

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
SEMENTES**



**Tese**

**ATRIBUTOS FISIOLÓGICOS E SANITÁRIOS DE SEMENTES DE  
ESPÉCIES OLERÍCOLAS**

**Jucilayne Fernandes Vieira**

Pelotas, RS

2013

**Jucilayne Fernandes Vieira**

## **ATRIBUTOS FISIOLÓGICOS E SANITÁRIOS DE SEMENTES DE ESPÉCIES OLERÍCOLAS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de doutor em Ciências (área do conhecimento: Ciência e Tecnologia de Sementes).

Orientador: Prof. Dr. Francisco Amaral Villela – UFPel/FAEM (Brasil)

Coorientador: Prof. Dr. Orlando Antonio Lucca Filho – UFPel/FAEM (Brasil)

Coorientador: PhD. Jan Van Der Wolf - Wageningen University (Holanda)

Pelotas, 2013

**Dados de catalogação na fonte:**  
**(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)**

V657a Vieira, Jucilayne Fernandes

Atributos fisiológicos e sanitários de sementes de espécies olerícolas / Jucilayne Fernandes Vieira; orientador Francisco Amaral Villela; co-orientadores Orlando Antonio Lucca Filho e Jan Van Der Wolf - Pelotas, 2013.-110f. : il.- Tese (Doutorado ) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Hortaliças 2.Teste de vigor 3.Qualidade de sementes 4.Sanidade de sementes 5.TaqMan PCR  
6.Box PCR 7.Meio semi-seletivo I.Villela, Francisco Amaral(orientador) II.Título.

CDD 635

**JUCILAYNE FERNANDES VIEIRA**

**ATRIBUTOS FISIOLÓGICOS E SANITÁRIOS DE SEMENTES DE  
ESPÉCIES OLERÍCOLAS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, para obtenção do título de “Doutor”**

**APROVADA em 27 de fevereiro de 2013**

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Francisco Amaral Villela– UFPel (Presidente)

Dr. Géri Eduardo Meneghello– UFPel

Prof. Dra. Luciana Bicca Dode– UFPel

Prof. Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha– UFPel

Dra. Maria Angélica Moreira Silveira– MAPA

**Aos mestres de ontem, o respeito pela ousadia; aos de hoje, a cumplicidade pela resistência; e, aos de amanhã, a esperança de que construirão um país justo, digno. “Não é, na realidade, com as nossas tradições que nos devemos embriagar, mas com o nosso futuro – o brilhante futuro que nos aguarda, se o soubermos preparar”.**

**(Anísio Teixeira)**

#### **DEDICO**

A toda minha família... A mainha (Leide) e painho (Amado) pelo amor infinito, por sempre apoiarem as minhas decisões e me ensinarem a nunca desistir de um sonho.

As minhas queridas, amadas e lindas irmãs (Josy, Aline e Hélen) pelo apoio, cumplicidade, incentivo e amor incondicional.

Aos meus cunhados Anderson e Tiago pelo carinho e amizade sincera.

A meu noivo Cassyo por deixar os meus dias mais felizes, por todo apoio durante o doutorado sanduíche, pelo companheirismo durante todos os momentos, pelas preciosas dicas nos trabalhos científicos e por não medir esforços para me ajudar com os experimentos. Enfim, agradeço imensamente pela parceria na vida amorosa e científica.

#### **OFEREÇO**

Ao meu incrível sobrinho Gabriel por sempre me ensinar algo sob uma perspectiva diferente e por sempre me surpreender com suas perguntas e respostas.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos recebidas em toda a minha vida.

À Universidade Federal de Pelotas e ao programa de ciência e tecnologia de sementes, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo durante o curso e também pela bolsa de doutorado sanduíche.

À Universidade e Centro de Pesquisa de Wageningen, pela oportunidade de participar do programa de treinamento no Plant Research International.

Ao professor Dr. Francisco Amaral Villela, pela orientação, atenção, incentivo, ensinamentos e confiança na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Orlando Antonio Lucca Filho, pela coorientação e pelo incentivo.

Ao pesquisador Jan Van der Wolf pela orientação, atenção e ensinamentos durante o doutorado sanduíche.

Ao meu grupo de pesquisa na Universidade de Wageningen: Patricia, Karen, Trudy, Marjon, Luc e Robert por toda ajuda, ensinamento e amizade durante o estágio. Em especial a Pieter Kastelein por quem tenho muito respeito, carinho e admiração, eu agradeço imensamente pela ajuda nos experimentos, pela orientação, pela amizade sincera e por ter sempre uma palavra de carinho e incentivo.

As amigas Lamia, Chamila, Flávia, Débora, Manuela, Charles, Somayeh, Fred e Haneck que deixaram os meus dias na Holanda mais felizes.

Aos colegas Alex, Eduardo, Júnior Abreu, Kika, Silvia, Daniel, Suemar, Zarela, Vanessa, Lilian, Marília, Marcelo, Gizele, Jady, Nilce, Micael e Lucicleia pela amizade.

A todos os professores do Programa de Ciência e Tecnologia de Sementes pelos ensinamentos transmitidos.

Aos secretários Bandeira e Bonow pela ajuda em tudo que foi preciso durante o período de doutorado.

Aos funcionários do Laboratório Didático de Análise de Sementes, pelo auxílio técnico, em especial a Ireni, Verônica e Luiza;

Ao Dr. Géri Eduardo Meneghello pelos ensinamentos durante a realização do curso.

Aos estagiários Raifer, Fernando e Tainan pela ajuda nos experimentos.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Francisco Amaral Villela, Dr. Géri Eduardo Meneghello, Prof. Dra. Luciana Bicca Dode, Prof. Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha e Dra. Maria Angélica Moreira Silveira, pelas preciosas sugestões.

A empresa de sementes Akatu pelo fornecimento das sementes de pepino.

A todos os colegas do curso pela amizade e troca de experiências, eu fico feliz por fazer novas amizades em outra região desse imenso Brasil.

E também a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	vi
<b>SUMÁRIO.....</b>	viii
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	ix
<b>RESUMO GERAL .....</b>	x
<b>GENERAL ABSTRACT.....</b>	xi
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	1
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	5
<b>CAPÍTULO I.....</b>	11
<b>POTENCIAL FISIOLÓGICO E FITOSSANITÁRIO DE SEMENTES DE ALFACE .....</b>	11
<b>RESUMO .....</b>	11
<b>ABSTRACT .....</b>	12
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	12
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	13
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	15
<b>CONCLUSÃO .....</b>	19
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	19
<b>CAPÍTULO II.....</b>	22
<b>POTENCIAL FISIOLÓGICO E FITOSSANITÁRIO DE SEMENTES DE RÚCULA .....</b>	22
<b>RESUMO .....</b>	22
<b>ABSTRACT .....</b>	23
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	23
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	25
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	27
<b>CONCLUSÃO .....</b>	32
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	32
<b>CAPÍTULO III.....</b>	37
<b>POTENCIAL FISIOLÓGICO E FITOSSANITÁRIO DE SEMENTES DE COUVE MANTEIGA .....</b>	37
<b>RESUMO .....</b>	37
<b>ABSTRACT .....</b>	38
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	38
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	40
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	42
<b>CONCLUSÃO .....</b>	45
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	45
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	48
<b>POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE COENTRO E RABANETE .....</b>	48
<b>RESUMO .....</b>	48
<b>ABSTRACT .....</b>	49
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	49
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	50
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	52
<b>CONCLUSÃO .....</b>	56
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	57
<b>CAPÍTULO V .....</b>	59
<b>POTENCIAL FISIOLÓGICO E FITOSSANITÁRIO DE SEMENTES DE PEPINO .....</b>	59
<b>RESUMO .....</b>	59
<b>ABSTRACT .....</b>	60
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	60
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	61
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	63

CONCLUSÃO .....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
CAPÍTULO VI .....	71
ROUTES OF SEED INFECTION OF <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> IN <i>Brassica oleracea</i> .....	71
ABSTRACT .....	71
RESUMO .....	72
INTRODUCTION.....	72
MATERIAL AND METHODS .....	74
RESULTS .....	79
DISCUSSION.....	91
CONCLUSION .....	93
REFERENCES.....	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	97
APÊNDICE .....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>1.CAPÍTULO I.....</b>	11
1.1 Tabela 1.....	16
1.2 Tabela 2.....	17
1.3 Tabela 3.....	18
<b>2.CAPÍTULO II.....</b>	22
2.1 Tabela 1.....	27
2.2 Tabela 2.....	31
2.3 Tabela 3.....	32
<b>3.CAPÍTULO III.....</b>	37
3.1 Tabela 1.....	42
3.2 Tabela 2.....	44
3.3 Tabela 3.....	44
<b>4.CAPÍTULO IV.....</b>	48
4.1 Tabela 1.....	52
4.2 Tabela 2.....	54
4.3 Tabela 3.....	54
4.4 Tabela 4.....	55
<b>5.CAPÍTULO V.....</b>	59
5.1 Tabela 1.....	64
5.2 Tabela 2.....	65
5.3 Tabela 3.....	66
5.4 Tabela 4.....	67
<b>6. CAPÍTULO VI.....</b>	71
6.1 Tabela 1.....	74
6.2 Tabela 2.....	83
6.3 Tabela 3.....	84
6.4 Tabela 4.....	85
6.5 Tabela 5.....	89

## RESUMO GERAL

VIEIRA, Jucilayne Fernandes. **Atributos fisiológicos e sanitários de sementes de espécies olerícolas.** 2013. 110 f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os objetivos dessa pesquisa foram avaliar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de espécies olerícolas: alface, rúcula, couve manteiga, rabanete, coentro e pepino e estudar a via de infecção *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) em sementes e pedúnculos de couve-flor. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análise de Sementes e em casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e no Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Wageningen e em casa-de-vegetação, em duas diferentes regiões da Holanda. Na avaliação da qualidade fisiológica e sanitária foram utilizados quatro lotes de sementes de alface, coentro, couve manteiga, pepino, rabanete e rúcula. Foram efetuados os seguintes testes: germinação, primeira contagem de germinação, condutividade elétrica, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência, comprimento da parte aérea e do sistema radicular, massa seca da parte aérea e do sistema radicular das plântulas, envelhecimento acelerado com solução salina e teste de sanidade. Para o estudo de via de infecção de Xcc foram utilizados sementes e pedúnculos de couve-flor. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Todos os testes de vigor utilizados nesse trabalho foram efetivos na separação dos lotes de rúcula em nível de vigor. O teste de germinação em alta temperatura classificou os lotes de sementes de alface em níveis de vigor de maneira similar à emergência de plântulas. A incidência de fungos nas sementes de alface, pepino, couve manteiga e rúcula afetaram negativamente o vigor das sementes. Os testes de primeira contagem e envelhecimento acelerado permitem o ranqueamento de lotes de sementes de couve manteiga com tendência similar à emergência de plântulas. Os testes de envelhecimento acelerado e emergência de plântulas são os mais indicados para avaliar a qualidade dos lotes sementes de rabanete e coentro. O teste de frio com estresse aos 3 e 5 dias e de envelhecimento acelerado apresentam eficiência para a avaliação do potencial fisiológico de sementes de pepino. O cultivo de plantas de couve-flor, sob manejo orgânico resultou em uma alta incidência de podridão negra e uma incidência elevada da infecção de sementes. Os resultados sugerem que abelhas não são responsáveis pela transmissão de Xcc. Em plantas gravemente infectadas não pode ser excluída a possibilidade de semente tornar-se infectada via translocação de Xcc a partir de folhas, caules, pedúnculos e via pedicelos para as sementes.

Palavras-chave: hortaliças, teste de vigor; qualidade de sementes, sanidade de sementes, TaqMan PCR, BOX PCR e meio semi-seletivo.

## GENERAL ABSTRACT

VIEIRA, Jucilayne Fernandes. **Physiological and sanitary attributes of seeds of vegetable crops.** 2013. 110 pag. Thesis (PhD)- Seed Science and Technology Program. Federal University of Pelotas, Pelotas.

The objectives of this research were to evaluate the physiological and sanitary quality of vegetable seeds such as lettuce, rocket, kale, radish, coriander and cucumber and study route of infection *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) in seeds and peduncles of cauliflower. The experiments were performed at the Laboratory of Seed Analysis and greenhouse Department of Plants of the Federal University of Pelotas (UFPel) and at the Laboratory of Plant Pathology of the Wageningen University and at greenhouses in two different regions of Netherlands. In the assessment of physiological and sanitary quality four seed lots of lettuce, coriander, kale, cucumber, radish and rocket were used. The following tests were performed: germination, first count of germination, electrical conductivity, seedling emergence, speed of emergence index , shoot length and root, seedlings dry mass of shoots and roots, accelerated aging with saline solution and sanity. To study the infection route of Xcc were used seeds and peduncles of cauliflower. The experimental design was completely randomized design and the means were compared by Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). All vigor tests used in this study were effective in separating rocket seed lots in vigor levels. The germination test using high temperature classified lettuce seed lots in vigor levels in a manner similar to seedling emergence. The incidence of fungi in seeds of lettuce, cucumber, kale and rocket negatively affected seed vigor. The first count germination test and accelerated aging allow ranking of kale seed lots with a similar trend to seedling emergence. The accelerated aging tests and seedling emergence were the most appropriated to assess the quality of radish and coriander seed lots. The cold test with evaluation at 3 and 5 days and accelerated aging test were efficient to evaluate the physiological quality of cucumber seeds. Growing plants of cauliflower under organic management resulted in a high incidence of black rot and a high incidence of seed infection. The results suggest that bees are not responsible for the transmission of Xcc. In severely infected plants cannot be excluded that seed become infected via translocation of Xcc from leaves, stems, peduncles and through pedicels for seed

Key words: vegetables, vigor tests, seed quality, seed sanity TaqMan PCR, BOX PCR and semi-selective medium.

## INTRODUÇÃO GERAL

O mercado de hortaliças no Brasil é bastante diversificado, apresentando produtos de diferentes cores, sabores, aromas e texturas, e busca atender a crescente exigência e demanda por qualidade. Nesse sentido, diversas instituições de pesquisa, empresas privadas e universidades canalizam esforços para obtenção de hortaliças mais saudáveis, nutritivas, com melhor aparência e, sobretudo seguras para o consumidor. Para que essa demanda seja atendida faz-se necessária a adoção de tecnologias de ponta, e dentre essas tecnologias destaca-se a utilização de sementes de alta qualidade, com elevado potencial de produção, tolerância a estresses, resistência a patógenos, entre outros aspectos (MORETTI, 2009).

A avaliação do potencial fisiológico de sementes é um importante componente nos programas de controle de qualidade destinados a garantir adequado desempenho das sementes e há relação direta entre esse potencial e a qualidade sanitária. A qualidade fisiológica das sementes utilizadas pelos produtores é um dos principais fatores a ser considerado para a implantação da cultura e há consenso entre os pesquisadores, tecnologistas e produtores de sementes sobre a importância do vigor das sementes e da importância de sua avaliação (PEREIRA et al, 2007; ALVES e SÁ, 2010).

O teste padrão de germinação por ser conduzido em condições ideais, geralmente superestima o potencial fisiológico dos lotes, o que torna necessário o aprimoramento dos testes para avaliação do vigor e da incidência de patógenos em sementes, buscando informações consistentes, padronizadas e em períodos relativamente curtos. Para algumas espécies, há testes padronizados para avaliar o vigor dos lotes de sementes, como por exemplo, o de envelhecimento acelerado para soja. No entanto, são necessários mais estudos sobre o uso de testes de vigor para avaliação do potencial fisiológico de sementes de hortaliças. O valor comercial dessas sementes é elevado e assim, o desenvolvimento de novos testes, o aprimoramento dos testes disponíveis e sua padronização devem ocorrer de modo rápido (McDONALD, 1998; MARCOS FILHO et al., 2005).

A qualidade da informação gerada pelos resultados dos testes de vigor também depende da escolha adequada do método, em função dos objetivos pretendidos. Por exemplo, o uso de apenas um teste pode fornecer informações incompletas. Dessa forma, a tendência predominante é a combinação do resultado de vários testes, e embora a pesquisa tenha contribuído de maneira significativa para a evolução do grau de confiabilidade dos resultados fornecidos pelos vários testes de vigor, a padronização de procedimentos ainda constitui desafio aos pesquisadores (MARCOS FILHO. e NOVEMBRE, 2009).

