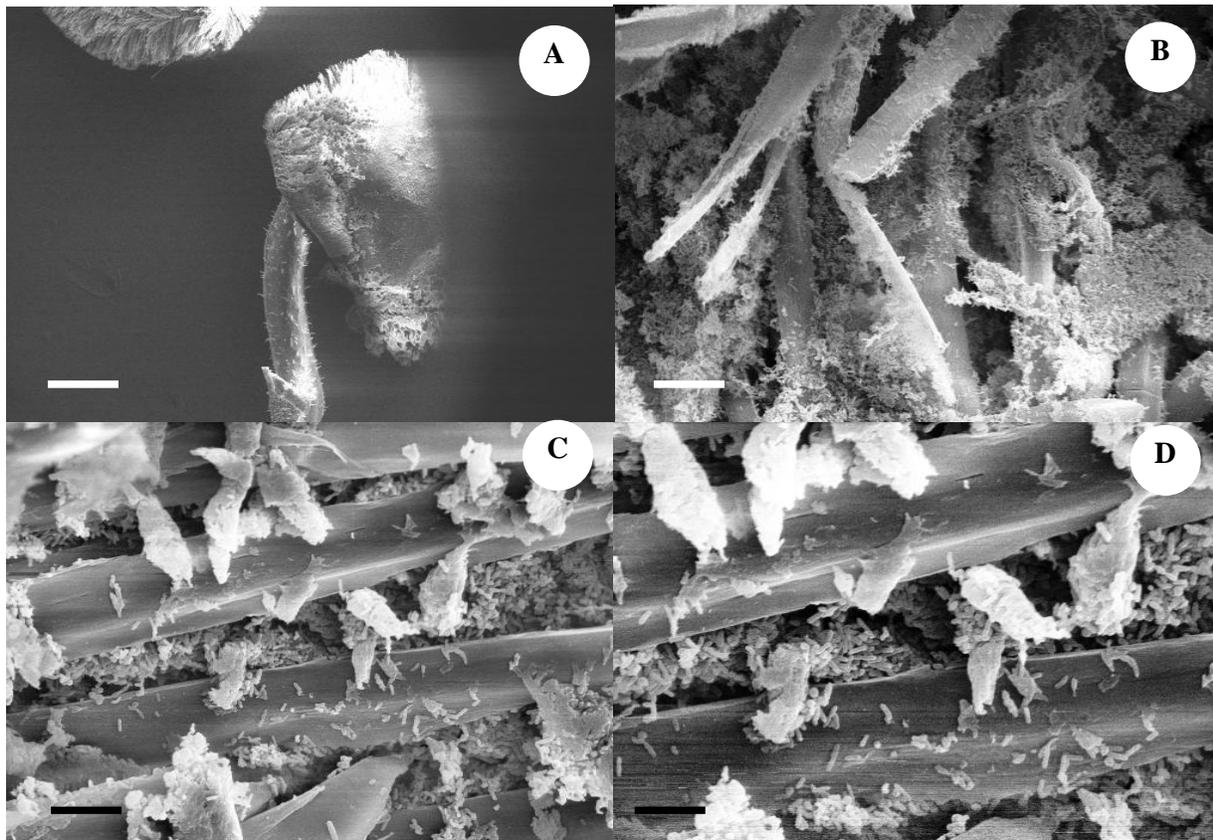
Deste modo, ao formar biofilme de grandes agregados, essas células de *X. vesicatoria* podem sobreviver aos tratamentos aplicados sobre as sementes. Ao atingir um sítio favorável, sua habilidade para resistir a remoção é uma vantagem seletiva (OLIVARES et al., 2005), dada pelo biofilme que fornece barreiras físicas e químicas contra as adversidades. A formação de biofilme nas sementes de tomate pode ser uma explicação para a ineficiência do tratamento de sementes.

Os biofilmes também aumentam a chance da disseminação aérea, devido à presença da matriz exopolimérica que protege as células contra a dessecação e a radiação UV. Somente entre 0,02 a 11% das bactérias colocadas no ar podem ser cultivadas. O restante das células morre ou não são viáveis para o isolamento (LIGHTHART, 1997). Em média, as células sobreviventes estão associadas com partículas com diâmetro aerodinâmico igual ou superior a 2,1  $\mu\text{m}$ .

