

RELAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE INOCULAÇÃO NA INFECÇÃO DE SEMENTES DE PIMENTÃO POR *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, CAUSADORA DO CANCRO BACTERIANO

RELATIONSHIP BETWEEN INOCULATION METHODS ON SWEET PEPPER'S SEEDS INFECTION BY *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* CAUSED BY BACTERIAL CANKER

Amauri Bogo¹; Armando Takatsu²; Mari Inês C. Boff¹; Cassandro V. T. do Amarante¹.

RESUMO

Infecções em sementes de pimentão pelo agente causal do cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) foram induzidas por diferentes métodos de inoculação: a) pulverização das flores com uma suspensão bacteriana; b) inoculação por ferimento de agulha, através de uma gota de suspensão bacteriana, depositada sobre o pedúnculo de pequenos frutos; c) inoculação por ferimento de agulha, através de uma gota de suspensão bacteriana, depositada nas axilas do primeiro par de folhas permanentes e d) pelo métodos “a” e “b”. Todos os métodos de inoculação testados produziram sementes infectadas tanto no pericarpo, endocarpo e embrião, independentemente de apresentarem sintomas visuais. Infecções através desta rota podem ocorrer também no campo, quando a doença se torna epidêmica. A seleção de sementes pelo simples aspecto sanitário visual não é um método confiável, pois a bactéria pode ser transmitida por sementes sem sintomas visuais.

PALAVRAS-CHAVE: *Capsicum annuum* L., sanidade de sementes, transmissão por sementes.

SUMMARY

Seed infection of sweet pepper by bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) were induced by different methods of inoculation: a) spraying of flowers with bacterial suspension; b) prick inoculation of pedicel tip of small fruits with needle through a droplet of bacterial suspension; c) prick inoculation of stem through a droplet of bacterial suspension deposited at the insertions of first pair of permanent leaves and d) by methods “a” and “b”. All the inoculation methods produced infected seed with or without visual symptoms, with the infection in

pericarp, endosperm and embryo. When flowers were inoculated by spraying of flowers, the pathogenic bacteria seemed to invade seeds through calyx scar and vascular bundle. Infection through this route was suggested to occur in field when the disease become epidemic. The selection of seeds through visual sanity aspect is not trustful parameter because the bacteria can be transmitted by symptomless seeds.

KEY-WORDS: *Capsicum annuum* L., seeds sanity, seeds transmission.

INTRODUÇÃO

A bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis (CMM), agente causal do cancro bacteriano em pimentão (*Capsicum annuum* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pode sobreviver em sementes, no solo (BASU, 1970; STRIDER, 1969 e 1970; VOLCANI et al., 1970; DIAS & TAKATSU, 1989) e em hospedeiros secundários (ARK & THOMPSON, 1960). GROGAN & KENDRICK (1953) relataram que a transmissão da doença pelas sementes foi menor do que 1% em tomate e que a infecção pode ser controlada pelo tratamento químico de sementes. TSIANTOS (1987) mostrou que a transmissão de CMM por inoculações artificiais das sementes é muito variável. Os resultados dependem das condições ambientais durante a condução dos experimentos e dos métodos de inoculação. Além disso, o autor verificou que a alta umidade relativa favorece a disseminação do patógeno e que as plantas hospedeiras podem apresentar populações do patógeno em fase endofítica sem causar a doença. Portanto, estas populações podem se tornar patogênicas sob condições favoráveis ao desenvolvimento da doença.

A disseminação da bactéria a longas distâncias ocorre através de sementes contaminadas e caixas

¹ Eng. Agrônomo, Ph.D. - Universidade do Estado de Santa Catarina/UEDESC. Centro de Ciências Agroveterinárias/CAV. Av. Luiz de Camões, 2090. CEP. 88520-000. Lages/SC. E-mail: a2ab@cav.udesc.br

² Eng. Agrônomo, Dr. - Universidade Federal de Uberlândia. Centro de Ciências Biológicas. Av. Amazonas s/n, Campus Umarama. CEP. 38.405-320. Uberlândia/MG.

de colheita, enquanto que a curtas distâncias ocorre pela ação das chuvas, água de irrigação e principalmente, com a desbrota, a capina, o desbaste e outros tratamentos culturais (MOURA & OLIVEIRA, 1996; JONES et al., 1991). Conforme CHANG et al., (1991), a ocorrência de 0,01 a 0,05% de sementes de tomateiro infectadas é capaz de iniciar uma epidemia em uma lavoura de tomate.