Desde que o vigor é um atributo somente de sementes capazes de germinar, os testes de vigor são designados para avaliar um, vários ou a maioria dos efeitos menores da deterioração sobre o potencial de desempenho das sementes. Os testes de vigor podem ser agrupados dentro das mesmas três categorias. Testes que avaliam a danificação dos sistemas básicos biológicos/bioquímicos, por exemplo, a degradação das membranas como na condutividade, resistência, turbidez e acidez da água de embebição das sementes, taxa de respiração, a reação de tetrazólio e a atividade de outros sistemas de enzimas. Evidência valiosa de danos nas membranas e mudanças na permeabilidade pode ser obtida a partir da observação direta da profundidade da coloração nos testes de tetrazólio de alguns tipos de sementes. Testes que medem a velocidade e intensidade das atividades e respostas fisiológicas, por exemplo, velocidade de germinação e de crescimento e desenvolvimento de plântulas, comprimento de plântulas, pesos verde e/ou seco de plântulas. Testes que medem mudanças na resistência ou tolerância a condições de estresse, por exemplo, o teste de frio, testes de envelhecimento acelerado e deterioração controlada, entre outros (DELOUCHE, 2002).

Os efeitos do vigor de sementes no estabelecimento do estande podem ser especialmente críticos para culturas que requerem distribuição espacial de plantas para maximizar seu rendimento como alface, repolho, cebola e couve-flor (TEKRONY e EGLI, 1991). Nesse sentido, a emergência atrasada ou “falhas” no estande podem reduzir a produção e a uniformidade das plantas na colheita. O período compreendido entre a semeadura e o estabelecimento das plântulas é uma fase crucial da produção olerícola. Dessa forma, sementes de

alta qualidade e condições que permitam máxima germinação em menor tempo possível, com máxima uniformidade de plântulas, são buscas constantes daqueles envolvidos na cadeia produtiva de hortaliças (NASCIMENTO, 2000).

A emergência rápida, uniforme e o estabelecimento do estande são essenciais para assegurar a formação de plantas bem desenvolvidas, contribuindo dessa forma para elevar o rendimento final da cultura e a qualidade do produto comercial (MARCOS FILHO e NOVEMBRE, 2009). Além do uso de sementes de alta qualidade fisiológica para a implantação da lavoura, a preocupação com a presença de patógenos associados às sementes é fundamental. Sementes contaminadas são responsáveis pela introdução de doenças nas fases iniciais da cultura, refletindo em redução de produtividade, aumento do custo de produção, além de permitir a introdução e manutenção de elevado nível de inoculo. A presença de patógenos nas sementes, independentemente de sua transmissibilidade, pode afetar o vigor e o rendimento em campo (ZORATO e HENNING, 2001; LUZ, 2003). Para Lucca-Filho (1995), sementes com fungos associados podem ser responsáveis pela transmissão de doenças para parte aérea e sistema radicular da planta e declínio da qualidade fisiológica das sementes e morte de plântulas.

Dentre as famílias de hortaliças importantes mundialmente destaca-se a família Brassicaceae. Dentre as brássicas, o cultivo de repolho, couve comum, couve-flor, rabanete e brócolis têm se expandido consideravelmente nos últimos anos. Entretanto, dentre os problemas fitossanitários que afetam a cultura das brássicas, a podridão negra causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), apresenta-se como a doença mais importante, ocorrendo em todos os continentes (WILLIAMS, 1980; QIAN., 2005).

A principal forma de disseminação do patógeno é por meio de sementes contaminadas (RODRIGUES NETO, 1995). Portanto, um dos métodos mais eficientes de controle da doença é o uso de sementes livres do patógeno. Além disso, outras medidas são preconizadas para o controle da podridão negra em cultivos convencionais como: tratamento de sementes com antibióticos ou tratamento térmico a 50 °C, por 25 a 30 minutos; uso de cultivares resistentes; destruição de restos de culturas; rotação de cultura por 2 a 3 anos com leguminosas, solanáceas ou gramíneas (MARINGONI, 1997; CARRIJO e RÉGO, 2000).

Diferentes metodologias podem ser empregadas na detecção de patógenos, com eficiência e rapidez variáveis. Uma técnica de análise genômica amplamente utilizada para procariotos é a rep- PCR (PCR repetitivo), conforme descrita por Versalovic et al. (1991). O “fingerprinting” genômico por rep- PCR utiliza “primers” com sequências de bases complementares de sequências de DNA altamente conservadas e repetitivas, presentes em múltiplas cópias nos genomas da maioria das bactérias gram-negativas e em algumas gram-positivas (RADEMAKER, 1997).

Essas famílias de sequências de DNA repetitivos altamente conservados estão dispersos no genoma de diversas espécies bacterianas (LUPSKI, 1992). Três famílias vêm sendo observadas com mais detalhes: REP (“repetitive extragenic palindromic”) (STEM et al., 1984), ERIC (“enterobacterial repetitive intergenic consensus”) (HULTON et al., 1991) e BOX (“BOX element”) (MARTIN et al., 1992). Os protocolos correspondentes são referidos como REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, coletivamente chamados de rep-PCR (VERSALOVIC et al., 1991; VERSALOVIC et al., 1994). Com base neste conceito é possível obtenção de produtos de amplificação mostrando um perfil específico em nível de espécie ou mesmo de isolados. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso em estudos de diversidade, bem como para identificação e classificação de diversas bactérias fitopatogênicas (DE BRUIJN, 1992; LOUWS et al., 1994; OPGENORTH et al., 1996).

O BOX PCR utiliza a mesma técnica que o REP PCR, que se baseia em encontrar e amplificar regiões repetitivas do genoma bacteriano (MARQUES et al., 2008). Segundo Lee e Wong (2009), a diferença entre as duas técnicas é o tipo de primer utilizado. As bandas amplificadas no rep- PCR são separadas de acordo com seu tamanho em gel de agarose e geram um perfil que serve como impressão digital específica de cada estirpe bacteriana (LUPSKI, 1993). Outra técnica importante no estudo bacteriano é a técnica de PCR em tempo real que torna possível detectar a concentração de uma determinada amostra de DNA, permitindo uma estimativa confiável do número de células. A aplicação da técnica em diagnósticos de patógenos torna-se interessante, uma vez que permite rápida e sensível quantificação (NOVAIS et al., 2004).

A semente pode apresentar contaminação externa e infecção interna por bactérias. No caso de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* normalmente

penetra na planta hospedeira via hidatódios e coloniza o sistema vascular, podendo infectar as sementes internamente (STALL et al., 1993). Em trabalho realizado com diferentes variedades de couve-flor, observou-se que flores infectadas com a bactéria desempenham papel importante na infecção interna da semente (WOLF e ZOUWEN, 2009). Nesse caso, espera-se que, se as infecções de flores desempenharem papel importante na infecção das sementes. Além disso, têm sido discutido e investigado se Xcc pode ser disseminada por insetos e insetos polinizadores. Um trabalho realizado por Van der Wolf e Van der Zouwen (2010), demonstrou que o uso de insetos (*Calliphora vomitoria*) inoculados com Xcc pode resultar em infecção interna de sementes. No caso de insetos polinizadores como, por exemplo, abelhas podem ser vetores de patógenos e agentes disseminadores de esporos de fungos e bactérias de uma planta para outra (HILDEBRAND et al., 2000; ZANDJANAKOUTACHIN et al., 2007). Entretanto, informações a respeito da transmissão de Xcc para flores por abelhas ainda são escassas, além disso, se essa transmissão pode resultar em sementes contaminadas ainda precisa ser esclarecido.

Diante do exposto, os objetivos dessa pesquisa foram avaliar o potencial fisiológico e fitossanitário de sementes de alface, coentro, couve manteiga, pepino, rabanete e rúcula e estudar a via de infecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em sementes e pedúnculos de couve-flor, usando meio de cultura semi-seletivo, TaqMan-PCR e BOX-PCR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C.Z; SÁ, M.E. Avaliação do vigor de sementes de rúcula pelo teste de lixiviação de potássio. **Revista Brasileira de Sementes**. v.32,n°2,Londrina, 2010.
- CARRIJO, I.V.; RÊGO, A.M. Doenças das brássicas. In: Zambolim, L.; Vale, F.X.R.; Costa, H. **Controle de doenças de plantas – hortaliças**. v.1, p. 444, 2000.

DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase Caín rreaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium melilot* isolates and other soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.3, p.2180-2187, 1992.

DELOUCHE, J. Germinação, Deterioração e Vigor da Semente. **Revista SeedNews, 2000.** Disponível em [www.seednews.inf.br/portugues/seed66/artigocapa66.shtml](http://www.seednews.inf.br/portugues/seed66/artigocapa66.shtml). Acesso em 06 de março de 2013.

HILDEBRAND, M., DICKLER, E., GEIDER, K. Occurrence of *Erwinia amylovora* on insects in fire blight orchard. **J Phytopathology** v.148, p. 251-256, 2000.

HULTON, C.S.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonela typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.5, n.4, p.825-834, 1991.

LEE, A.; WONG, E. Optimization and the Robustness of BOX A1R PCR for DNA Fingerprinting Using Trout Lake *E. coli* Isolates. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)** v.13, p.104-113, 2009.

LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprint of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and straisn generated with repetitive sequences an PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p.2286-2295, 1994.

LUCCA-FILHO, O.A. 1995. **Curso de Tecnologia de Sementes**. Brasília: ABEAS. 53 p.

LUPSKI, J.R.; WEINSTOCK, G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n.14, p. 4525-4529, 1992.

LUPSKI, J.R. Molecular epidemiology and its clinical application. **JAMA**, v. 270, p. 1363-136, 1993.

LUZ, W.C. da. Combinação dos tratamentos biológico e químico de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira** 28:37-40. 2003.

MARTIN, B.; HUMBERTO, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERYS, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v.20, n.13, p.3479-3483, 1992.

MARQUES, A. S. A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. BOX PCR based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae*, *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.106-115, 2008.

MARINGONI, A.C.; ROSA, E.F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.23, p.160-162,1997.

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de plantas cultivadas. **Piracicaba: FEALQ**, 2005. 496 p.

MARCOS FILHO, J.; NOVEMBRE, A. D. da L. C Avaliação do potencial fisiológico de sementes de hortaliças. In: NASCIMENTO, W. N. Tecnologia de sementes de hortaliças. Brasília, EMBRAPA, 2009. p. 185-246.

McDONALD, M.B. Improving our understanding of vegetable and flower seed quality. **Seed Technology**, Zürich. v.20, n.2, p.121- 124, 1998.

MORETTI, C.L. Apresentação. In: NASCIMENTO, W.M. **Tecnologia de sementes de hortaliças**. Brasília, DF, 2009.p.432.

NASCIMENTO W.M. Temperatura x Germinação. **SeedNews** n.4, p.44-45, 2000.

NOVAIS, C.M; PIRES-ALVES, M; SILVA, F.F. Pcr em tempo real. **Revista ciência e desenvolvimento**, n. 33. p.10-13, 2004.

OPGENORTH , D.C.; SMARTH, C.D.; LOWS, F.J. Identification of *Xanthomonas fragarie* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. **Plant Disease**, St. Paul, v.80, n.12, p.868-873, 1996.

PEREIRA R.S; NASCIMENTO W.M; VIEIRA J.V. Germinação e vigor de sementes de cenoura sob condições de altas temperaturas. **Horticultura Brasileira** v.25, p. 215-219, 2007.

QIAN, W., JIA, Y., REN, S., HE, Y., FENG, J., LU, L., SUN, Q., YING, G., TANG, D., TANG, H., WU, W., HAO, P., WANG, L., JIANG, B., ZENG, S., GU, W., LU, G., RONG, L., TIAN, Y., YAO, Z., FU, G., CHEN, B., FANG, R., QIANG, B., CHEN, Z., ZHAO, G., TANG, J AND HE, C. Comparative and functional genomic analysis of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**. v.15 p. 757-767, 2005.

RADEMAKER, J.LW; DE BRUIJN, F.J. Characterization and classification of microbes by Rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: Anolles, G.G. and Gresshoff, P.M. (Eds). DNA markers: protocols, applications and overviews. New York. J. Wiley, p.151-171, 1997.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V.A. Doenças causadas por bactérias em crucíferas. **Informe Agropecuário**, v.17 p. 56-59, 1995.

STALL, R.E.; GOTTWALD, T.R.; KOIZUMI, M.; SHAAD, N.C. Ecology of plant pathogenic *xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (eds.). *Xanthomonas*. London: Chapman& Hall, 1993. 399p.

STEM, M.J.; AMES, G. F. L.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, Washington, v. 37, n.3, p.1015-1026, 1984.

TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. Relationship of seed vigor to crop yield: a review. **Crop Science, Madison**, v.31, p.816-822. 1991.

VERSALOVIC, J; KOENTH, T; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHENEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.5, p.25-40, 1994.

WILLIAMS, P.H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, St. Paul, v.64, p.736- 742, 1980.

WOLF, J.M. VAN DER; ZOUWEN, P.S. VAN DER. Flower infections with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* can result in internal seed infection. In: Abstracts of Special Session Presentations at the 2009 APS Annual Meeting, Portland, Oregon, 1-5 August 2009. **Phytopathology**, v. 99, 2009.

WOLF, J.M. VAN DER; ZOUWEN, P.S. VAN DER. Colonization of cauliflower blossom (*Brassica oleracea*) by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, via flies (*Calliphora vomitoria*) can result in seed infestation. **Journal of Phytopathology** 158 11-12. - ISSN 0931-1785 - p. 726 -732, 2010.

ZANDJANAKOU-TACHIN, M., FANOU, A., LE GALLP, WYDRA, K. Detection, survival and transmission of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, causal agents of cassava and cowpea

bacterial blight, respectively, in/by insect vectors. **Journal of Phytopathology** v.155, p. 159 -169, 2007.

ZORATO, M.F; HENNING, A.A. Influência de tratamentos com fungicidas antecipados, aplicados em diferentes épocas de armazenamento, sobre a qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes** v.2, p.236-244. 2001.

## CAPÍTULO I

### POTENCIAL FISIOLÓGICO E FITOSSANITÁRIO DE SEMENTES DE ALFACE<sup>\*</sup>

#### RESUMO

A avaliação do potencial fisiológico de sementes é um componente importante usado nos programas de controle de qualidade das empresas produtoras de sementes, além disso, existe uma relação entre esse potencial e a sanidade das sementes. Este trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência de diferentes testes de vigor para determinação da qualidade fisiológica e associar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de alface. O experimento foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes e na casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O trabalho foi desenvolvido, utilizando-se quatro lotes de sementes de alface, cultivar Crespa Grand Rapids, abrangendo testes de germinação, primeira contagem de germinação, teste de germinação em alta temperatura, envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl, condutividade elétrica, teste de sanidade e emergência de plântulas. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com cinco repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). O teste de germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica mostraram baixa eficiência para discriminar lotes com diferenças de vigor, detectando apenas o lote de menor qualidade fisiológica. O teste de germinação em alta temperatura classificou os lotes de sementes de alface em níveis de vigor de maneira similar à emergência de plântulas. A incidência de fungos nas sementes de alface afeta negativamente o vigor das sementes e a emergência de plântulas. O teste de sanidade de sementes deve ser realizado para avaliar qualidade sanitária das sementes de alface.

**Palavras-chave:** *Lactuca sativa L.*, testes de vigor, sanidade de sementes, qualidade de sementes.

---

\*Artigo Submetido à Revista Acta Horticulturae

## ABSTRACT

The evaluation of the seed's physiological potential is an important component of seed quality control programs to ensure satisfactory performance of the seeds and there is a close relationship between this potential and seed sanitary quality. This study aimed to evaluate the efficiency of different vigor tests to determine the physiological quality and associate physiological and sanitary quality of lettuce seeds. The study was conducted at the Laboratory of Seed Analysis and at the greenhouse of the Department of Plant Science, at the Federal University of Pelotas (UFPel). Four lots of the cultivar 'Crespa' Grand Rapids were tested for the following features: initial and final moisture content (after accelerated aging), germination rate, first count of germination, germination at high temperature, accelerated aging with saline saturated solution, electrical conductivity, seedling emergence rate, and sanitary condition. A completely randomized design with five replications was used for all tests performed. Means were compared by Tukey test ( $P < 0.05$ ). It was concluded that germination, first count of germination, accelerated aging test and electrical conductivity tests showed little efficiency to discriminate between seed lots with quality differences. Also, these tests just detected the lower quality seed lot from the others. Similar classification in vigor levels were obtained by the germination test at high temperature and seedling emergence. The incidence of fungi associated with seeds of lettuce can interfere negatively in seed vigor and seedling emergence, and seed health testing should be performed to verify seed sanitary conditions.

**Keywords** - *Lactuca sativa* L.; vigour test; seed quality.

## INTRODUÇÃO

A alface é uma importante olerícola folhosa consumida em várias partes do mundo (SALA et al., 2008). No Brasil é a hortaliça folhosa com maior área cultivada e mais consumida pela população (PURQUEIRO, 2005; OHSE et al., 2009).

A germinação de sementes de alface é influenciada por vários fatores, como temperatura, água, oxigênio, luz, microrganismos, tipo de solo e profundidade de semeadura, entre outros. A qualidade fisiológica das sementes é o primeiro atributo a ser considerado para a obtenção de uma adequada emergência (NASCIMENTO, 2002).