LIGHTHART (1997) observou que menos de 10% de bactérias do gênero *Xanthomonas*, que são colocadas no ar, chegam viáveis ao hospedeiro. A maioria das células viáveis de *X. vesicatoria*, que pairam sobre cultivos de tomate, estão associadas a agregados com diâmetro igual ou superior a 3,3  $\mu\text{m}$  (MCINNES et al., 1988). A dimensão de uma célula de *X. vesicatoria* varia de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,3 a 0,5  $\mu\text{m}$  de largura.



**Figura 11** - Eletromicrografias de varredura (MEV) da superfície da semente comercial de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, inoculada com *X. vesicatoria*, por infiltração a vácuo. As sementes foram retiradas do gerbox 120 horas após a germinação e depositadas em NA por 48 horas. A – Visão Geral da semente (Barra = 0,4 mm); B e C – Células de *X. vesicatoria* em fixação apolar na base dos tricomas. Note a formação de cordões (fibrilas) nas quais a fitobactéria se ancora entre si e sobre a superfície do tricoma e tegumento (setas) (Barras = 7 e 2,7  $\mu\text{m}$ ); D, E e F - Formação de biofilme sobre os tricomas, este é um importante mecanismo para sobrevivência em condições adversas; pois a matriz de polissacarídeos fornece resistência a antibióticos e remoção das células por lavagem (Barras = 1,5, 2,7 e 2,7  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 12** - Eletromicrografias de varredura (MEV) de semente de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, extraída de fruto inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por infiltração na região da placenta. A amostra foi retirada do gerbox 7 dias após o semeio e em seguida depositada em meio NA por 48 horas. A – Visão geral da semente e radícula (Barra = 0,7  $\mu\text{m}$ ); B – Tricomas impregnados de *X. vesicatoria* (Barra = 14  $\mu\text{m}$ ); C e D – Espaços entre os tricomas lotados de *X. vesicatoria* (Barras = 7 e 4,5  $\mu\text{m}$ ).

### 5.5.2 Localização de *X. vesicatoria* sobre as radículas e raiz principal das plântulas

As radículas (ou raiz embrionária) foram caracterizadas pela presença de pelos radiculares e estômatos em diferentes níveis de abertura. A epiderme da radícula possui depressões e elevações côncavas, que marcam o contorno da parede celular (Figuras 13A e 13B). Por toda a epiderme foram encontradas células de *X. vesicatoria* aderidas por fixação apolar de células isoladas ou formando agregados. Porém a distribuição não foi uniforme. Estudos de colonização bacteriana na rizosfera indicam que a distribuição de células isoladas ou formando agregados ao longo das raízes é desuniforme (ROVIRA e CAMPBELL, 1974). A população de *X. vesicatoria* se concentrou nas áreas próximas aos sítios de exsudação radicular (zona de emergência da radícula, estômatos, pelos radiculares) (Figura 13).

A semente ao iniciar a germinação, libera compostos metabólicos na forma de exsudados que são aproveitados por microrganismos que compõe a espermosfera. Isso é possível, devido à ruptura do tegumento durante o processo de embebição. Altíssimos níveis de exsudados são liberados pelas sementes minutos após o início da embebição e, com o passar das horas, diminui gradualmente até cessar (aproximadamente entre 8 e 12 horas). Durante a fase de protusão e extensão da radícula exsudatos de metabólitos de baixo peso molecular (açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e compostos voláteis) são liberados novamente (NELSON, 2004). Observou-se que as células de *X. vesicatoria* utilizam metabólitos liberados nessa região para se estabelecer (Figuras 13 e 14).

A base dos pelos radiculares também é um outro grande sítio de exsudação na raiz. Pelos radiculares são definidos como extensões tubulares das células epidérmicas que se formam na epiderme sobre a junção das paredes radiais entre duas células corticais (RAVEN et al., 2007). Na base desses pelos, são liberadas substâncias voláteis que são utilizadas pela fitobactéria. Observa-se que na base do pelo radicular se concentram células de *X. vesicatoria* formando agregados, a passo que em locais mais afastados as células são distribuídas isoladamente (Figura 13F).