Todos os trabalhos visando avaliar métodos de transmissão e localização de CMM em sementes foram feitos somente em tomate, e, como a doença vem se tornando problemática também na cultura do pimentão, este trabalho teve como objetivo estudar métodos de transmissão e localização do patógeno em sementes de pimentão.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de pimentão da cultivar Magda foram transplantadas para vasos com 10 litros de substrato [solo (50%), areia (15%), matéria orgânica (15%), vermiculita (15%) e adubo químico NPK 5-20-10 (0,5%)]. As plantas foram separadas em quatro parcelas e cada parcela constituída de seis plantas. Foram testados quatro métodos de inoculação do patógeno para as sementes, sendo a) plantas inoculadas por ferimento de agulha, através de uma gota de suspensão bacteriana com uma concentração de inóculo de 10^9 unidade formadora de colônia (UFC)/mL, depositada nas axilas do primeira par de folhas permanentes; b) pulverização das flores durante a polinização, com uma suspensão bacteriana na concentração de 10^9 UFC/mL; c) inoculação por ferimento de agulha, através de uma gota de suspensão bacteriana com concentração de 10^9 UFC/ mL, depositada sobre o pedúnculo de pequenos frutos e d) pelos métodos “b” e “c” subsequentes. As flores foram pulverizadas (pulverizador manual) com um volume de 500 mL de suspensão bacteriana a cada 2 dias, durante todo o período de florescimento. As plantas inoculadas pelo método “c” receberam apenas uma inoculação, quando os frutos apresentavam 15 a 20 mm de diâmetro. Ao

final do ciclo da cultura, os frutos maduros foram colhidos e as sementes extraídas para avaliação.

As sementes que apresentavam sintomas visuais de queima de bordos e encarquilhamento, bem como as sadias, receberam tratamentos diferenciados para avaliar a localização do patógeno no interior das sementes. Três métodos de detecção do patógeno nas sementes foram testados: a) lavagem durante 10 minutos com Tween 20 (0,02%) e plaqueamento em meio seletivo; b) desinfecção com álcool 70% durante 3 minutos, lavagem com água estéril, agitação durante 15 horas em tampão fosfato 0,05 M a temperatura de 4°C e plaqueamento em meio seletivo e c) trituração de sementes, que receberam o tratamento “b”, em cadinho de porcelana, e plaqueados em meio seletivo.

As sementes utilizadas nos tratamentos “b” e “c” foram lavadas previamente durante 10 minutos com Tween 20 (0,02%).

O meio seletivo utilizado para isolamento da bactéria das sementes foi o SCM (FATMI & SCHAAD, 1988). As placas foram incubadas por quatro a cinco dias a temperatura de 28°C, e, após este período, observou-se a presença ou não de colônias circulares de 1 a 2 mm de diâmetro, mucosas e de cor cinza escuro à preta, típica da bactéria CMM.

As variáveis apresentadas na Tabela 1 foram submetidas a análise de variância obedecendo ao delineamento inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Para fins de análise, as quatro primeiras variáveis foram transformadas em $(x)^{1/2}$ e as demais em $\text{arc sen } (x/100)^{1/2}$. As variáveis apresentada nas Tabela 2 e 3 foram submetidas a análise de variância obedecendo ao delineamento inteiramente casualizado, em parcelas sub-subdivididas, e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados do presente estudo, pode-se observar que os métodos de inoculação testados induziram as plantas a produzirem uma diferença significativa no número total de frutos, no número total de sementes e na porcentagens de sementes com e sem sintomas visuais (Tabela 1).

Tabela 1- Comportamento na obtenção de sementes de plantas de pimentão cultivar Magda, inoculadas com uma suspensão bacteriana na concentração de inóculo de 10^9 UFC por mL de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em diferentes métodos de inoculação .

	MÉTODOS					
	testemunha	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	CV%
frutos analisados (n.)	7,54a	5,97 b	3,08 c	3,43 d	0,29 d	18,13
total sementes (n.)	954,18 a	147,16 d	208,22 c	163,56 c	600,89 b	7,81
sementes/frutos (n.)	451,42 a	0,1206 d	62,20 c	37,57 c	375,43 b	21,32
sementes sem sintomas visuais (n.)	954,18 a	123,85 c	123,39 c	85,83 c	580,47 b	11,42
sementes com sintomas visuais (n.)	-	30,81 c	91,14 b	90,75 b	15,94 d	10,45
sementes sem sintomas visuais (%)	100 a	91,40 b	62,58 c	60,37 c	97,48 a	1,68
sementes com sintomas visuais (%)	-	8,60 b	37,42 a	39,63 a	2,52 c	4,20

T₁: pulverização das flores; T₂: inoculação no pedúnculo fruto; T₃: pulverização flores mais inoculação no pedúnculo frutos e T₄: inoculação na axila do primeiro par de folhas permanentes. Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