A avaliação da qualidade fisiológica de sementes para fins de semeadura e comercialização tem sido rotineiramente baseada no teste de germinação, que fornece resultados referentes às plântulas normais produzidas por um lote de sementes, de acordo com as Regras para Análise de Sementes

- RAS (BRASIL, 2009). No entanto, o conhecimento do vigor das sementes poderá indicar com maior precisão seu potencial de desempenho no campo. Estudos sobre vigor de sementes de alface têm indicado testes como o de envelhecimento acelerado em conjunto com a primeira contagem do teste de germinação e/ou comprimento da raiz primária, como parâmetros para a melhor escolha dos lotes de sementes (FRANZIN et al., 2004; PEREIRA e NASCIMENTO, 2007).

Além da qualidade fisiológica, a obtenção de sementes de alta qualidade sanitária é muito importante, visto que patógenos transmitidos ou não por sementes, também podem afetar o vigor no campo e causar danos às plantas hospedeiras, tendo efeito ainda mais pronunciado no caso de organismos que colonizam os tecidos internos das sementes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

O teste de sanidade de sementes pode determinar a condição sanitária de um lote de sementes, fornecendo informações para programas de certificação, serviços de vigilância vegetal, melhoramento de plantas, tratamento de sementes e controle interno de qualidade (HENNING, 1994; MACHADO, 2000).

A cultura da alface é produzida e consumida em volumes significativos no país, e as sementes apresentam grande valor comercial, o que reforça a importância da avaliação do potencial fisiológico e sanitário. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência de diferentes testes de vigor para determinação da qualidade fisiológica e associar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de alface.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes e em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizados quatro lotes de sementes de alface, cultivar crespa grand rapids. As sementes foram submetidas aos testes e determinações descritas a seguir:

**Determinação do teor de água:** Foi realizada em estufa com circulação de ar forçado a  $105 \pm 3$  °C, por 24 h, de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009), utilizando-se duas amostras de 4 g de

sementes para cada lote. Os resultados foram expressos em porcentagem média por lote. O teor de água da semente foi determinado antes e após a condução do teste de envelhecimento acelerado.

**Teste de germinação:** Foi conduzido a 20°C, com 200 sementes por lote (quatro subamostras de 50 sementes). As sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel, e colocadas no interior de caixas plásticas transparentes (11,5x11,5x3,5 cm) com tampa. As avaliações foram realizadas aos quatro e aos sete dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

**Primeira contagem da germinação:** Foi efetuada em conjunto ao teste de germinação, computando-se a porcentagem de plântulas normais obtidas no quarto dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

**Condutividade elétrica:** Foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, sendo as sementes colocadas em copos plásticos de 200 mL, aos quais foram adicionados 50 mL de água deionizada. As leituras foram realizadas as 2, 4, 6, 8 e 24 horas. O valor de condutividade elétrica da solução, fornecido pelo aparelho, foi expresso em  $\text{mS cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ .

**Envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl:** As amostras foram distribuídas sobre bandeja de tela de alumínio fixada no interior de caixa plástica (gerbox), contendo 40 mL de água, mantida a 41 °C, por 48 horas. Essa solução foi obtida pela adição de 40g de NaCl em 100 ml de água, estabelecendo, um ambiente com umidade relativa do ar de 76%, conforme procedimento proposto por Jianhua e McDonald (1997). Após este período, as sementes foram colocadas para germinar seguindo a metodologia utilizada no teste de germinação (Brasil, 2009). A avaliação das plântulas foi realizada no quarto dia após a semeadura, considerando-se a porcentagem de plântulas normais conforme o descrito por Ramos et al. (2004) e Goulart e Tillmann (2007).

**Emergência de plântulas em substrato:** Foi avaliada com quatro subamostras de 50 sementes por lote, distribuídas em bandejas de poliestireno expandido (isopor) com 200 células preenchidas com substrato comercial Plantmax®. As avaliações foram realizadas aos 12 dias após a semeadura,

computando-se as plântulas normais e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais emergidas.

**Teste de sanidade:** utilizou-se a metodologia do papel filtro. Foram utilizadas doze repetições de 25 sementes, colocadas em caixas plásticas do tipo "gerbox" contendo três folhas de papel filtro umedecidos com PEG 6000. As sementes foram incubadas à temperatura de 25 °C por sete dias, sob fotoperíodo de 12 horas de regime de luz e 12 horas de escuro. Após o período de incubação, as sementes foram examinadas individualmente sob microscópio estereoscópico, computando-se a percentagem de incidência fúngica.

**Teste de germinação em alta temperatura** - foram utilizadas 200 sementes (4 subamostras de 50 sementes) distribuídas sobre papel germitest umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco, em caixas gerbox. Os gerbox mantidos em BOD a 30 °C sendo a avaliação realizada 7 após a instalação do teste.

O teste de condutividade foi analisado em esquema fatorial 4 lotes x 5 períodos de embebição das sementes. O delineamento experimental utilizado para todos os testes foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. A comparação das médias obtidas nos testes foi através do teste Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grau de umidade dos lotes de sementes de alface não apresentou variação acentuada entre os lotes, o que é importante para obtenção de resultados comparáveis (Tabela 1). Recomenda-se que não haja diferença superior a dois pontos percentuais de teor de água das sementes antes do envelhecimento acelerado (MARCOS FILHO, 1999).

A germinação das sementes de todos os lotes foi maior que o padrão estabelecido para comercialização (80%) na temperatura de 20 °C. Os testes de germinação e primeira contagem de germinação constataram similaridades entre os lotes 1, 2 e 3 e esses dois testes só identificaram diferenças entre os lotes 3 e 4. O teste de germinação apesar de ser padronizado e mostrar repetibilidade, em geral, não indica o comportamento da emergência das

plântulas em campo porque fornece resultados para condições ideais, o que pode muitas vezes superestimar a emergência (FRANCO e PETRINI, 2002).

O resultado do teste de germinação mostrou alta qualidade de todos os lotes (entre 93 e 99%), e mesmo submetidos ao envelhecimento artificial manteve o nível de qualidade não inferior a 90%, apresentando uma redução com o estresse artificial de no máximo seis pontos percentuais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Grau de umidade inicial dos lotes (GUI), grau de umidade após o envelhecimento acelerado (GUF), e porcentagens médias obtidas para o teste de germinação (TG), primeira contagem de germinação (PCG), envelhecimento acelerado com solução de NaCl-76% (EA) por 48 h, teste de germinação em alta temperatura (TGA), emergência de plântulas (EP), dos diferentes lotes de qualidade de sementes de alface.

Lotes	GUI	GUF	TG	PCG	EA	TGA	EP
-----%-----							
1	5,4	10,6	96 ab	92 ab	92 ab	81 a	88 a
2	6,0	10,8	96 ab	92 ab	95 a	86 a	93 a
3	5,9	9,7	99 a	97 a	93 a	77 b	78 b
4	5,7	9,6	93 b	91 b	90 b	77 b	76 b
CV(%)	-	-	3.88	5.42	3.69	8.99	9.91

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Os resultados obtidos no teste de envelhecimento acelerado a 41 °C por 48 h (Tabela 1) mostraram que este teste foi eficiente para separar os lotes em dois níveis de vigor. Nota-se que os quatro lotes exibiram sensibilidade semelhante às condições de estresse do teste. Os testes de envelhecimento acelerado e de emergência de plântulas classificaram os lotes 1 e 2 de maneira similar, sendo as sementes desses dois lotes são as de maior de vigor. Entretanto, em relação aos lotes 3 e 4 houve uma discordância entre os resultados obtidos nesses testes. A discordância entre testes de vigor sugere, justamente, a necessidade de maior número possível de testes antes de classificar os lotes quanto ao potencial fisiológico, porque cada teste está baseado em um princípio diferente e fornece informações complementares ao teste de germinação para serem usadas na decisão do destino final de cada lote de sementes (SILVA et al., 2008). Empregando o teste de envelhecimento acelerado com uso de solução saturada de NaCl, a 41°C por 48 e 72 horas, Kikuti e Marcos Filho (2012) verificaram sua eficiência na avaliação do vigor de lotes de sementes de alface.

O teste de germinação em alta temperatura apresentou sensibilidade na identificação de lotes com diferenças de vigor, ao identificar os lotes de maneira similar à emergência de plântulas, e somente os lotes 1 e 2 mantiveram germinação acima de 80%.

O teste de emergência de plântulas realizados em ambiente de casa de vegetação classificou os lotes 1 e 2 como de qualidade superior aos lotes 3 e 4 que mostraram desempenho inferior. Lotes de sementes com porcentagens de germinação semelhantes, mas com diferenças quanto ao vigor, podem apresentar comportamentos diferenciados em relação à deterioração, dependendo das condições do ambiente (PÁDUA e VIEIRA, 2001). Estudos realizados por Franzin et al. (2004) e Villela et al. (2010) indicaram que a emergência de plântulas pode ser usada na avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface.

No teste de condutividade elétrica, foi observada interação significativa em relação ao período de embebição e lotes (Tabela 2). Notou-se, que as diferenças foram mais acentuadas com o decorrer do processo do embebição, dentro do mesmo lote. O teste forneceu informações menos detalhadas sobre a qualidade fisiológica dos lotes, destacando apenas a superioridade dos lotes 1, 2 e 3 em relação ao lote 4.

**Tabela 2.** Resultados do teste de condutividade elétrica ( $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ semente) com embebição de 50 sementes em 50 mL de água destilada, por períodos de 2, 4, 6, 8 e 24 horas de quatro lotes de sementes de alface.

Lotes	Períodos de embebição (h)				
	2	4	6	8	24
1	6,23 aA	7,16 abA	7,86 bA	8,40 bA	9,73 cA
2	5,80 aA	7,09 bA	7,94 bcA	8,53 cA	10,04 dA
3	5,71 aA	7,11 bA	7,79 bA	8,34 bA	10,47 cA
4	8,57 aB	10,54 bB	11,64 bcB	12,71 cB	14,86 dB
CV (%)	14,0				

Médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para a utilização do teste de condutividade elétrica em programas de controle de qualidade há necessidade de estudos adicionais, buscando adequar a metodologia para as sementes dessa espécie. O uso do teste de condutividade elétrica na separação de lotes, também não forneceu

informações detalhadas nos estudos com sementes de ervilha (CALIARI e MARCOS FILHO, 1990) e de alface (FRANZIN et al., 2004).

Na sanidade das sementes dos diferentes lotes de alface verifica-se incidência de espécies fúngicas variando de 0 a 76% (Tabela 3). Foram observados sete gêneros de fungos nos quatro lotes: *Aspergillus* spp., *Ryzopus* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. e *Cladosporium* spp.

O lote 3 também apresentou alta incidência de fungos nas sementes, *Ryzopus* spp.(32%), *Trichoderma* spp. (30%) e *Penicillium* spp. (28%). Este fato pode explicar a baixa emergência do lote em substrato (78%), evidenciando que a alta incidência de fungos pode ser um dos fatores que limitou o desempenho do lote. As sementes do lote 4 apresentaram alta incidência de fungos dos gêneros *Aspergillus* spp. (76%) e *Penicillium* spp. (30%) (Tabela 3). Os gêneros *Aspergillus* spp.. e *Penicillium* spp. são os principais fungos de armazenamento detectados, podendo prejudicar a qualidade das sementes, decorrente da deterioração (FREITAS et al., 2000).

**Tabela 3.** Incidência de fungos (%) obtida no teste de sanidade de quatro lotes de sementes de alface.

Lotes	Incidência de fungos (%)					
	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Ryzopus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Thrichoderma</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.
Lote 1	10 b	10 b	16 c	2 a	10 b	6 ab
Lote 2	10 b	0 a	9 b	0 a	3 a	11 b
Lote 3	2 a	32 c	1 a	30 b	28 c	3 ab
Lote 4	76 c	0 a	7 b	0 a	30 c	0 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de probabilidade de 5%, pelo teste de Tukey.

Observou-se menor incidência de fungos nas sementes do lote 2 que apresentou os maiores valores de germinação e também de emergência de plântulas. Desta forma, constata-se que a qualidade sanitária das sementes também pode influenciar na emergência de plântulas, sendo que se recomenda a condução de testes de sanidade para verificar a qualidade de um lote. Vale destacar a detecção de *Fusarium* spp. nos quatro lotes, com maior incidência nos lotes 1 e 2, patógeno transmitido por sementes e que pode causar doença importante no desenvolvimento da cultura de alface. Uma medida recomendável seria o tratamento químico das sementes, para o controle dos fungos de armazenamento (*Aspergillus* spp e *Penicillium* spp.) que ocorreram

em alta incidência e o fungo de campo (*Fusarium spp.*) pelo potencial de inóculo em áreas de cultivo.

## CONCLUSÃO

O teste de germinação em alta temperatura permite classificar os lotes de alface em níveis de vigor de maneira similar à emergência de plântulas.

Os testes de germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado e condutividade elétrica mostram baixa eficiência para discriminar lotes com diferenças de vigor, pois apenas indicaram o lote de menor qualidade fisiológica.

A incidência de fungos em sementes de alface afeta negativamente a expressão do vigor das sementes e a emergência de plântulas e o teste de sanidade de sementes deve ser realizado para avaliar qualidade sanitária das sementes de alface.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção, 4. Ed. Jaboticabal: Funep, 2000.588p.

FRANZIN, S.M.; MENEZES, N.L. de; GARCIA, D.C.; WRASSE, C.F. Métodos para avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.2, p.63-69, 2004.

FRANCO, D.F.; PETRINI, J.A. Teste de vigor em sementes de arroz. **Brasília**. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2008 (comunicado técnico, 68).

FREITAS, R.A.de; DIAS, D.C.F. dos S.; CECON, P. R.; REIS, M.S. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 94-101, 2000.

GOULART, L.S.; TILLMANN, M.A.A. Vigor de sementes de rúcula (*Eruca sativa* L.) pelo teste de deterioração controlada. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.2, p.179-186, 2007.

HENNING, A.A. Patologia de Sementes. Londrina: EMBRAPA - CNPSO/ Documento 90, 1994.

HILDEBRAND, M., DICKLER, E., GEIDER, K. Occurrence of *Erwinia amylovora* on insects in fire blight orchard. **J Phytopathology** 148: 251-256, 2000.

JIANHUA, Z.; McDONALD, M.B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, v.25, n.1, p.123-131, 1997.

KIKUTI, A. L. P; MARCOS FILHO, J. Testes de vigor em sementes de alface. **Horticultura Brasileira**. vol.30, n.1, pp. 44-50. 2012.

MACHADO, J.C. Tratamento de sementes no controle de doenças. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MARCOS FILHO, J. TESTE DE ENVELHECIMENTO ACELERADO. IN: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (ED.). Vigor de Sementes, Conceitos E Testes. LONDRINA: ABRATES, 1999.

NASCIMENTO, W.M.; PEREIRA, R.S. Testes para avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p.175-179, 2007.

NASCIMENTO, W.M. **Germinação de sementes de alface**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2002. 10p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 29).

OHSE, S.; RAMOS, D. M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R.; OLIVEIRA, J. L. B. Composição centesimal e teor de nitrato em cinco cultivares de alface

produzidas sob cultivo hidropônico. *Bragantia*, Campinas, v. 68, n. 2, p. 407-414, 2009.

PÁDUA, G.P.; VIEIRA, R.D. Deterioração de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, p.255-262, 2001.

PEREIRA R.S; NASCIMENTO W.M; VIEIRA J.V. Germinação e vigor de sementes de cenoura sob condições de altas temperaturas. **Horticultura Brasileira** v.25, p. 215-219, 2007.

PURQUERIO, L.F.V. **Crescimento, produção e qualidade de rúcula (*Eruca sativa* Miller) em função do nitrogênio e da densidade de plantio.** 2005. 138f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

SALA, F.C.; COSTA, C.P.; TEIXEIRA, L.D.; FABRI, E.G.; BLAT, S.F. Reação de cultivares de alface a *Thielaviopsis basicola*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, 2008.

SILVA, J. R. da.; TORRES, S.B.; MEDEIROS, M.A.A.; OLIVEIRA, I.R.S. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de maxixe. **Revista Caatinga**, v.21, n.4, p 68-71, 2008.

VILLELA, R.P.; SOUZA, R. J. de.; GUIMARÃES, R.M.; NASCIMENTO, W. M.; GOMES, L.A.A.; CARVALHO, B.O.; BUENO, A.C.R. Produção e desempenho de sementes de cultivares de alface em duas épocas de plantio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n.1. p.158-169, 2010.

ZANDJANAKOU-TACHIN, M., FANOU, A., LE GALLP, WYDRA, K. Detection, survival and transmission of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, causal agents of cassava and cowpea bacterial blight, respectively, in/by insect vectors. **Journal of Phytopathology** 155,p.159 -169, 2007.