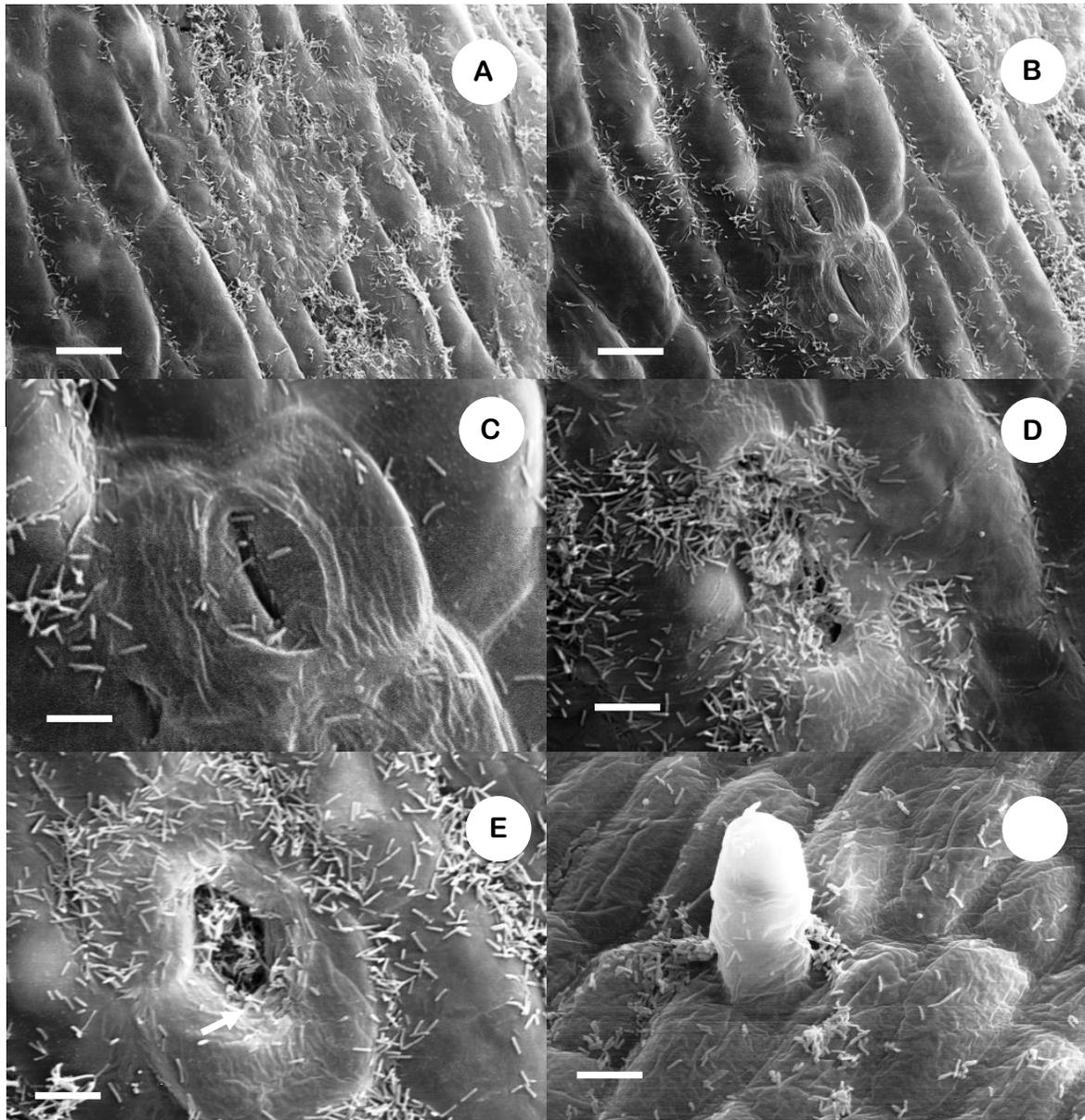
Uma outra característica observada sobre a superfície das radículas foi a presença de estômatos de forma elíptica, reniforme, apresentando duas células-guarda com três níveis de abertura (completamente abertas, semi-abertas e fechadas). Observou-se que as células-guardas desses estômatos parecem estar ativas, pois em um mesmo segmento de raiz, foram observados células túrgidas (estômatos abertos), células semi-túrgidas (estômatos semi-abertos) e células flácidas (estômatos fechados). Todos os estômatos observados apresentavam células de *X. vesicatoria*, colonizando o interior do poro estomático e a periferia.