As plantas inoculadas na axila do primeiro par de folhas permanentes, produziram número maior de sementes por fruto e uma menor porcentagem de sementes com sintomas, quando comparado com os outros métodos (Tabela 1). Os métodos de pulverização das flores e pulverização das flores mais inoculações no pedúnculo dos frutos, produziram um número menor de sementes por fruto, quando comparado com os outros métodos (Tabela 1). Estes resultados provavelmente se devem ao fato de que os frutos provenientes dos tratamentos que receberam tanto pulverizações das flores separadamente e/ou combinado com inoculações no pedúnculo dos frutos, apresentaram sintomas de cancro muito forte, com encarquilhamento, rachadura, e, um menor tamanho dos frutos, quando comparados com os frutos provenientes das plantas inoculadas na axila do primeiro par de folhas permanente. Os métodos de pulverização das flores e pulverização das flores mais inoculação no pedúnculo dos frutos foram os que induziram maior porcentagem de sementes com sintomas (Tabela 1). As sementes com sintomas, proveniente dos diferentes métodos de inoculação, apresentaram uma coloração parda, com os bordos escuros e menor

tamanho que as sementes sadias, sugerindo que a bactéria invade a semente através da cicatriz do cálice e feixes vasculares do fruto.

Na Tabela 2, pode-se observar que sementes sintomáticas e assintomáticas foram infectadas, independentemente da região das sementes avaliada, sendo que a maior concentração de bactéria localizou-se primeiramente no pericarpo, em seguida no embrião e posteriormente no endocarpo. Inoculações por pulverização das flores mais inoculação no pedúnculo dos frutos produziram maiores infecções em sementes com e sem sintomas visuais, quando comparados com os outros métodos separadamente. Inoculações na fase inicial de desenvolvimento das plantas (primeira par de folhas permanentes) produziram baixa incidência de doença, sendo que a concentração da bactéria foi maior no pericarpo das sementes sem sintomas visuais, quando comparadas com as sementes sintomáticas (Tabela 3). Neste mesmo método de inoculação, não foi detectada a bactéria no endosperma em ambos os casos de sementes sintomáticas e assintomáticas (Tabela 2 e 3). Como a bactéria está presente tanto em sementes com e sem sintomas, é inviável a seleção de sementes para o

plântio de lavouras com base na sintomatologia. Isto sugere que as sementes contaminadas pela

bactéria são uma forma eficiente de sobrevivência e de disseminação do patógeno.

Tabela 2. Infecções no pericarpo, endocarpo e embrião de sementes com e sem sintomas, provenientes de plantas de pimentão do cultivar Magda, inoculadas com uma suspensão bacteriana na concentração de 10^9 UFC/mL de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em diferentes métodos de inoculação.

INFECCÃO DAS SEMENTES (n° colônias por placa)						
MÉTODOS	COM SINTOMAS			SEM SINTOMAS		
	pericarpo	endocarpo	embrião	pericarpo	endocarpo	embrião
T ₁	82,98 B a	4,33 C c	33,73 A b	76,46 A a	8,65 B b	7,78 A b
T ₂	60,83 C a	11,15 B c	20,49 B b	30,24 B a	7,04 B c	10,03 A b
T ₃	93,44 A a	24,17 A c	35,12 A b	80,85 A a	14,38 A b	5,28 B c
T ₄	7,56 D a	0,00 D c	5,51 C b	11,85 C a	0,00 C c	3,52 B b

T₁: pulverização das flores; T₂: inoculação no pedúnculo fruto; T₃: pulverização flores mais inoculação no pedúnculo frutos e T₄: inoculação no pecíolo do primeiro par de folhas permanentes. Coeficiente de variação dos tratamentos 8,84% e dos locais 8,20%.

Médias seguidas da mesma letra maiúscula nas colunas e minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 3. Infecções no pericarpo, endocarpo e embrião de sementes com e sem sintomas visuais, provenientes de plantas de pimentão do cultivar Magda, inoculadas com uma suspensão bacteriana na concentração de 10^9 UFC/mL de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em diferentes métodos de inoculação.

INFECCÃO DAS SEMENTES (n° colônias por placa)						
MÉTODOS	PERICARPO		ENDOCARPO		EMBRIÃO	
	sementes		sementes		sementes	
	com sintomas	sem sintomas	com sintomas	sem sintomas	com sintomas	sem sintomas
T ₁	82,98 a	76,46 b	4,33 b	8,65 a	33,73 a	7,78 b
T ₂	60,83 a	30,24 b	11,15 a	7,04 b	20,48 a	10,03 b
T ₃	93,44 a	80,85 b	24,17 a	14,38 b	35,12 a	5,28 b
T ₄	7,56 b	11,85 a	0,00 a	0,00 a	5,51 a	3,52 b

T₁: pulverização das flores; T₂: inoculação no pedúnculo fruto; T₃: pulverização flores mais inoculação no pedúnculo frutos e T₄: inoculação no pecíolo do primeiro par de folhas permanentes. Coeficiente de variação dos sintomas: 8,22%.