## CAPÍTULO II

### POTENCIAL FISIOLÓGICO E FITOSSANITÁRIO DE SEMENTES DE RÚCULA\*

#### RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a eficiência de diferentes testes de vigor para a determinação do potencial fisiológico e sanitário de lotes de sementes de rúcula. O experimento foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes e na casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O ensaio foi constituído de quatro lotes da cultivar Antonella. Foram efetuados os seguintes testes: umidade inicial das sementes e após o envelhecimento acelerado, germinação, primeira contagem de germinação, condutividade elétrica, emergência de plântulas, índice de velocidade de emergência, comprimento da parte aérea e do sistema radicular, massa seca da parte aérea e do sistema radicular das plântulas, envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl e teste de sanidade. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com quatro repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 5\%$ ). Examinando os resultados obtidos em todos os testes analisados verificou-se que apesar das alterações na classificação dos lotes de maior qualidade houve concordância quanto à indicação da inferioridade do lote 3 quanto a qualidade fisiológica. A incidência dos fungos associados às sementes de rúcula interfere na qualidade fisiológica dos lotes.

**Palavras-chave:** *Eruca sativa* L., testes de vigor, sementes de hortaliças.

---

\*Artigo Submetido à Revista Ciência Rural

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the efficiency of different vigor tests to determine the physiological potential and sanitary conditions of rocket seeds. The work was done at the Laboratory of Seed Analysis and greenhouse of the Department of Plant Science, Federal University of Pelotas (UFPel). Four lots of the cultivar "Antonella" were tested for following features: initial seed moisture and seed moisture after accelerated aging, germination rate, first count of germination, accelerated aging with saturated solution of NaCl, dry matter contents, seedling shoot and root length, seedling emergence rate, electrical conductivity, and sanitary condition. A completely randomized design with four replications was used for all tests done. Means were compared by Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). Evaluating the results of all tests done it was concluded that despite changes in the ranking of the best lots, there was agreement regarding the indication of the inferiority of the lot 3 in relation to its physiological quality. The incidence of fungi associated with seeds of rocket interferes with the physiological quality of the lots.

**Key words:** *Eruca sativa* L., vigor tests, vegetable seeds.

## INTRODUÇÃO

A rúcula (*Eruca sativa* L.) é uma hortaliça herbácea anual, possui porte baixo, normalmente com 15 a 20 cm de altura. É da família das Brassicaceae, sendo originária do Mediterrâneo e da Ásia Ocidental (FIGUEIRA, 2008). As sementes são muito pequenas (aproximadamente 650 sementes por grama). Trata-se de uma folhosa com crescente incremento de consumo nos últimos anos no Brasil (CAMARGO FILHO e MAZZEI, 2001).

A qualidade fisiológica das sementes utilizadas pelos produtores é um dos principais fatores a ser considerado para a implantação da cultura e há consenso entre os pesquisadores, tecnologistas e produtores de sementes sobre a importância do vigor das sementes e da necessidade de avaliá-lo. (HÖFS et al., 2004, KOLCHINSKI et al., 2006). A emergência rápida, uniforme e o estabelecimento do estande são essenciais para assegurar a formação de plantas bem desenvolvidas, contribuindo dessa forma para elevar o rendimento final da cultura e a qualidade do produto comercial (MARCOS FILHO e NOVEMBRE, 2009). Além do uso de sementes de alta qualidade fisiológica para a implantação da lavoura, a preocupação com a presença de patógenos associados às sementes é crucial. Sementes contaminadas são responsáveis

pela introdução de doenças nas fases iniciais da cultura, refletindo em redução de produtividade, aumento do custo de produção, além de permitir a introdução e manutenção de elevado nível de inoculo.

A presença de patógenos nas sementes, independentemente de sua transmissibilidade, pode afetar o vigor e o rendimento em campo (ZORATO e HENNING, 2001; LUZ, 2003). Para Lucca-Filho (1995) sementes com fungos associados podem ser responsáveis pela transmissão de doenças para parte aérea e sistema radicular da planta e decréscimo da qualidade fisiológica das sementes e morte de plântulas. Dessa forma, o teste de sanidade de sementes é importante para determinar a condição sanitária de um lote de sementes, fornecer informações para programas de certificação, serviços de vigilância vegetal, tratamento de sementes, melhoramento de plantas e outros (HENNING, 1994; MACHADO, 2000).

Neste contexto, sementes de alto vigor e livre de patógenos constituem-se em elementos básico e fundamental (MENDONÇA et al., 2003; MACHADO, 2000). O potencial fisiológico deve ser determinado avaliando-se a germinação e o vigor do lote de sementes. O vigor compreende várias características associadas ao desempenho do lote de sementes, podendo identificar manifestações do seu comportamento durante o armazenamento ou em campo (MARCOS FILHO, 2005).

Existem vários testes de vigor mencionados na literatura e que têm sido indicados para sementes de hortaliças, mas a disponibilidade de informações sobre a avaliação do vigor de sementes de rúcula é ainda bastante limitada. Na literatura, destacam-se o trabalho de Ramos et al (2004) sobre a eficiência do teste de envelhecimento acelerado, o de Goulart e Tillmann (2007) sobre o teste de deterioração controlada e o de Alves e Sá (2009) sobre o teste de condutividade elétrica. Steiner (2010) refere-se à germinação sob diferentes temperaturas.

No sentido de contribuir para aumentar as informações sobre a influência do vigor e sanidade de sementes dessa hortaliça, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de diferentes testes de vigor para a determinação do potencial fisiológico e sanitário de lotes de sementes de rúcula.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes e em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizadas sementes de quatro lotes de rúcula da cultivar ‘Antonella’. As sementes foram submetidas aos testes e determinações descritas a seguir:

**Determinação do grau de umidade:** realizada em estufa de circulação de ar forçado a  $105 \pm 3$  °C por 24 h, de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009), utilizando-se duas amostras de 4 g de semente para cada lote. Os resultados foram expressos em porcentagem média por lote. A umidade da semente foi realizada antes e após o envelhecimento acelerado.

**Teste de germinação:** Foi conduzido a 20 °C, com 200 sementes por lote (quatro subamostras de 50 sementes). As sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel, e colocadas no interior de caixas plásticas transparentes (11,5x11,5x3,5 cm) com tampa. As avaliações foram realizadas aos quatro e aos sete dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

**Primeira contagem da germinação:** Foi efetuada conjuntamente ao teste de germinação, computando-se a porcentagem de plântulas normais obtidas no quarto dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

**Condutividade elétrica:** Foi realizada com quatro repetições de 50 sementes, sendo as sementes colocados em copos plásticos de 200 mL, aos quais foram adicionados 50 mL de água deionizada. As leituras foram realizadas as 2, 4, 6, 8 e 24 horas. O valor de condutividade fornecido pelo aparelho foi expresso em  $\text{mS cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ .

**Envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl:** Foram utilizadas 50 sementes por repetição distribuídas sobre bandeja de tela de alumínio fixada no interior de caixa plástica (gerbox), contendo 40 mL de água, mantida a 41 °C por 48 horas. Essa solução foi obtida pela proporção 40g de NaCl/ 100 ml de água, estabelecendo, um ambiente com umidade relativa do ar de 76%, conforme procedimento proposto por Jianhua e McDonald (1997).

Após este período, as sementes foram colocadas para germinar seguindo a metodologia utilizada no teste de germinação (BRASIL, 2009). A avaliação das plântulas, realizada no quarto dia após a semeadura, considerando-se a porcentagem de plântulas normais conforme o descrito por Ramos et al. (2004) e Goulart e Tillmann (2007).

**Massa seca de plântulas:** Foram avaliadas as plântulas obtidas no teste de emergência. As repetições de cada lote foram acondicionadas em sacos de papel, identificados, e levados à estufa com circulação de ar forçada, mantida à temperatura de 80 °C por 24 horas.

**Comprimento de plântulas:** Foram utilizadas 4 repetições de 20 sementes. Uma linha foi traçada no terço superior do papel de germinação no sentido longitudinal. Os papéis foram umedecidos previamente com água destilada equivalente a 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e colocados no germinador por sete dias a 20 °C. Foi efetuada a medida da parte aérea e raiz das plântulas normais emergidas utilizando-se uma régua. Os resultados foram expressos em centímetros.

**Índice de velocidade de emergência (IVE):** Foi avaliado diariamente até a estabilização da emergência. Ao final do teste foi calculado o IVE, empregando-se a fórmula proposta por Maguire (1962).

**Emergência de plântulas**– Foi avaliada em quatro subamostras de 50 sementes por lote, distribuídas em bandejas de poliestireno expandido (isopor) com 200 células preenchidas com substrato comercial Plantmax®, em casa de vegetação. As avaliações foram realizadas aos 12 dias após a semeadura, computando-se as plântulas normais e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais emergidas.

**Teste de sanidade:** utilizou-se a metodologia do papel filtro ou “Blotter test”. Foram utilizadas doze repetições de 25 sementes, colocadas em caixas plásticas do tipo “gerbox” contendo três folhas de papel filtro umedecidos com PEG 6000. As sementes foram incubadas à temperatura de 25 °C por sete dias, sob fotoperíodo de 12 horas de regime de luz e 12 horas de escuro. Após o período de incubação as sementes foram examinadas individualmente com auxílio de um microscópio estereoscópico, computando-se a percentagem de

incidência, sendo realizada a identificação dos patógenos com base em suas características morfológicas (BARNETT e HUNTER, 1972).

dos lotes foi efetuada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Em todos os testes foram utilizados quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado, sendo as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ). A condutividade elétrica foi em esquema fatorial 4 lotes x 5 períodos de embebição.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de água iniciais das sementes foram semelhantes para os quatro lotes (Tabela 1), situando-se entre 5,5 e 7,5%, ou seja, com variação máxima de dois pontos porcentuais, que é o máximo aceito para garantir a credibilidade dos resultados obtidos nos testes de vigor (MARCOS FILHO, 1999). Quando se analisa a qualidade inicial dos lotes utilizados no presente trabalho, verifica-se que eles apresentaram alta germinação variando entre 86 e 93%, sendo assim, superior à mínima estabelecida para comercialização que é de 75%. Entretanto, em muitos casos os resultados elevados no teste de germinação não significam necessariamente que todos os lotes possuem alto vigor, já que o teste de germinação é conduzido em condições favoráveis (MARCOS FILHO, 1999a).

**Tabela 1.** Grau de umidade inicial dos lotes (GUI), grau de umidade após o envelhecimento acelerado (GUF), e porcentagens médias obtidas para o teste de germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), envelhecimento acelerado tradicional-  $H_2O$  (EA), Massa seca das plântulas (MS), comprimento de raiz (CR), comprimento de parte aérea (CPA), índice de velocidade de emergência (IVE), emergência de plântulas (EP), dos diferentes lotes de qualidade de sementes de rúcula.

Lotes	Qualidade fisiológica									
	GUI	GUF	G(%)	PCG(%)	EA(%)	MS	CR(cm)	CPA(cm)	IVE	EP (%)
1	5.5	14.4	93 a	88 a	81 a	0.020 a	4.2 a	2.6 a	13.1 a	95 a
2	5.5	12.7	92 a	91 a	80 a	0.020 a	4.1 a	2.5 a	13.3 a	96 a
3	7.5	17.9	86 b	81 b	45 c	0.014 b	1.7 c	1.6 b	10.6 c	88 b
4	5.5	16.5	88 ab	80 b	61 b	0.019 a	3.0 b	2.7 a	12.2 b	92 ab
CV(%)	-	-	6.7	9.0	12.01	11.79	14.75	19.1	6.7	5.5

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Verifica-se que o teste de germinação estratificou os lotes em diferentes níveis de vigor, destacando o lote 3 como de qualidade fisiológica inferior, diferindo estatisticamente dos lotes 1 e 2, mas sendo igual ao lote 4. O teste de germinação para outras espécies de hortaliças, também conseguiu ranquear lotes de sementes de abobrinha (*Cucurbita pepo*) e abobrinha cv. Piramoita, respectivamente (BARROS et al., 2002; CARDOSO, 2003). Esses autores detectaram diferentes níveis de qualidade fisiológica nos lotes avaliados, comprovando que o teste de germinação é um bom indicador de qualidade fisiológica para sementes dessa espécie. Em sementes de pepino (*Cucumis sativus L.*) Bhering et al. (2000) concluíram que apesar do teste de germinação mostrar-se um bom indicativo de qualidade fisiológica das sementes, ele não garante uma alta emergência em campo de lotes com maior germinação.

O teste de primeira contagem de germinação foi eficiente para estratificar lotes em diferentes potenciais fisiológicos, classificando-os em maiores (1 e 2) e menores (3 e 4) (Tabela 1). Resultado semelhante foi obtido por Cardoso (2003) em sementes de abobrinha, onde se verificou apenas a estratificação do lotes de maiores e dos lotes de menores potenciais fisiológicos. Em outras espécies de hortaliças, o teste de primeira contagem de germinação já está sendo utilizado rotineiramente para obter informações preliminares sobre o potencial fisiológico de lotes de sementes de pepino (BHERING et al., 2000) e alface (FRANZIN et al., 2004).

O teste de envelhecimento acelerado confirmou o lote 3 como o de pior qualidade e permitiu destacar os lotes 1 e 2 como os de melhor vigor, não diferindo estatisticamente entre si. O lote 4 mostrou-se intermediário. (Tabela 1). Estes resultados corroboram aos observados por Bhering et al.(2000) e Barros et al. (2002a), que também verificaram a eficiência do período de 48 horas de exposição a 41 °C, para estratificação dos lotes de sementes de pepino e abobrinha, respectivamente. Além disso, outro trabalho desenvolvido com sementes de rúcula considerou que o teste de envelhecimento acelerado mostrou-se eficiente para sementes de rúcula, pois possibilitou detectar diferenças entre os níveis dos lotes (GOULART e TILLMANN, 2007). A capacidade do teste de envelhecimento acelerado para avaliar o vigor de sementes também foi observada em sementes de brócolis (MENDONÇA et al., 2000), melão (TORRES, 2002) e melancia (BHERING et al., 2003).

Acredita-se que, as condições de envelhecimento com o uso de solução de sal promovem efeitos menos drásticos, pois ao atingir menores teores de água, o grau de deterioração das sementes é atenuado em relação ao normalmente verificado com o uso do método tradicional. No presente trabalho, analisando-se os valores médios do teor de água dos lotes após o envelhecimento acelerado, observa-se que, as sementes dos lotes 1 e 2 apresentaram os menores teores de água. Por sua vez, os maiores valores ocorreram nas sementes do lote 3 e 4. Este alto teor de água pode ter influenciado na germinação após o teste do envelhecimento, visto que sementes com teor de água reduzido obtiveram maiores percentuais de germinação.

Com os dados de massa seca das plântulas oriundas da emergência final das plântulas foi possível separar os lotes em níveis de vigor, sendo que os lotes 1, 2 e 4 apresentaram os maiores valores. Pode-se verificar que as plântulas do lote 3 apresentaram os menores conteúdos de massa seca da parte aérea e raiz. Nesse teste, o princípio é que as amostras que apresentam maiores pesos médios de matéria seca de plântulas normais são consideradas mais vigorosas. As sementes vigorosas proporcionam maior transferência de massa seca de seus tecidos de reserva para o eixo embrionário, na fase de germinação, originando plântulas com maior peso, em função do maior acúmulo de matéria (NAKAGAWA, 1999).

No teste de comprimento de raiz, os lotes 1 e 2 apresentaram as maiores médias, diferindo estatisticamente das demais. Já para o comprimento de parte aérea ranqueou os lotes da mesma maneira do teste de massa seca das plântulas, ou seja, as plântulas provenientes de sementes lotes 1, 2 e 4 apresentaram maiores tamanhos diferindo estatisticamente do lote 3 (Tabela 1). Nos dois testes o lote 3 manteve-se como de baixa qualidade fisiológica. Para Nakagawa (1999) as diferenças entre comprimento de plântulas são, na maioria das vezes, bastante visíveis, todavia há necessidade de valores numéricos para separar aquelas mais vigorosas. Para isso, a determinação do comprimento médio das plântulas normais ou partes destas é realizada, tendo em vista que as amostras que apresentam os maiores valores médios são as mais vigorosas. Balbinot e Lopes (2006), com sementes de cenoura, Bittencourt et al (2004), com sementes de espargos e Mendonça et al. (2003),

com sementes de brócolis, são exemplos de autores que avaliaram o vigor pelo comprimento de plântulas.

O índice de velocidade de emergência (IVE) também mostrou sensibilidade para estratificar lotes em diferentes potenciais fisiológicos, pois houve diferença significativa entre as médias avaliadas (Tabela 1). É importante ressaltar que lotes de sementes com maior potencial fisiológico, principalmente pelo maior índice de velocidade de emergência, são importantes para a obtenção de plântulas permaneçam um menor tempo submetidas às condições adversas, como a presença de fungos que promovem tombamento e também pela obtenção de mudas mais precoces e uniformes (CASAROLI, 2005).