A presença de estômatos radiculares em tomate, até o momento, é desconhecida. Estômatos (do grego *stoma* que significa 'boca') são definidos como pequenas estruturas na epiderme, cada um circundado por duas células-guarda, as quais mudam seu formato para conduzir a abertura e o fechamento desses poros. São estruturas responsáveis pelas trocas gasosas da planta, incluindo o vapor d'água, possibilitando a sua entrada ou saída na planta, estando relacionados com a fotossíntese e a produtividade. Podem ser encontrados em caules verdes, flores, frutos (RAVEN et al., 2007) e sobretudo em folhas.

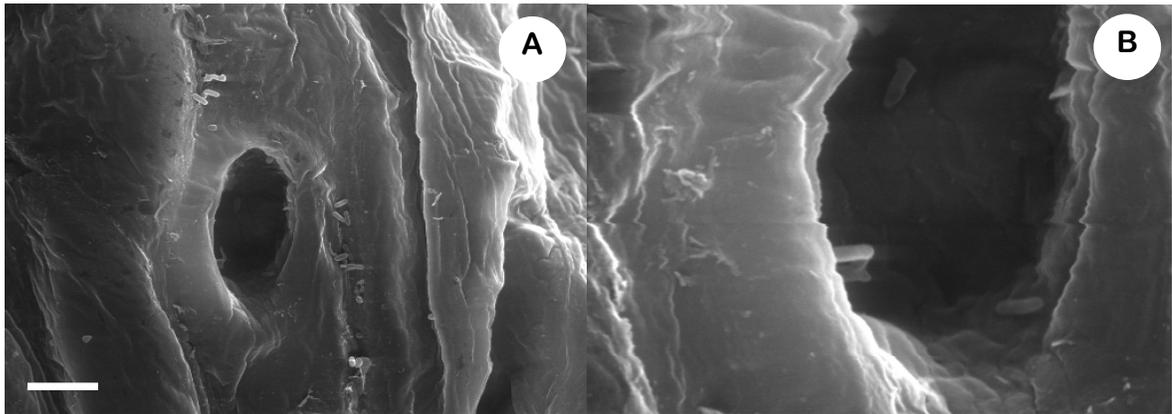
O movimento de abertura e fechamento das células-guarda é regulado, dentre outros fatores (químicos e hormonais), pela temperatura, qualidade e intensidade de luz e concentração de CO<sub>2</sub>. Aparentemente, não apresentam função na raiz. Porém, existência de estômatos no rizoplane, do ponto de vista epidemiológico, garante uma porta de entrada para vários patógenos, principalmente os que causam infecções sistêmicas.

Na figura 13B pode ser observada a presença de dois estômatos adjacentes colonizados por *X. vesicatoria*. Note que as células-guardas parecem estar semi-abertas com colônias da fitobactéria no interior do poro (Figura 13C). As figuras 13D e 13F mostram estômatos

completamente abertos com o interior dos poros impregnados de células de *X. vesicatoria*. Note que muitas células encontravam-se em divisão binária.