Médias seguidas da mesma letra nas linhas, dentro da mesma região da semente, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Sendo a bactéria CMM um patógeno altamente contagioso, para seu controle recomenda-se uma série de medidas tais como: uso de produtos químicos à base de

antibióticos e fungicidas cúpricos, que visam impedir a introdução, multiplicação e disseminação do patógeno, mas que apresentam pouca eficiência, seja pela insensibilidade

do patógeno às drogas ou pela sua forma inadequada de aplicação (DHANANTARI, 1989); uso de cultivares resistentes; e evitar o plantio em locais anteriormente cultivados com pimentão e/ou tomate, obedecendo-se rotação de cultura por um período mínimo de 3 anos. Embora essas medidas permitam reduzir a porcentagem de sementes contaminadas e/ou infectadas por esse patógeno, não o erradicam.

A produção de sementes livres do patógeno é de grande importância para a indústria e para os agricultores e neste caso, indica-se como método mais eficiente e tradicional para o controle a utilização de sementes sadias, através da produção de sementes certificadas. O cancro bacteriano evidencia a importância de programas de certificação que envolvem tanto as inspeções visuais de campo, como testes de laboratório para a detecção da bactéria nas sementes. As inspeções, por sua vez, não asseguram a sanidade das sementes produzidas, pois sementes assintomáticas são uma fonte de inóculo em potencial, enfatizando a importância dos testes de laboratório, como instrumento complementar de controle. Neste sentido, várias técnicas podem ser sugeridas, como crescimento em meios diferenciais, inoculação em plantas hospedeiras, uso de bacteriófagos, imunofluorescência e meios seletivos e semi-seletivos.

Todavia, as técnicas tem sido elaboradas para detecção de bactérias em sementes, elas apresentam limitações quanto a sensibilidade, especificidade, custo e tempo de execução. A detecção de pequeno número de bactérias fitopatogênicas em sementes é dificultada pelo grande número de bactérias saprófitas taxonomicamente relacionadas ao patógeno que os acompanham e interferem com o crescimento do patógeno sobre meios seletivos.

CONCLUSÃO

1. Todos os métodos de inoculação testados produziram sementes infectadas, tanto no pericarpo, endocarpo e embrião, apresentando ou não sintomas visuais;
2. O método de pulverização das flores mais inoculação no pedúnculo dos frutos produziram maiores níveis de infecção em sementes com e sem sintomas visuais;
3. A seleção de sementes de pimentão livres de infecção ocasionada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pelo simples aspecto sanitário visual não é um método confiável, pois a bactéria pode ser transmitida por sementes sem sintoma visual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARK, P.A.; THOMPSON, J. P. Additional horsts for tomato canker organism *Corynebacterium michiganense*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 44, n.1, p. 98 – 99. 1960.

BASU, P. K. Temperature, an important factor determining survival of *Corynebacterium michiganense* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n.6, p. 825 – 827. 1970.

CHANG, R. J.; RIES, S. M.; PATAKY, J. K. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n.10, p. 1276-1281. 1991.

DHANANTARI, B. N. Effect of seed extration methods and seed treatments on the control of tomato bacterial canker. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 11, n. 4, p. 401-408. 1989.

DIAS, S. C.; TAKATSU, A. Fístula bacteriana do pimentão (*Capsicum annuum*) causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* no Brasil. **Summa Phytopatologica**, São Paulo, v. 15 n. 1, p. 10. 1989.

FATMI, M.; SCHAAD, N. W. Semi-selective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n.1, p. 121 - 26, 1988.

GROGAN, R. G.; KENDRICK, J. B. Seed transmission mode of overwintering and spread of bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense* (abstr.). **Phytopathology**, St. Paul, v. 43, n. 4, p. 473. 1953.

JONES, J.B.; JONES, J. P. STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of tomato diseases**. St. Paul. APS Press. 1991, 73 p.

MOURA, A. B.; OLIVEIRA, J. R. Doenças causadas por bactérias em tomate e pimentão. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 1, p. 15-18. 1996.

STRIDER, D. L. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*: A literature review and bibliography. **North Carolina Agricultural**, v.193.110 p., 1969.

STRIDER, D. L. Tomato seedling inoculations with *Corynebacterium michiganense*. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 54, n. 1, p.36 – 39. 1970.

TSIANTOS, J. Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. **Phytopathology**, St. Paul, v.119, n. 2, p.142 - 146, 1987.

VOLCANI, Z.; ZUTRA, D.; COHN, R. A new leaf and fruit spot disease of pepper caused by *Corynebacterium*

michiganense. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 54, n.
9, p. 804 – 806. 1970.