Os resultados obtidos no teste de germinação em laboratório estão exatamente de acordo com os obtidos para a emergência das plântulas em substrato em casa de vegetação. Assim, as diferenças na qualidade dos lotes detectadas nos lotes 1 e 2 e 4, foram confirmadas nos dois testes, as quais exibem as melhores condições fisiológica, obtendo os maiores percentuais de plântulas emergidas e o lote 3 os menores resultados. Essa correspondência entre o teste de germinação em laboratório e a emergência das plântulas em termos de classificação dos lotes quanto ao vigor pode ter ocorrido devido à emergência em casa de vegetação ter sido realizado em substrato inerte e em condições ideais de umidade e temperatura. Tal fato contribuiu para que se obtivesse temperatura e umidade necessárias e suficientes para uma boa germinação das sementes.

Foi observada interação significativa entre os lotes e período de embebição das sementes. O teste de condutividade elétrica também permitiu diferenciar níveis de qualidade entre os lotes de sementes de rúcula. Em todos os períodos de embebição, o teste possibilitou identificar o lote 3 como menos vigoroso em relação aos demais lotes analisados (Tabela 2). Em outros trabalhos com sementes de alface (GUIMARÃES et al., 1993), cenoura (ANDRADE et al., 1995), tomate (RODO et al., 1998; SÁ, 1999), cebola (RODO, 2002) e rúcula (ALVES e SÁ, 2009), os resultados promissores foram encontrados em avaliações feitas após quatro horas de embebição. No presente trabalho, todos os períodos de embebição para a classificação dos lotes em níveis de qualidade foram eficientes.

**Tabela 2.** Resultados do teste de condutividade elétrica com embebição de 50 sementes em 50 mL de água destilada, por períodos de 2, 4, 6, 8 e 24 horas de quatro lotes de sementes de rúcula.

Lotes	Períodos de embebição ( $\mu\text{S.cm}^{-1}\text{g}^{-1}\text{semente}$ )				
	2	4	6	8	24
1	5,71 aA	8,20 aB	9,74 aC	10,76 aC	17,95 aD
2	8,00 abA	9,06 aB	11,83 bC	12,86 bC	19,64 bD
3	8,99 cA	11,85 bB	14,44 cB	16,00 cC	25,33 cD
4	7,14 bA	9,01 aB	10,82 abB	11,9 abC	18,94 abD
CV	10.8				

Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os valores de condutividade ao longo dos diferentes períodos, destacaram o lote 1 como sendo o de melhor qualidade com o sistema de membranas celulares mais íntegro ou com maior capacidade de restabelecer sua integridade, durante a embebição, menor lixiviação de eletrólitos, indicando maior vigor, como sugerem os estudos em outras culturas (VIEIRA e KRZYZANOWSKI, 1999; VIEIRA et al., 2002; DIAS et al., 2006), confirmando os resultados observados em outros testes.

Examinando os resultados obtidos em todos os testes analisados verificou-se que apesar das alterações na classificação dos melhores lotes houve concordância quanto à indicação da inferioridade do lote 3 em todas as avaliações.

Foi observada maior incidência dos fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. para todos os lotes avaliados. Porém, a incidência variou entre os diferentes lotes (Tabela 3). O lote 3 apresentou maior incidência de fungos nas sementes. Este fato pode explicar a baixa viabilidade e vigor verificado no lote 3, evidenciando que a alta incidência de fungos foi limitante ao desempenho deste

Observou-se neste trabalho, que os lotes com menor incidência de fungos foram, de forma geral, os que tiveram maiores valores de germinação e também vigor. Desta forma, a qualidade sanitária das sementes também pode influenciar no vigor e na emergência de plântulas, sendo que testes de sanidade devem ser realizados para verificar a qualidade de um lote produzido.

**Tabela 3.** Porcentagem de fungos obtidos no teste de sanidade dos quatro lotes de sementes de rúcula.

Fungos	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
<i>Arpegillus</i> sp.	4	18	21	20
<i>Penicillium</i> sp.	1	12	8	6
<i>Fusarium</i> sp.	3	17	38	7
<i>Ryzopus</i> sp.	2	7	9	4
<i>Curvularia</i> sp	0	1	1	0
<i>Cladosporium</i> sp.	0	1	3	0
<i>Nigrospora</i> sp.	0	0	1	0
<i>Alternaria</i> sp	1	1	10	0
<i>Bipolaris</i> sp	0	0	1	0
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	2	0
<i>Chaetomium</i> sp.	0	0	0	1

## CONCLUSÃO

Todos os testes de vigor utilizados nesse trabalho foram efetivos na separação dos lotes em nível de vigor, entretanto, destacam-se os testes de envelhecimento acelerado, comprimento de raiz, índice de velocidade de emergência por apresentarem resultados similares à emergência de plântulas.

Os testes de vigor permitiram destacar o lote 3 como de menor qualidade fisiológica.

A incidência de fungos associados às sementes de rúcula interfere negativamente na expressão da qualidade fisiológica das sementes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C.Z.; SÁ, M.E. Teste de condutividade elétrica na avaliação do vigor de sementes de rúcula. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.203-215, 2009.

ANDRADE, R.N.; SANTOS, D.S.B.; SANTOS FILHO, B.G.; MELLO, V.D.C. Correlação entre testes de vigor em sementes de cenoura armazenadas por diferentes períodos. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.1, n.2, p.153-162, 1995.

BALBINOT, E.; LOPES, M. H. Effects of osmoconditioning and drying on carrot seed germination and vigor. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, vol. 28, nº 1, p.01-08, 2006.

BHERING, M.C. Avaliação do vigor de sementes de melancia (*C. lanatus*) pelo teste de envelhecimento acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v.25, n.2, p.1-6, 2003.

BARROS, D. I. et al. Evaluation of seed vigor of zucchini (***Cucurbita pepo***) by tetrazolium test. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.1-5, 2002. Supplement 2. 1 CD.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 365p.

CAMARGO FILHO, W. P.; MAZZEI, A. R. Vegetable market planning, strategy and marketing. **Economic Information** . , São Paulo, v. 31, n. 3, p. 45-54, 2001.

CASAROLI, D. **Avaliação da qualidade sanitária e fisiológica de sementes de abóbora, variedade menina Brasileira**. 2005. 106f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Curso de pós-graduação em Produção vegetal, Universidade Federal de Santa Maria.

CARDOSO, A. I. I. Production and quality of squash seeds "Piramoita" in response to pollen amount. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.1, p.47-52, 2003.

DIAS, D.C.F.S.; BHERING, M.C.; TOKUHISA, D.; HILST, P.C. Teste de condutividade elétrica para a avaliação do vigor de sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n.1, p.154-162, 2006.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura:** agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2008. 3.ed.

FRANZIN, S. M.; MENEZES, N. L.; GARCIA, D.C.; WRASSE, C. F. Métodos para avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26,n.2,p.63-69,2004.

HENNING, A.A. Patologia de Sementes. Londrina: EMBRAPA - CNPSO/ Documento 90, 1994. 43p.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação de plântulas.. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; HÖFS, A.; SCHUCH, L. O. B.; PESKE, S. T.; BARROS, A. C. S. A. Emergência e crescimento de plântulas de arroz em resposta à qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.92-97, 2004.

GOULART, L.S.; TILLMANN, M.A.A. Seed vigor of rocket seeds (*Eruca sativa* L.) by controlled deterioration test. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.2, p.179-186, 2007.

KOLCHINSKI, E. M.; SCHUCH, L. O. B.; PESKE, S. T. Early growth of soybean plants in relation to seeds vigor. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, p. 163-166, 2006.

LUCCA-FILHO, O.A. **Curso de tecnologia de sementes**. Brasília: ABEAS, 1995. 53p.

LUZ, W.C. da. Combinação dos tratamentos biológico e químico de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira** 28:37-40. 2003.

MACHADO, J. da C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MAGUIRE. J.D. Spead of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**. Madison, v.2, n.1,p.176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, 1999. Cap. 1, p. 1-21.

MARCOS FILHO, J. Vigor tests: importance and use. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARCOS FILHO, J.; NOVEMBRE, A.D.L.C. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de hortaliças. In: NASCIMENTO, W. M. (Ed.). *Tecnologia de sementes de hortaliças*. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, p. 185-246, 2009.

MENDONÇA, E.A.F.; RAMOS, N.P.; FESSEL, S.A.; SADER, R. Teste de deterioração controlada em sementes de brócoli (*Brassica oleraceae L.*) var. *italica*. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.22, n.1, p.280-287, 2000.

MENDONÇA, E.A.F.; RAMOS, N.P.; FESSEL, S.A. Adequação da metodologia do teste de deterioração controlada em sementes de brócolis (*Brassica oleracea L.* – var. *italica*). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.25, n.1, p. 18-24, 2003.

JIANHUA, Z.; McDONALD, M.B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, v.25, n.1, p.123-131, 1997.

RAMOS, N.P.; FLOR, E.P.; MENDONÇA, E.A. F.; MINAMI, K. Envelhecimento acelerado em sementes de rúcula (*Eruca sativa L.*). **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.98-103, 2004.

STEINER, F., PINTO JUNIOR, A.S.; DRANSKI, J.A.L.; ZOZ, T.; RHEINHEIMER, A.R. Seeds germination of salad rocket under different temperatures. **Scientia Agraria**, v.11,n.2,p.119124,2010.

VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, E.C. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R.D.; KRZYZANOWSKI, E.C.; FRANÇA NETO, J.B. Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. p.1, 4, 26.

VIEIRA, R.D.; PENARIOL, A.L.; PERECIN, D.; PANOBIANO, M. Condutividade elétrica e o teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.19, p.1333-1338, 2002.

VILLELA, F.A., DONI FILHO, L., SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 11-12, p. 1957-1968, 1991.

ZORATO, M.F.; HENNING, A.A. Influência de tratamentos com fungicidas antecipados, aplicados em diferentes épocas de armazenamento, sobre a qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, p.236-244. 2001.

## CAPÍTULO III

### POTENCIAL FISIOLÓGICO E FITOSSANITÁRIO DE SEMENTES DE COUVE MANTEIGA\*

#### RESUMO

A necessidade do conhecimento da qualidade fisiológica e sanitária das sementes, antes da semeadura, é imprescindível, e para isso, é importante conhecer a eficiência de diferentes testes que avaliam esses atributos e possam complementar as informações do teste de germinação. Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de diferentes testes de vigor para a determinação do potencial fisiológico e sanitário de lotes de sementes de couve manteiga (*Brassica oleracea L. var. acephala*). Os testes utilizados para avaliação de qualidade fisiológica e sanitária foram germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, comprimento de raiz, comprimento de parte aérea, emergência e sanidade. Os testes de primeira contagem e envelhecimento acelerado permitem o ranqueamento de lotes de sementes de couve manteiga com tendência similar à emergência de plântulas, pois apresentam sensibilidade suficiente para avaliação do potencial fisiológico. Incidência dos fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. foi verificada para a maioria dos lotes. A incidência de fungos pode interferir negativamente na qualidade fisiológica das sementes de couve manteiga.

Palavras-chave: *Brassica oleracea L. var. acephala DC.*, sanidade de sementes, vigor.

---

\*Artigo Submetido à Revista Acta Horticulturae

## ABSTRACT

The need for knowledge of the physiological and sanitary quality of seeds before sowing is essential, therefore it is important to know the efficiency of different tests that measure these attributes and can complement the information of the germination test. This study aimed to evaluate the efficiency of different vigor tests for determining the physiological potential and sanitary conditions of kale seed lots (*Brassica oleracea L. var. acephala*). The tests used to evaluate physiological and sanitary quality were germination, first germination count, accelerated aging, electrical conductivity, root length, shoot length, seedlings emergence and seed sanitary condition. The first count of germination and accelerated aging tests permit the ranking of seed lots of kale seeds with a similar tendency to seedling emergence, because they have sufficient sensitivity to assess the seed's physiological potential. Incidence of fungi belonging to different genus, such as *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Alternaria* spp., and *Cladosporium* spp. were observed for most of the seed lots. The incidence of fungi may have negative effects in the physiological quality of kale seeds.

**Keywords:** *Brassica oleracea L. var. acephala* DC, seed sanity, vigor.

## INTRODUÇÃO

A couve manteiga (*Brassica oleracea L. var. acephala*) é uma hortaliça arbustiva anual ou bienal, pertencente à família Brassicaceae. O consumo dessa hortaliça no Brasil tem aumentado gradativamente, principalmente devido às novas maneiras de utilização na culinária e às recentes descobertas da ciência quanto às suas propriedades nutricêuticas, ou seja, com capacidade comprovada de benefícios à saúde (NOVO et al., 2010). Na produção dessa brássica, uma das formas de minimizar problemas no seu processo produtivo é a utilização de sementes de alta qualidade.

A qualidade de um lote de sementes é representada pelo somatório de atributos genéticos, fisiológicos, sanitários e físicos, os quais juntos determinam o seu valor para semeadura, destacando-se o componente fisiológico da qualidade das sementes, diretamente responsável pelo desempenho em campo e no armazenamento (RODO et al., 2000).

O teste de germinação é um dos testes utilizados para verificar os componentes da qualidade das sementes. Entretanto, por ser realizado sob condições favoráveis e artificiais, permite a manifestação do máximo potencial

de germinação (BRASIL, 2009). Diante do exposto, empresas produtoras de sementes e instituições de pesquisa necessitam de metodologias e testes com sensibilidade suficiente para estimar com maior precisão a qualidade das sementes, e dessa forma, selecionar os lotes para a comercialização.

Diferentes testes de vigor estão disponíveis, entre eles, os de condutividade elétrica e de envelhecimento acelerado tem se mostrado bastante promissores, em termos de padronização, por proporcionarem resultados reproduzíveis, relacionados, muitas vezes, com a emergência de plântulas em campo e o potencial fisiológico e de armazenamento, além da facilidade de execução, baixo custo e rapidez (HAMPTON e TEKRONY, 1995).

Os testes que avaliam o comprimento de plântulas recomendados pela Association of Official Seed Analysts (AOSA) e International Seed Testing Association (ISTA) são empregados nos laboratórios de análise de sementes, por apresentarem as vantagens de não serem caros, de serem relativamente rápidos, não necessitarem de equipamentos especiais, nem demandar treinamento específico sobre a técnica empregada (Association Of Official Seed Analysts – AOSA, 1983).

O teste de sanidade apresenta importância fundamental na análise de qualidade de sementes e tem por objetivo determinar o estado sanitário de uma amostra de sementes e, consequentemente, do lote que representa, permitindo a comparação de diferentes lotes para determinar sua utilização comercial (LAZAROTTO, 2008).

As sementes podem ser um importante veículo de disseminação de patógenos. Se os fungos patogênicos são transmitidos por sementes, servem de inóculo inicial para disseminação no campo e podem causar grandes prejuízos (ZANATTA et al., 2004). Também são responsáveis pelo decréscimo na qualidade fisiológica das sementes, morte das plântulas resultantes e transmissão de doenças para a parte aérea e sistema radicular da planta (MACHADO, 2000).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de diferentes testes de vigor para a determinação do potencial fisiológico e sanitário de lotes de sementes de couve manteiga.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes e em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizados quatro lotes de sementes de couve manteiga. As sementes foram submetidas aos testes e determinações descritos a seguir:

**Determinação do teor de água:** Foi executado em estufa de circulação de ar forçado a  $105 \pm 3$  °C, por 24 h, de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009), utilizando-se duas amostras de 4 g de semente para cada lote. Os resultados foram expressos em porcentagem média por lote. A umidade da semente foi realizada antes e após a condução do teste de envelhecimento acelerado.

**Teste de germinação:** Foi conduzido a 20 °C, com 200 sementes por lote (quatro subamostras de 50 sementes). As sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel, e colocadas no interior de caixas plásticas transparentes (11,5x11,5x3,5 cm) com tampa. As avaliações foram realizadas aos cinco e aos dez dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

**Primeira contagem da germinação:** Foi efetuada em conjunto ao teste de germinação, computando-se a porcentagem de plântulas normais obtidas no quinto dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

**Condutividade elétrica:** Foi realizada com quatro repetições de 50 sementes, sendo as sementes colocadas em copos plásticos de 200 mL, aos quais foram adicionados 50 mL de água deionizada. As leituras foram realizadas ao final de 2, 4, 6, 8 e 24 horas. O valor de condutividade elétrica foi determinada em condutivímetro, sendo expresso em  $\text{mS cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ .

**Envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl:** As amostras foram distribuídas sobre bandeja de tela de alumínio fixada no interior de caixa plástica (gerbox), contendo 40 mL de água, mantida a 41 °C, por 48 horas. Essa solução foi obtida pela adição de 40g de NaCl em 100 ml de água, estabelecendo, um ambiente com umidade relativa do ar de 76%, conforme procedimento proposto por Jianhua e McDonald (1997). Após este período, as

sementes foram colocadas para germinar seguindo a metodologia utilizada no teste de germinação (BRASIL, 2009). A avaliação das plântulas foi realizada no quinto dia após a semeadura, considerando-se a porcentagem de plântulas normais conforme o descrito por Ramos et al. (2004) e Goulart e Tillmann (2007).

**Comprimento de plântulas:** Foram utilizadas 4 repetições de 20 sementes. Uma linha foi traçada no terço superior do papel de germinação no sentido longitudinal. Os papéis foram umedecidos previamente com água destilada equivalente a 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e colocados no germinador por 10 dias a 20 °C. Foi efetuada a medida da parte aérea e raiz das plântulas normais emergidas utilizando-se uma régua. Os resultados foram expressos em centímetros.

**Emergência de plântulas:** Foi avaliada com quatro subamostras de 50 sementes por lote, distribuídas em bandejas de poliestireno expandido (isopor) com 200 células preenchidas com substrato comercial Plantmax®. As avaliações foram realizadas aos 12 dias após a semeadura, computando-se as plântulas e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais emergidas.

**Teste de sanidade:** utilizou-se a metodologia do papel filtro. Foram utilizadas doze repetições de 25 sementes, colocadas em caixas plásticas do tipo “gerbox” contendo três folhas de papel filtro umedecidos com PEG 6000 (-0.5 MPa). As sementes foram incubadas à temperatura de 25 °C por sete dias, sob fotoperíodo de 12 horas de regime de luz e 12 horas de escuro. Após o período de incubação, as sementes foram examinadas individualmente em microscópio estereoscópico, computando-se a porcentagem de incidência fúngica, sendo realizada a identificação dos patógenos com base em características morfológicas (BARNETT e HUNTER, 1972).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O teste de condutividade foi analisado em esquema fatorial 4 lotes x 5 períodos de embebição das sementes. Para os testes de comprimento de raiz e da parte aérea foram utilizadas 4 repetições de 20 sementes e para todos os demais testes foram empregadas 4 repetições de 50 sementes. No procedimento estatístico, a análise de variância foi realizada separadamente para cada teste

e a comparação entre as médias dos lotes foi efetuada pelo teste de Tukey, em nível de probabilidade de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água inicial dos lotes de sementes de couve manteiga variou de 5,6 a 7,1% (Tabela 1). Para Marcos Filho (1999) é conveniente à comparação de amostras que apresentam teores de água similares antes do envelhecimento; no entanto, diferenças de 1 a 2 pontos percentuais entre as amostras não comprometem os resultados do teste. Houve um aumento no teor de água das sementes, após o teste de envelhecimento, entretanto, entre os lotes essa variação não excedeu a 2 pontos percentuais (Tabela 1).

No teste de germinação, de maneira geral, os lotes mostraram maior percentual de plântulas normais em relação ao teste de emergência das plântulas. Isto ocorre, muitas vezes devido às condições menos favoráveis de ambiente que, normalmente, conduzem a subestimação dos resultados em campo (MARCOS FILHO et al., 1987). O teste de primeira contagem de germinação detectou diferenças de vigor entre os lotes de sementes de couve manteiga (Tabela 1), embora tenha separado apenas o lote 1 do lote 4.

**Tabela 1.** Grau de umidade inicial (GUI) e após o envelhecimento acelerado (GUF), germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), envelhecimento acelerado com solução de NaCl-76% (EA), comprimento de raiz (CR), comprimento de parte aérea (CPA), emergência de plântulas (EP), de quatro lotes de sementes de couve manteiga.

Lotes	GUI (%)	GUF (%)	G (%)	PCG (%)	EA (%)	CR (cm)	CPA (cm)	EP (%)
1	7,1	20,1	88 ab	76 a	70 a	4,7 b	3,4 a	85 a
2	5,7	19,9	86 ab	75 ab	71 a	6,2 a	2,6 b	91 a
3	5,8	20,3	93 a	70 ab	72 a	3,3 c	2,8 b	90 a
4	5,6	21,8	79 b	66 b	41 b	3,6 c	2,7 b	77 b
CV(%)	-	-	11,3	12,2	12,1	10,0	9,7	4,2

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de probabilidade de 5%, pelo teste de Tukey.

O teste de envelhecimento acelerado indicou os lotes 1, 2 e 3 como os de maior vigor e o lote 4 como de menor vigor. Esse teste também apresentou resultados semelhantes aos obtidos nos testes de germinação e primeira contagem. Além disso, esse teste apresentou tendência similar à emergência

de plântulas. Esses dados corroboram com outros trabalhos realizados com hortaliças, como: cebola (PIANA et al., 1995) e cenoura (MARTINS et al., 1996) ao mostrarem, dentre os testes estudados, que o envelhecimento acelerado foi o que apresentou melhor relação com a emergência das plântulas em campo. Todavia, o teste de envelhecimento acelerado não foi suficiente para distinguir os lotes de sementes de repolho quanto ao potencial fisiológico (COSTA et al., 2008).

Verifica-se que os testes comprimento da raiz e comprimento de parte aérea apresentaram diferenças significativas entre os lotes, mas não ranquearam os lotes de maneira semelhante os demais testes. O comprimento de raiz das plântulas oriundas de sementes do lote 2 foi superior aos demais lotes. O teste de comprimento da parte aérea, ranqueou os lotes de maneira diferente, sendo o lote 1 considerado de vigor superior aos demais. De uma maneira geral, os testes de comprimento de raiz e da parte aérea não apresentaram a indicação similar a do teste de emergência de plântulas, não sendo interessante sua utilização para avaliação do vigor de sementes de couve manteiga, com o objetivo de ranquear lotes. Os dados corroboram os encontrados por Borsato et al.(2000) com sementes de *Avena sativa* L., os quais não possibilitaram a separação dos lotes em níveis de vigor.

O teste de emergência de plântulas foi usado como referência na comparação com os demais testes de vigor e pelos resultados, os lotes foram agrupados em duas classes de vigor: superior (lotes 1, 2 e 3) e inferior (lote 4).

Os testes de condutividade elétrica não apresentaram resultados similares à emergência de plântulas, apenas nas avaliações após 6, 8 e 24 horas de embebição, mostrando uma tendência do lote 4 ser de menor vigor. Nesse caso, não é possível apontar o teste de condutividade elétrica como um dos testes de vigor promissores para sementes de couve manteiga (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados do teste de condutividade elétrica ( $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  semente) com embebição de 50 sementes em 50 mL de água destilada, por períodos de 2, 4, 6, 8 e 24 horas, de quatro lotes de sementes de couve manteiga.

Lotes	Períodos de embebição (h)				
	2	4	6	8	24
1	11,54 aA	14,72 aB	18,64 aC	22,49 aD	30,42 aD
2	11,99 aA	15,59 aB	20,60 bC	24,86 abD	33,45 abE
3	14,98 bA	19,61 bB	24,75 cC	28,10 bD	34,65 bE
4	11,97 aA	18,06 abB	26,01 cC	29,75 bD	37,16 cE
CV(%)	10,8				

Médias seguidas por mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de probabilidade de 5%.

Foi observada incidência dos fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Alternaria* spp. e *Cladosporium* spp., para a maioria dos lotes avaliados, porém, a incidência variou entre os diferentes lotes (Tabela 3). Os gêneros de fungos encontrados podem ser divididos em fungos transmitidos às plântulas e plantas pela semente, como *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. e *Cladosporium* spp. e fungos de armazenamento, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Ryzopus* spp.

A contaminação por *Aspergillus* spp. é preocupante uma vez que esses fungos podem causar deterioração nas sementes e reduzir a germinação e o vigor (CIRIO e LIMA, 2003; BARRETO et al., 2004). O lote 4 considerado de menor vigor apresentou a maior incidência (53%) desse fungo (Tabela 3).

**Tabela 3.** Incidência de fungos detectados no teste de sanidade, em quatro lotes de sementes de couve manteiga.

Lotes	Incidência de fungos (%)					
	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Ryzopus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.
1	8 a	1 a	37 b	0 a	9 a	26 b
2	13 a	1 a	15 a	3 b	9 a	0 a
3	40 b	2 a	10 a	0 a	61 c	1 a
4	53 c	3 a	12 a	0 a	31 b	2 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de probabilidade de 5%, pelo teste de Tukey.

Nos lotes 2 e 3 foram observados altos percentuais de sementes contaminadas com *Aspergillus* spp. (13 e 40%), *Fusarium* spp. (15 e 10%), *Penicillium* spp. (9 e 61%) (Tabela 3). Entretanto, esses lotes foram os de maior vigor e apresentaram emergência de plântulas superiores a 90%. Isso

evidencia que sementes mais vigorosas podem ser menos vulneráveis ao ataque de patógenos que sementes de menor vigor. Trabalhando com sementes de milho não tratadas, observaram que as porcentagens de infecção por fungos foram maiores nas sementes do híbrido D 657, devido a estas serem menos vigorosas do que as do híbrido D 679. Galli et al. (2001)

## CONCLUSÃO

Os testes de primeira contagem e envelhecimento acelerado permitem o ranqueamento de lotes de sementes de couve manteiga com tendência similar à emergência de plântulas.

A incidência de fungos interfere negativamente na expressão da qualidade fisiológica das sementes de couve manteiga.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA. **Seed vigor testing handbook**. East Lansing: AOSA, 1983. (Contribution, 32).

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. 3<sup>rd</sup> ed. Minneapolis MN. Burgess Publishing Company. 1972.

BARRETO, A. F.; EGBERTO, A.; BONIFÁCIO, B. F.; FERREIRA, O.R.R.S.; BELÉM, L.F. Qualidade fisiológica e a incidência de fungos em sementes de algodoeiro herbáceo tratadas com estratos de agave. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 2/3, p. 839-849, 2004.

BORSATO, A.V. et al. Avaliação de testes de vigor para sementes de aveia-branca (*Avena sativa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 22, nº 1, p.163-168, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

CIRIO, G.M.; LIMA, M.L.R.Z.C. Métodos de detecção do gênero *Aspergillus* em sementes de milho (*Zea mays*) em 270 dias de armazenamento. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n.1, p. 19-23, 2003.

COSTA, C.J.; TRZECIAK, M. B.; VILLELA, F.A. Potencial fisiológico em sementes de brássicas com ênfase no teste de envelhecimento acelerado. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p.144-148, 2008.

GALLI, J.; FESSEL, S.A.; SADER, R.; PANIZZI, R. DE C.; COSTA, P.R.R. Influência do tratamento químico na população de fungos, na germinação e no vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n.2, p.245-259, 2000.

GOULART, L.S.; TILLMANN, M.A.A. Vigor de sementes de rúcula (*Eruca sativa* L.) pelo teste de deterioração controlada. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.2, p.179-186, 2007.

HAMPTON, J.G.; TEKRONY, D.M. *Handbook of vigor test methods*. Zürich: ISTA, 1995. 117 p.

JIANHUA, Z.; McDONALD, M.B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, Zürich, v.25, n.1, p.123-131, 1997.

LAZAROTTO, M.; QUADROS, K.M.; MUNIZ, M.F.B.; BLUME, E. Correlação entre testes para avaliação da qualidade de sementes de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) e a germinação. **Revista da FZVA. Uruguaiana**, v.15, n.1, p. 43-53. 2008.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138p.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes**: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap.3, p.1-24.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MARTINS, L.; SPINOLA, M.C.M.; CALIARI, M.F.; TESSARIOLI NETO, J. Comparação entre métodos para avaliação do vigor de sementes de cenoura (*Daucus carota* L.). In: SEMINÁRIO PANAMERICANO DE SEMILLAS, 15., **Anais**. Gramado: ABRATES, 1996. p.11.

NOVO, M.C.S.S; PRELA-PANTANO, A; TRANI, P. E; BLAT, S.F. Desenvolvimento e produção de genótipos de couve manteiga. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 321-325.2010.

PIANA, Z.; TILLMANN, M.A.A.; MINAMI, K. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de cebola e sua relação com a produção de mudas vigorosas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, p. 149-153, 1995.

RAMOS, N.P.; FLOR, E.P.O.; MENDONÇA, E.E.F.; MINAMI, K. Envelhecimento acelerado em sementes de rúcula (*Eruca sativa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.98-103, 2004.

RODO AB; PANOBIANCO M; MARCOSFILHO J. Metodologia alternativa do teste de envelhecimento acelerado para sementes de cenoura. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 289-292. 2000.

ZANATTA, Z. C. N.; UENO, B.; SILVAS, A.; GOMES, A. C. Fungos associadas às sementes de seis cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L) cultivadas na região de Pelotas, RS, safra 2003/2004.

## CAPÍTULO IV

### POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE COENTRO E RABANETE\*

#### RESUMO

As informações sobre vigor de sementes de espécies olerícolas são sempre importantes e necessárias devido à demanda crescente de sementes de alta qualidade para semeadura e o alto valor comercial das sementes. O cultivo dessas espécies, realizado de maneira intensiva, deve ser estabelecido com sementes de elevado potencial fisiológico e sanitário para o estabelecimento de uma agricultura mais produtiva e sustentável. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar do potencial fisiológico de sementes de coentro e rabanete. O experimento foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes e na casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O trabalho foi desenvolvido, utilizando-se lotes de sementes de coentro da cultivar Verdão e de sementes de rabanete da cultivar Saxa. Os testes de germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica e emergência de plântulas foram utilizados para avaliar a qualidade fisiológica dos lotes. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com cinco repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Os testes de envelhecimento acelerado (41 °C por 48h) e emergência de plântulas foram os mais indicados para avaliar a qualidade fisiológica dos lotes de rabanete. O teste de envelhecimento acelerado apesar de ter sido muito drástico foi o que ranqueou os lotes de sementes de coentro de forma similar aos resultados observados na emergência de plântulas.

**Palavras-chave:** *Raphanus sativus L.*, *Coriandrum sativum L.*, sementes de olerícolas, vigor, qualidade de sementes.

---

\*Artigo publicado na Revista Journal of Agricultural Science and Technology A  
USA

## ABSTRACT

Information on seed vigor of the vegetable crops is always important and necessary due to the increasing demand of high quality seeds for sowing and high-value commercial. The cultivation of these species, conducted intensively, should be established with seed high potential physiological and health for the development of a more productive and sustainable agriculture. The present study was conducted to evaluate the potential physiological of seed lots of radish and coriander. The experiment was conducted at the Laboratory of Seed Analysis and greenhouse of the plant science department of the Federal University of Pelotas in South Brazil. Four radish seed lots, cultivar 'Saxa', and four coriander seed lots, cultivar 'Verdão' were used. Germination seed test, first count of germination, accelerated aging test, electrical conductivity and seedling emergence were used to evaluate the physiological quality of the lots. The experimental design was completely randomized design with five replications. Means were compared by Tukey test. The accelerated aging test was the most efficient test in assessing the physiological quality for both lots of radish seeds and coriander and this test provide coherent results with seedlings emergence.

**Keywords:** *Raphanus sativus* L., *Coriandrum sativum* L., vegetable seeds, vigor, seed quality.

## INTRODUÇÃO

As sementes de hortaliças são de alto valor comercial, dessa forma, as informações sobre vigor são sempre importantes. O cultivo dessas espécies, realizado de maneira intensiva, deve ser estabelecido com sementes de elevado potencial fisiológico e sanitário (MARCOS FILHO, 1999). A pesquisa com sementes de hortaliças vem apresentando evolução significativa no Brasil a partir dos anos 1990, mas os trabalhos ainda são menos frequentes que os conduzidos com espécies de grandes culturas. É verdade que são cultivadas numerosas espécies olerícolas, cada qual com os respectivos problemas, mas o volume de conhecimento disponível não é condizente com a importância do assunto (MARCOS FILHO e KIKUTI, 2006). Com a demanda crescente de sementes de alta qualidade, para o estabelecimento de uma agricultura mais produtiva e sustentável, cresce também o monitoramento de cada fase do processo produtivo da indústria de sementes (ALVES et al., 2005).

A cultura do rabanete (*Raphanus sativus* L.) uma hortaliça anual cultivada principalmente em pequenas propriedades em cinturões verdes do

país (CARDOSO e KIRAKI, 2001). É uma das culturas de ciclo mais curto entre as hortaliças, o rabanete se torna uma excelente opção para o pequeno produtor (LINHARES et al., 2011). Essa cultura possui grande importância econômica, mas ainda é produzida e consumida em volumes menos significativos no país, entretanto, as sementes apresentam grande valor comercial, o que reforça a importância da avaliação do potencial fisiológico. O coentro (*Coriandrum sativum* L.) é uma olerícola consumida em diversas regiões do Brasil, especialmente no Norte, Nordeste e em menor proporção no Sudeste, é uma hortaliça amplamente consumida no Brasil como condimento apresentando grande importância socio-econômica. Entretanto, problemas relacionados ao baixo vigor de sementes e ao estabelecimento da cultura são uma constante nesta espécie (PEREIRA et al., 2005).