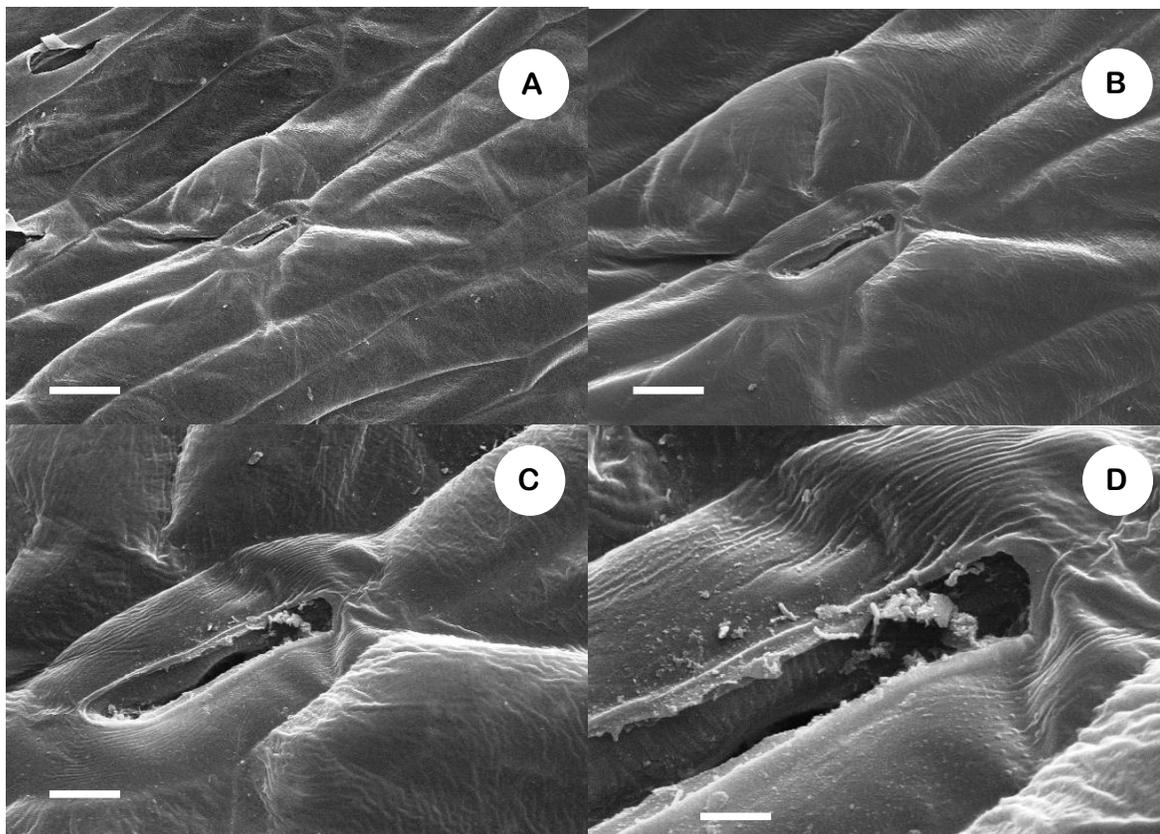
**Figura 13** – Eletromicrografias de varredura (MEV) da superfície radicular de plântulas tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, obtidas a partir de sementes de fruto inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por infiltração na placenta. A – Área próxima a emergência da raiz colonizada por células de *X. vesicatoria* (Barra = 14 µm); B – ampliação de A evidenciando a presença de estômatos nessa região colonizados pela fitobactéria (Barra = 13,5 µm); C– Detalhe de *X. vesicatoria* no interior do poro estomático (Barra = 4,5 µm); D e E – Estômatos completamente abertos e colonizados por *X. vesicatoria*. Note que esta estrutura serve de via de entrada para *X. vesicatoria* e provavelmente outros patógenos, principalmente os de comportamento vascular (Barras = 7 µm); e F – Pelo radicular colonizado por *X. vesicatoria*. Note maior concentração de células na base do pelo, provavelmente devido a maior liberação de exsudados (Barra = 7 µm).



**Figura 14** – Eletromicrografias de varredura (MEV) de radículas de plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de sementes extraídas de fruto inoculado com *X. vesicatoria*, ainda verde, por injeção na região da placenta. A amostra foi retirada do gerbox sete dias após o semeio e em seguida depositada em meio NA por 48 horas. A radícula apresenta estômato completamente aberto. A – Estômato com células de *X. vesicatoria* colonizando a periferia do poro (Barra = 4,5 µm) B – *X. vesicatoria* no interior do ostíolo (Barra = 1,4 µm).