Ainda são poucos os trabalhos a respeito da utilização de teste de vigor para estimar o potencial fisiológico de sementes dessas espécies (MENEZES et al., 2001; PEREIRA et al., 2005; MARCOS FILHO e KIKUTI, 2006). Diante do exposto, o objetivo desse trabalho é avaliar a qualidade fisiológica de sementes de rabanete, da cultivar Saxa, e sementes de coentro, da cultivar verdão.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes e em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizados quatro lotes de sementes de rabanete da cultivar Saxa e sementes de coentro da cultivar verdão. As sementes foram submetidas aos testes e determinações descritas a seguir:

**Determinação do grau de umidade:** Foi realizada em estufa com circulação de ar forçado a  $105 \pm 3$  °C, por 24 h, de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009), utilizando-se duas amostras de 4 g de sementes para cada lote. Os resultados foram expressos em porcentagem média por lote. O teor de água da semente foi determinado antes e após a condução do teste de envelhecimento acelerado.

**Teste de germinação:** Foi conduzido a 20°C, com 200 sementes por lote (quatro subamostras de 50 sementes). As sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água

destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel, e colocadas no interior de caixas plásticas transparentes (11,5x11,5x3,5 cm) com tampa. As avaliações foram realizadas aos 7 e aos 21 dias para sementes de coentro e 4 e aos 10 dias após a semeadura sementes de rabanete e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

**Primeira contagem da germinação:** Foi efetuada em conjunto ao teste de germinação, computando-se a porcentagem de plântulas normais obtidas no quarto dia para sementes de rabanete e no sétimo dia após a semeadura para sementes de coentro (BRASIL, 2009).

**Condutividade elétrica:** Foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, sendo as sementes colocadas em copos plásticos de 200 mL, aos quais foram adicionados 50 mL de água deionizada. As leituras foram realizadas as 2, 4, 6, 8 e 24 horas. O valor de condutividade elétrica da solução, fornecido pelo aparelho, foi expresso em  $\text{mS cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ .

**Envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl:** As amostras foram distribuídas sobre bandeja de tela de alumínio fixada no interior de caixa plástica (gerbox), contendo 40 mL de água, mantida a 41 °C, por 48 horas. Essa solução foi obtida pela adição de 40g de NaCl em 100 ml de água, estabelecendo, um ambiente com umidade relativa do ar de 76%, conforme procedimento proposto por Jianhua e McDonald (1997). Após este período, as sementes foram colocadas para germinar seguindo a metodologia utilizada no teste de germinação (BRASIL, 2009). A avaliação das plântulas foi realizada no quarto dia após a semeadura para sementes de rabanete e sete dias para sementes de coentro, considerando-se a porcentagem de plântulas normais.

**Emergência de plântulas:** A semeadura de cada um dos lotes foi manual, em canteiros, em casa de vegetação, com quatro repetições de 50 sementes em linhas de 2,0 m de comprimento com espaçamento de 0,20 m entre linhas. A semeadura foi realizada com profundidade de 0,01 m. As avaliações foram realizadas aos 12 dias após a semeadura para sementes de rabanete e 30 dias para sementes de coentro, computando-se as plântulas normais e os resultados expressos em porcentagem de plântulas emergidas.

O teste de condutividade foi analisado em esquema fatorial 4 lotes x 5 períodos de embebição das sementes. O delineamento experimental utilizado para todos os testes foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. A

comparação das médias obtidas nos testes foi através do teste Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grau de umidade inicial das sementes foi semelhante entre os lotes, o que possibilita a obtenção de resultados mais consistentes. A germinação de todos os lotes de sementes de rabanete utilizadas foi superior a 90 %, e esses valores estão acima do valor padrão estabelecido para comercialização da maioria das sementes de olerícolas, que é de 80%. Esses valores de germinação indica alta qualidade das sementes testadas, e para a emergência das sementes em casa de vegetação, a porcentagem de germinação foi de 80% ou acima desse valor, comprovando a qualidade dos lotes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Grau de umidade inicial dos lotes (GUI), grau de umidade após o envelhecimento acelerado (GUF), e porcentagens médias obtidas para o teste de germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), envelhecimento acelerado com solução de NaCl (EA), emergência de plântulas (EP), dos quatro lotes de sementes de rabanete.

Lotes	GUI	GUF	G(%)	PCG(%)	EA(%)	EP(%)
1	8,8	10,7	95 a	88 b	83 ab	84 ab
2	8,9	10,9	95 a	87 b	86 a	88 a
3	8,6	10,5	97 a	93 a	81 b	80 b
4	8,3	10,7	96 a	94 a	83 ab	86 ab
CV(%)	-	-	3.22	5.25	4.93	5.31

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os lotes de sementes de rabanete não diferiram entre si quanto à porcentagem de germinação (Tabela 1), mostrando dessa forma, menor sensibilidade do teste de germinação em laboratório, para identificar diferenças no desempenho das sementes, frequentemente destacada na literatura, justificando-se assim, a utilização de testes de vigor nesses lotes (Tabela 1). Com o teste de germinação também não foi possível diferenciar lotes de sementes de trigo (MERTZ et al., 2012), de lentilha (FREITAS e

NASCIMENTO, 2006) isto porque o teste padrão de germinação é conduzido em condições ideais maximizando o potencial fisiológico das sementes.

No entanto, o teste de primeira contagem de germinação foi eficiente em classificar os lotes apenas em dois níveis de vigor (baixo e alto). Os dados obtidos por Torres et al. (1999), no teste de primeira contagem de germinação de sementes de tomate revelaram que este teste separou os lotes em dois níveis distintos de vigor, mostrando a mesma tendência dos observados nesse trabalho (Tabela 1).

O teste de envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl detectou diferenças de vigor entre os lotes de sementes de rabanete, proporcionando informações comparáveis as observadas na emergência de plântulas (Tabela 1). Dentre os testes disponíveis, o envelhecimento acelerado é um dos mais estudados e recomendado para várias espécies cultivadas. Inicialmente desenvolvido com a finalidade de estimar a longevidade de sementes armazenadas, tem sido amplamente estudado com vistas à sua padronização (RODO et al., 2000) e sua capacidade de proporcionar informações com alto grau de consistência é ressaltada (MARCOS FILHO, 1999). Este método também se mostrou eficiente para avaliação do vigor de sementes de diferentes sementes de hortaliças como: pepino (BHERING et al., 2000), cenoura (RODO et al., 2000), tomate (PANOBIANCO e MARCOS FILHO, 2001), melão (TORRES e MARCOS FILHO, 2003) e rúcula (RAMOS et al., 2004).

Para o teste de condutividade elétrica (Tabela 2) verificou-se que não houve interação significativa entre os períodos de embebição e os lotes de sementes de rabanete analisados, embora ranqueando os lotes em quatro níveis de vigor, com superioridade para os lotes 1 e 2 e inferioridade para o lote 3. Com o aumento do tempo de embebição houve maior lixiviação dos exsudatos da semente.

Todavia, para sementes de aveia preta, o teste de condutividade elétrica sob as diferentes condições em que foi realizado não conseguiu estratificar os lotes, com base no vigor das sementes. Além disso, verificaram-se efeitos significativos somente nos fatores principais: lotes de sementes, número de sementes e períodos de embebição (MENEZES et al., 2007).

**Tabela 2.** Resultados do teste de condutividade elétrica com embebição de 50 sementes em 50 mL de água deionizada, por períodos de 2, 4, 6, 8 e 24 horas de quatro lotes de sementes de rabanete.

Lotes	Períodos de embebição (h)					Média
	2	4	6	8	24	
1	35,90	42,30	46,80	51,40	65,40	43,44 A
2	32,00	41,00	43,70	47,60	58,70	45,12 A
3	34,80	46,10	51,60	57,40	62,40	51,56 C
4	34,50	43,60	47,20	52,10	64,80	48,17 B
Média	33,45 a	41,76 b	46,24 c	50,80 d	63,12 e	
CV(%)			9.00			

Médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Dentre as sementes de hortaliças, as sementes de coentro apresentam até o momento, um padrão de comercialização no Brasil considerado baixo (60%), (MAPA, 1986). Nos lotes testados, a germinação das sementes foi superior a esse valor mínimo e houve uma variação entre os lotes de 71% a 82% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Grau de umidade inicial dos lotes (GUI), grau de umidade após o envelhecimento acelerado (GUF), e porcentagens médias obtidas para o teste de germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl (EA), emergência de plântulas em bandeja (EP), dos quatro lotes de sementes de coentro.

Lotes	GUI	GUF	G(%)	PCG(%)	EA(%)	EP(%)
1	8,8	10,7	81 a	72 a	35 a	50 b
2	9,1	11,9	71 b	63 bc	15 c	35 c
3	8,8	10,7	82 a	59 c	26 b	53 b
4	8,9	11,7	77 a	66 b	35 a	61 a
CV(%)	-	-	7.74	8.26	10.0	10.3

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

No teste de germinação observou-se que com exceção das sementes do lote 2, que expressou porcentagem de germinação inferior ao demais, a germinação das sementes dos outros lotes foi semelhante (Tabela 3). Esse resultado também foi observado por Piana et al. (1995), ao verificar que o teste

de germinação não foi sensível para distinguir diferenças na qualidade fisiológica entre lotes de sementes de cebola, sendo capaz apenas de mostrar a inferioridade de um dos lotes.

O teste de primeira contagem separou os lotes em diferentes classes de vigor: alto vigor (lote 1), baixo (lote 3), e vigor intermediário (lote 2 e 4) (Tabela 3). Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram constatados por Miguel e Marcos Filho (2002) que, trabalhando com sementes de milho, verificaram que o teste de primeira contagem permitiu classificar os lotes em três níveis de vigor (baixo, alto e intermediário).

O teste de condutividade elétrica sob as condições em que foi aplicado estratificou os lotes, com base no vigor das sementes. Porém, não se verificou efeitos significativos na interação: lotes de sementes e períodos de embebição (Tabela 4). O lote 3 apresentou maior vigor e lote 4 menor, contrariando a separação em níveis de vigor obtida nos testes de envelhecimento acelerado e de emergência de plântulas.

**Tabela 4.** Resultados do teste de condutividade elétrica com embebição de 50 sementes em 50 mL de água deionizada, por períodos de 2, 4, 6, 8 e 24 horas de quatro lotes de sementes de coentro.

Lotes	Períodos de embebição (h)					Média
	2	4	6	8	24	
1	330,18	362,25	388,00	397,69	467,56	389,14 B
2	476,19	512,44	520,94	534,50	614,81	531,77 C
3	316,69	342,12	357,56	364,68	432,37	362,88 A
4	555,94	600,44	625,18	634,94	724,00	628,1 D
Média	419,75 a	454,31 b	472,92 c	482,95 c	559,68 d	448,47
CV(%)	6.04					

Médias seguidas por mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O efeito do teste de envelhecimento acelerado, realizado por 48h a 41 °C foi excessivamente drástico, ocorrendo reduções na germinação superior a 50 pontos percentuais em relação às sementes não envelhecidas, situação que pode comprometer o resultado do teste, porém, esse teste encontrou diferenças entre lotes e os separou em diferentes níveis de vigor (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Mendonça et al. (2008), com sementes de algodão, onde mesmo nas condições menos severas de

envelhecimento, 41 °C por 48h, a maior parte dos lotes tiveram a germinação diminuída em cerca de 50 pontos percentuais em relação aos valores iniciais.

Para todos os lotes, de maneira geral, a emergência das plântulas foi baixa, variando de 35,0% a 61,0%. A qualidade fisiológica das sementes é avaliada rotineiramente em laboratório, pelo teste padrão de germinação, no entanto, acredita-se que como esse teste é realizado em condições adequadas e pode superestimatar o potencial fisiológico das sementes (CALIARI e MARCOS FILHO, 1990). Portanto, se as condições do ambiente após a semeadura não forem as ideais, a percentagem de emergência das plântulas pode ser inferior à de germinação determinada em laboratório (MARCOS FILHO et al., 1987), ocorrência constatada nesse trabalho. A emergência das plântulas separou os lotes em três níveis, destacando os lotes 4 como de maior vigor, o lote 2 como de menor potencial e os demais como intermediários. O pior desempenho apresentado por sementes do lote 2 na emergência das plântulas em solo também nos testes de germinação e envelhecimento acelerado.

Os testes de primeira contagem, envelhecimento acelerado e emergência de plântulas apresentam eficiência na diferenciação da qualidade fisiológica de lotes de sementes de coentro, entretanto, os testes não ranquearam os lotes exatamente da mesma maneira. O teste de envelhecimento acelerado apesar de ter sido muito drástico foi o que permitiu o ranqueamento dos lotes de forma similar aos resultados observados na emergência de plântulas.

## CONCLUSÃO

Os testes de envelhecimento acelerado e emergência de plântulas foram os mais indicados para avaliar a qualidade dos lotes de rabanete. Para sementes de coentro, o teste de envelhecimento acelerado apesar de ter sido muito drástico foi o que ranqueou os lotes de forma similar à emergência de plântulas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVILA, V. F.; VILLELA, F.A.; ÁVILA, M.S.V. Teste de envelhecimento acelerado para avaliação do potencial fisiológico de sementes de rabanete. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n. 3, p.52-58, 2006.
- BHERING, M.C.; DIAS, D.C.F.S.; GOMES, J.M.; BARROS, D.I. Métodos para avaliação do vigor de sementes de pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, p.171-175, 2000.
- CALIARI, M.F.; MARCOS FILHO, J. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de ervilha (*Pisum sativum L.*). **Revista Brasileira de Sementes**, v.12, n.3, p.52-75, 1990.
- FREITAS, R. A. DE; NASCIMENTO, W. M. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de lentilha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p.59-63, 2006.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, Portaria 457, DOU, 18 de dezembro de 1986.
- MARCOS FILHO, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: KRYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed). Vigor de sementes: conceito e testes. Londrina: **ABRATES**, 1999. Cap. 1, p. 1-21.
- MERTZ, L. M.; SEGALIN, S. R.; HUTH, C.; ROSA, T. D. Condutividade elétrica individual para a avaliação do potencial fisiológico de sementes de trigo. **Informativo Abrates**. v. 22, n.1, 2012.
- MENEZES, N.L.; GARCIA, D.C.; BAHRY, C.A.; MATTIONI, N.M. Teste de condutividade elétrica em sementes de aveia preta. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p.138-142, 2007.

MENDONÇA, E.A.F.; AZEVEDO, S. C.; GUIMARÃES, S.C.; ALBUQUERQUE, M. C. F. Testes de vigor em sementes de algodoeiro herbáceo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p.01-09, 2008.

PANOBIANCO, M.; MARCOS-FILHO. Envelhecimento acelerado e deterioração controlada em sementes de tomate. **Scientia Agrícola**, v.58, p.525-531, 2001.

PIANA, Z.; TILLMANN, M.A.A.; MINAMI, K. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de cebola e sua relação com a produção de mudas vigorosas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.17, n.2, p.149-153, 1995.

RAMOS, N.P.; FLOR, E.P.O.; MENDONÇA, E.A.F.; MINAMI, K. 2004. Envelhecimento acelerado em sementes de rúcula (*Eruca sativa L.*). **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, p. 98-103, 2004.

RODO, A. B.; PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J. Metodologia alternativa do teste de envelhecimento acelerado para sementes de cenoura. **Scientia Agricola**, v.57, p.289- 292, 2000.

TORRES, S.B.; MARCOS FILHO, J. Accelerated aging of melon seeds. **Scientia Agricola**, v.60, p.77-82, 2003.

TORRES, S. B.; PEIXOTO, A. R.; CARVALHO, I. M. S. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de tomate da região do submédio São Francisco. **Ciênc. e agrotec.**, Lavras, v.23, n.4, p.825-829, 1999.

## CAPÍTULO V

### POTENCIAL FISIOLÓGICO E FITOSSANITÁRIO DE SEMENTES DE PEPINO<sup>\*</sup>

#### RESUMO

O pepino é uma importante cultura produzida e consumida no Brasil. As sementes de pepino apresentam um grande valor comercial e merecem atenção quanto à qualidade fisiológica e sanitária. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar do potencial fisiológico e sanitário de sementes de pepino. O trabalho foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes e na casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), utilizando-se quatro lotes de sementes de pepino, cultivar Aoidai, abrangendo testes de germinação, primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, teste de frio, sanidade e emergência de plântulas. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com cinco repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de probabilidade de 5%. Concluiu-se que os testes de frio com estresse aos 3 e 5 dias, teste de primeira conatação e de envelhecimento acelerado apresentam eficiência para a avaliação do potencial fisiológico de sementes de pepino. A incidência de fungos associados às sementes de pepino interfere na expressão da qualidade fisiológica dos lotes.