Observando as eletromicrografias das figuras 13, e 14 supõe-se que os estômatos em radículas com sete dias são ativos, devido a observação de diferentes níveis de abertura do poro em um mesmo segmento. Essas plântulas foram conduzidas em laboratório (semeadura em caixas gerbox sobre papel germiteste umedecido com água estéril seguido de acondicionamento em câmara BOD) com temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12 horas. A atividade dos estômatos da radícula pode ter sido regulada, dentre outros fatores, pela luz, a qual as plântulas foram expostas.

A figura 14 mostra as características morfológicas da raiz primária de mudas com 20 dias de idade, que foram cultivadas em condições de viveiro. A raiz principal é caracterizada pela presença de estômatos semi-abertos (Figura 15). No entanto esses estômatos aparecem com menos frequência que os estômatos de radículas com 7 dias, além de suas células-guardas apresentarem mesmo nível de abertura. A concentração de microrganismos também é menor que em radículas com 7 dias de idade, provavelmente por que nessa região da raiz, a exsudação de nutrientes já cessou. A partir do desenvolvimento das raízes laterais, os sítios de exsudação nesse local, passam a ser próximos a base dos pelos radiculares.

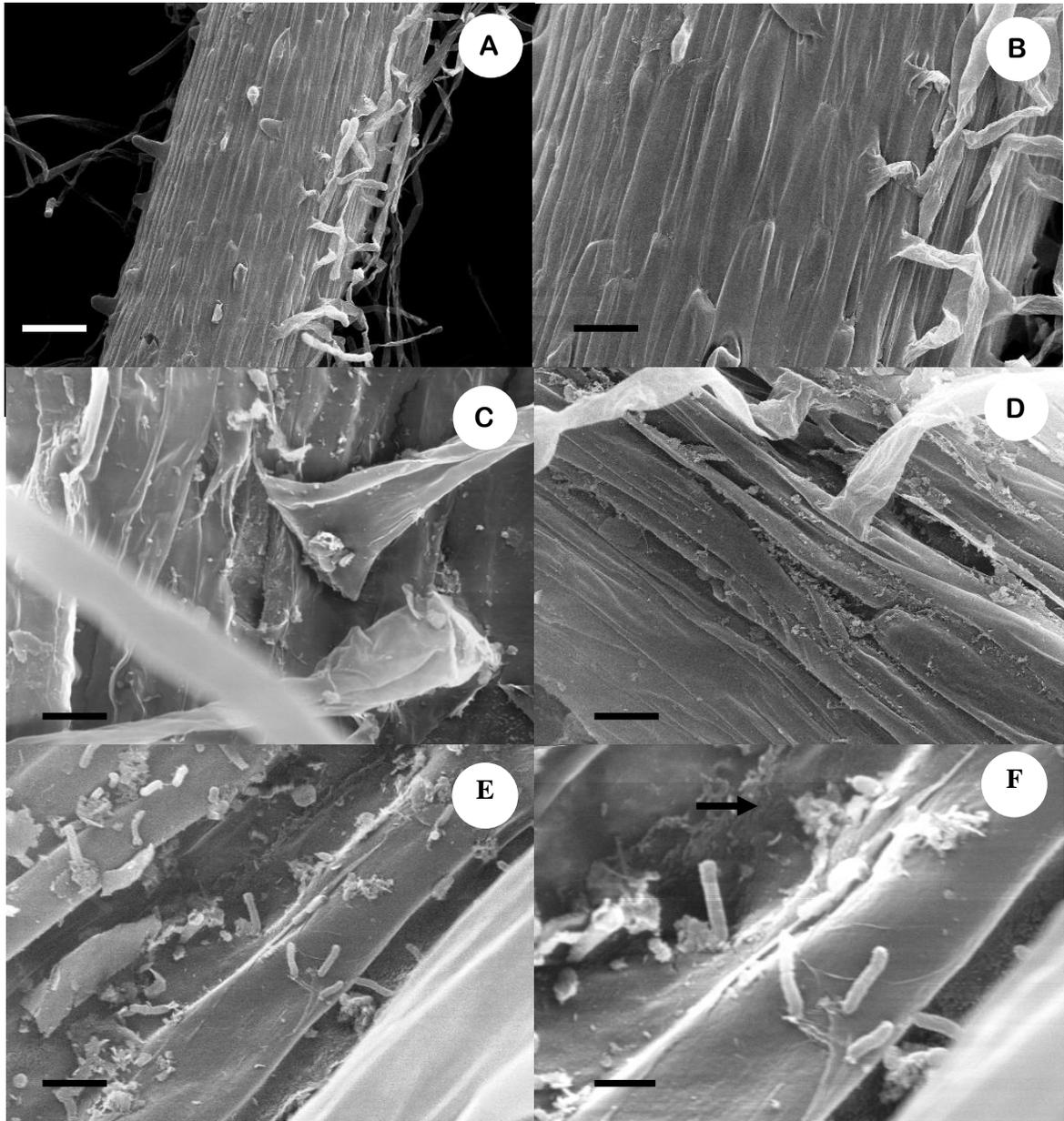


**Figura 15** - Eletromicrografias de varredura (MEV) da raiz primária de uma planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, com 20 dias de idade cultivada em condições de viveiro. A e B – Estômato localizado na raiz principal, com as células-guardas semi-túrgidas (Barras = 27 e 14  $\mu\text{m}$ ). C e D – Detalhe do estômato semi-aberto com células de *X. vesicatoria* no contorno e no interior do poro estomático. Note presença de muco associado as células da fitobactéria (Barras = 7 e 2,7  $\mu\text{m}$ ).

A raiz primária com 20 dias de idade também apresentou estômatos sobre o tecido dérmico, porém com menor frequência que as radículas de sete dias. Aparentemente, esses estômatos não são funcionais, uma vez que, o mesmo segmento de raiz apresentou estômatos com células-guarda com o mesmo nível de abertura, com os poros semi-abertos. Provavelmente esses estômatos deixaram de ser ativos pela ausência de luz, que no ambiente solo seria o fator mais limitante. Do ponto de vista epidemiológico, de qualquer forma, os estômatos (funcionais ou não) são importantes vias de acesso ao interior das plantas de tomate.

Em relação a colonização de *X. vesicatoria* sobre a raiz primária, observou-se que a concentração de células reduziu consideravelmente em relação às radículas de sete dias, provavelmente devido a limitação de nutrientes. Ao longo da raiz principal, não foram localizados sítios de exsudação radicular.

Raízes laterais de plantas com 20 dias de idade também foram investigadas. A morfologia das raízes laterais é caracterizada por apresentar a epiderme afundada e muitos pelos radiculares, possivelmente sítios de exsudação da raiz. Sobre as fissuras e na base dos pelos foram localizadas células individuais de *X. vesicatoria* aderidas em fixação apolar entre as fissuras (Figura 16).



**Figura 16** - Eletromicrografias de varredura (MEV) da raiz lateral de uma planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cv. Santa Clara, com 20 dias de idade, produzida a partir de sementes comerciais inoculadas com *X. vesicatoria* (ENA 4483) por infiltração a vácuo, em bandejas de isopor contendo substrato comercial e cultivadas em casa-de-vegetação. A e B – Visão geral de um seguimento de raiz secundária (Barras = 70 e 27,7  $\mu\text{m}$ ); C- Descolamento do pelo radicular, formando um sítio de infecção para patógenos. Note que entre as fissuras são localizadas células de *X. vesicatoria* (Barra = 7  $\mu\text{m}$ ); D – Colonização de *Acinetobacter* sp. entre as fissuras da epiderme afundada (Barras = 14  $\mu\text{m}$ ); E – Células simples de *X. vesicatoria* aderidas por fixação apolar na epiderme (Barra = 2,7  $\mu\text{m}$ ); F – Células centrais de *X. vesicatoria* em divisão binária. (Barra = 7,5  $\mu\text{m}$ ).