Palavras-chave: *Cucumis sativus L.*, qualidade de sementes de hortaliças, vigor de sementes, sanidade de sementes.

---

\* Artigo Submetido à Revista Acta Horticulturae

## ABSTRACT

Cucumber is a very important crop produced and consumed in Brazil. Its seeds have high commercial value and deserve special attention due to their physiological and sanitary quality. Therefore studies aiming at determining seed vigor should be intensified. The present study was carried out to evaluate the physiological and sanitary qualities of cucumber seeds. The study was conducted at the Laboratory of Seed Analysis and at the greenhouse of the Department of Plant Science, at the Federal University of Pelotas (UFPel). Four lots of cucumber seeds, cultivar 'Aoidai', were tested for the following features: germination, first count germination, accelerated aging, electrical conductivity, cold test, sanitary condition, and seedling emergence. The experimental design was completely randomized with five replications. Means were compared by Tukey test at an overall probability of 5%. It was concluded that the cold test with seed stress at 3 and 5 days, first count of germination and accelerated aging test showed efficiency to evaluate the physiological quality of cucumber seeds. The incidence of fungi associated with seeds of cucumber affect the physiological quality of the lots.

**Keywords** - *Cucumis sativus L.*; quality vegetable seed; seed vigor, seed sanity.

## INTRODUÇÃO

Os testes de vigor constituem ferramentas cada vez mais necessárias para a determinação do potencial fisiológico de lotes de sementes e consequente garantia da qualidade das sementes destinadas à comercialização (MARCOS FILHO, 1999; 2001). A qualidade da informação gerada pelos resultados de teste de vigor também depende da adequada escolha do método, em função dos objetivos pretendidos. Por exemplo, o uso de apenas um teste pode proporcionar informações incompletas. Dessa forma, a tendência predominante é a combinação de resultados de vários testes (MARCOS FILHO e NOVEMBRE, 2009).

A avaliação do potencial fisiológico é um importante componente nos programas de controle de qualidade destinados a garantir desempenho satisfatório das sementes e há uma estreita relação entre esse potencial e a qualidade sanitária. Para algumas espécies, há testes padronizados para avaliar o vigor das sementes, como por exemplo, o de envelhecimento acelerado para soja e o de condutividade elétrica para ervilha. No entanto, são

necessários mais estudos sobre o uso de testes de vigor para avaliação do potencial fisiológico e sanitário de sementes de hortaliças.

O valor comercial das sementes de hortaliças é elevado e o desenvolvimento de novos testes, o aprimoramento dos testes disponíveis e sua padronização devem ocorrer de modo rápido (McDONALD, 1998; MARCOS FILHO et al., 2005).

A obtenção de sementes de alta qualidade sanitária é resultado de um adequado manejo durante a colheita e de uma cuidadosa armazenagem pós-colheita (GALLY e RONA, 2006). Porém, os patógenos, transmitidos ou não por sementes, também podem afetar-lhes o vigor no campo, tendo efeito ainda mais pronunciado caso se tratem de organismos que colonizam os tecidos internos das sementes (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). A cultura do pepino é produzida em volumes significativos no país e as sementes apresentam grande valor comercial, o que reforça a importância da avaliação do potencial fisiológico e sanitário. Para algumas sementes de hortaliças, de importância econômica, trabalhos abordando vigor e sanidade, já estão disponíveis. Para a cultura do pepino, entretanto, as informações sobre vigor e sanidade de sementes de ainda precisa ser mais trabalhada pela pesquisa.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho é avaliar a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de pepino.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes e em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas, no departamento de fitotecnia da FAEM. Foram utilizados quatro lotes de sementes de pepino, cultivar Aoidai. As sementes foram submetidas aos testes e determinações descritas a seguir:

**Determinação do grau de umidade:** Foi realizada em estufa com circulação de ar forçado a  $105 \pm 3$  °C, por 24 h, de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009), utilizando-se duas amostras de 4 g de sementes para cada lote. Os resultados foram expressos em porcentagem média por lote. O teor de água da semente foi determinado antes e após a condução do teste de envelhecimento acelerado.

**Teste de germinação:** Foi conduzido a 20°C, com 200 sementes por lote (quatro subamostras de 50 sementes). As sementes foram distribuídas sobre duas folhas de papel mata-borrão, previamente umedecidas com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel, e colocadas no interior de caixas plásticas transparentes (11,5x11,5x3,5 cm) com tampa. As avaliações foram realizadas aos quatro e aos oito dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009).

**Primeira contagem da germinação:** Foi efetuada em conjunto ao teste de germinação, computando-se a porcentagem de plântulas normais obtidas no quarto dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

**Condutividade elétrica:** Foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, sendo as sementes colocadas em copos plásticos de 200 mL, aos quais foram adicionados 50 mL de água deionizada. As leituras foram realizadas as 2, 4, 6, 8 e 24 horas. O valor de condutividade elétrica da solução, fornecido pelo aparelho, foi expresso em  $\text{mS cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ .

**Envelhecimento acelerado com solução saturada de NaCl:** As amostras foram distribuídas sobre bandeja de tela de alumínio fixada no interior de caixa plástica (gerbox), contendo 40 mL de água, mantida a 41 °C, por 48 horas. Essa solução foi obtida pela adição de 40g de NaCl em 100 ml de água, estabelecendo, um ambiente com umidade relativa do ar de 76%, conforme procedimento proposto por Jianhua e McDonald (1997). Após este período, as sementes foram colocadas para germinar seguindo a metodologia utilizada no teste de germinação (BRASIL, 2009). A avaliação das plântulas foi realizada no quarto dia após a semeadura, considerando-se a porcentagem de plântulas normais conforme o descrito por Ramos et al. (2004) e Goulart e Tillmann (2007).

**Emergência de plântulas:** Foi avaliada com quatro subamostras de 50 sementes por lote, distribuídas em bandejas de poliestireno expandido (isopor) com 200 células preenchidas com substrato comercial Plantmax®. As avaliações foram realizadas aos 12 dias após a semeadura, computando-se as plântulas normais e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais emergidas.

**Teste de sanidade:** utilizou-se a metodologia do papel filtro. Foram utilizadas doze repetições de 25 sementes, colocadas em caixas plásticas do tipo "gerbox" contendo três folhas de papel filtro umedecidos com PEG 6000. As sementes foram incubadas à temperatura de 25 °C por sete dias, sob fotoperíodo de 12 horas de regime de luz e 12 horas de escuro. Após o período de incubação, as sementes foram examinadas individualmente sob microscópio estereoscópico, computando-se a percentagem de incidência fúngica, sendo realizada a identificação dos patógenos com base em suas características morfológicas (BARNETT e HUNTER, 1972).

**Teste de frio** - foram utilizadas 200 sementes (4 subamostras de 50 sementes) distribuídas sobre papel germitest umedecido com quantidade de água equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. Os rolos de papel foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos em BOD a 10 °C, sendo realizada três períodos de estresse aos 3, 5 e 7. Posteriormente ao período de estresse os sacos plásticos foram mantidos em germinador a 20 °C, e as avaliações foram realizadas quatro após a cada período de estresse.

O teste de frio foi conduzido em esquema fatorial 4 lotes e 3 períodos. O teste de condutividade foi analisado em esquema fatorial 4 lotes x 5 períodos de embebição das sementes. O delineamento experimental utilizado para todos os testes foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. A comparação das médias obtidas nos testes foi através do teste Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, os lotes apresentavam porcentagens de germinação semelhantes, (Tabela 1). O teste de primeira contagem de germinação separou apenas o lote 2 dos demais. No entanto, ao utilizar o teste de envelhecimento acelerado para avaliar a qualidade fisiológica das sementes de pepino, observou-se que apenas o lote 4 mostrou-se inferior aos demais lotes, caso também verificado pelo teste de emergência. Desta forma, pode-se inferir que o lote 4 apresenta vigor inferior relativamente aos demais lotes.

O grau de umidade das sementes variou de 8,9 a 9,3 antes do início da execução dos testes pra avaliação da qualidade fisiológica. Sendo a umidade uniforme entre os lotes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Grau de umidade inicial (GUI) e após o envelhecimento acelerado (GUF), e porcentagens médias obtidas para o teste de germinação (G), primeira contagem de germinação (PCG), envelhecimento acelerado com solução de NaCl-76% (EA) por 48 h, emergência de plântulas (EP), dos quatro lotes de qualidade de sementes de pepino, cultivar Aodai.

Lotes	GUI	GUF	G %	PCG	EA	EP
1	8,9	9,8	89 a	79 a	92 a	71 a
2	8,9	10,4	88 a	77 b	92 a	67 ab
3	9,3	10,6	88 a	79 a	93 a	70 a
4	9,2	10,2	86 a	78 ab	87 b	65 b
CV(%)	-	-	4.29	2.11	4.62	4.60

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, em nível de probabilidade de 5%, pelo teste de Tukey.

O teste de envelhecimento acelerado mostrou-se o mais eficiente na separação dos lotes de sementes de pepino permitindo agrupar em duas categorias: potencial fisiológico superior (lotes 1, 2 e 3) e inferior (lote 4). Esse teste também mostrou-se o mais sensível para a estratificação de lotes de sementes de alface (NASCIMENTO e PEREIRA, 2007). Por outro lado, Bhering et al. (2000) ao utilizarem diferentes testes para avaliar o vigor de sementes de pepino obtiveram resultados discordantes aos verificados nesse trabalho, sendo o teste de primeira contagem de germinação o mais eficaz na separação dos lotes, enquanto o de envelhecimento acelerado apenas separou as sementes de vigor inferior.

É importante destacar que cada teste apresenta sua peculiaridade na diferenciação da qualidade fisiológica das sementes, por isso é necessário utilizar vários testes para poder detectar pequenas diferenças de vigor entre lotes. Segundo Delouche e Baskin (1973), citado por Marcos Filho (1999), o processo de deterioração das sementes é progressivo iniciando com a degeneração das membranas e concluindo com a perda do poder germinativo. Nesse sentido, o teste que apresenta maior sensibilidade na avaliação do vigor é aquele que permite identificar diferenças logo após a maturidade fisiológica das sementes.

Para o teste de condutividade elétrica apresentado na Tabela 2, verificou-se que foi significativa a interação entre os períodos de embebição e os lotes de sementes de pepino, podendo constatar que não foi possível realizar o ranqueamento de lotes. Com o aumento do tempo de embebição, houve maior lixiviação dos exsudatos da semente e todos os lotes apresentaram similaridade quanto à qualidade fisiológica.

**Tabela 2.** Resultados do teste de condutividade elétrica com embebição de 50 sementes em 50 mL de água deionizada, por períodos de 2, 4, 6, 8 e 24 horas de quatro lotes de sementes de pepino, cultivar Aodai.

Lotes	Períodos de embebição (h)				
	2	4	6	8	24
1	14,71 Aa	18,04B a	19,24BCa	20,11C a	24,04D a
2	15,46 Aa	18,43B a	19,37Ba	20,27B a	24,28C a
3	15,00 Aa	17,59B a	18,78Ba	19,51C a	23,25Ca
4	15,53 Aa	18,03Ba	19,48BCa	20,17C a	23,39D a
CV(%)	10,8				

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de probabilidade de 5%.

Contrariamente ao observado para as sementes de pepino, o teste de condutividade elétrica mostrou-se efetivo na estratificação dos lotes de sementes de couve-flor, ao ser utilizado o tempo de embebição de 24 horas (PAIVA et al., 2005).

Verificam-se semelhanças entre os lotes 1 e 3 e entre 3 e 4 para a estresse aos 3 dias (Tabela 3). O mesmo foi observado para avaliação aos 5 dias. No entanto, os lotes de sementes ao serem submetidos ao estresse por frio por sete dias observou-se que houve ranqueamento em dois níveis, ou seja, maior e menor potencial fisiológico. Pelos resultados obtidos é possível sugerir o estresse durante o período de três e cinco dias como os mais apropriados para a separação de lotes de sementes de pepino, pelo nível de vigor, com porcentagem de germinação semelhante. Além disso, o período de três dias possui a vantagem de passar menos tempo sob estresse, possibilitando maior rapidez na avaliação da qualidade e permitindo auxiliar na tomada decisões.

Ao analisar os resultados do teste de frio como mais um procedimento para avaliação do potencial fisiológico de sementes de algodão, Miguel et al (2001) puderam constar que a utilização do rolo de papel sem terra por três

dias de exposição a 10 °C pode ser empregado na avaliação do vigor de sementes de algodão. Resultados semelhantes foram obtidos por Rodo et al. (1998) pois o teste de frio mostrou-se capaz de diferenciar a qualidade dos lotes de sementes de tomate, apresentando alta correlação com a emergência das plântulas em campo. Por outro lado, em sementes de abóbora Casaroli et al. (2006) verificaram que a exposição ao frio por 3 dias foi suficiente para a separação dos lotes em níveis de vigor. Isso indica que o tempo de exposição pode variar de acordo com a espécie, por isso é importante à padronização da metodologia.

**Tabela 3.** Resultados do teste de frio conduzido em três períodos de estresse, em quatro lotes de sementes de pepino, cultivar Aodai.

Lotes	Períodos de estresse a 10 °C (dias)		
	3	5	7
1	80 abA	82 aA	68 aB
2	67 cA	69 bA	70 aA
3	84 aaA	77 aB	71 aB
4	75 bA	66 bB	60 bB
CV (%)		9,00	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de probabilidade de 5%.

Foram observados 14 gêneros de fungos nos quatro lotes (Tabela 4): *Aspergillus* spp., *Nigrospora* spp., *Ryzopus* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Phoma* spp., *Pestalotia* spp., *Chaetomium* spp., *Trichoderma* spp., *Epicoccums* spp., *Curvularia* spp., *Cladosporium* spp., *Rizoctonia* spp., os 7 últimos foram encontrados com baixa incidência. Em sementes de pepino, Nakada et al. (2010), também observaram a ocorrência dos gêneros *Aspergillus* spp., *Nigrospora* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Phoma* spp., *Epicoccums* spp. e *Cladosporium* spp.

Na sanidade das sementes dos diferentes lotes, de uma forma geral, é possível verificar-se incidências acentuadamente variáveis de espécies fúngicas, enquanto a incidência bacteriana dos lotes, em geral, não é elevada, variando de 0 a 5,7%. Os gêneros *Aspergillus* spp., *Ryzopus* spp. e *Penicillium* spp foram encontrados associados às sementes de todos os lotes. Os gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. são os principais fungos de

armazenamento encontrados nas sementes, podendo prejudicar a qualidade das sementes, favorecendo sua deterioração (FREITAS et al., 2000).

**Tabela 4.** Incidência de fungos *Aspergillus* spp.(Asp), *Penicillium* spp.(Pen), *Ryzopus* spp.(Riz), *Nigrospora* spp.(Nig), *Epicoccums* spp.(Epi), *Fusarium* spp.(Fus), *Phoma* spp.(Pho), *Alternaria* spp.(Alt), *Pestalotia* spp.(Pes), *Chaetomium* spp.(Cha), *Cladosporium* spp.(Cla), *Curvularia* spp.(Cur), *Trichoderma* spp.(Tri), *Rizoctonia* spp.(Riz), Bactéria (Bac), em quatro lotes de sementes de pepino, cultivar Aodai.

Lotes	Incidência de microrganismos (%)														
	Asp	Pen	Ryz	Nig	Epi	Fus	Pho	Alt	Pes	Cha	Cla	Cur	Tri	Riz	Bac
1	54 b	13 b	23 b	74 b	0 a	26 b	9,7 b	1,3 b	5,7 b	7 b	0 a	0 a	0 a	0 a	4 b
2	4,7 a	16 b	52 c	0 a	2,3 b	26 b	2 a	3,7 c	0 a	0 a	3 b	13 b	6 b	0 a	5,7 b
3	99 c	0,3 a	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	1,7 b	0 a
4	47 b	43 c	3 a	0 a	0 a	0 a	4,7 ab	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	2 b	0 a	0 a

Médias seguidas por mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de probabilidade de 5%.

Os resultados mostraram maior predominância do fungo *Aspergillus* spp., no lotes 1 (54%) e 3 (99%), entretanto, para os demais gêneros a incidência foi inexpressiva para o lote 3. Vale enfatizar que tais fungos comprometeram a qualidade fisiológica das sementes dos lotes 1 e 3 principalmente na emergência de plântulas, apesar de ainda terem sido considerados como os mais vigorosos.

O efeito prejudicial da incidência de fungos sobre a qualidade fisiológica de sementes de pepino vale destacar que o tratamento de sementes com fungicidas pode ser uma alternativa recomendável e necessária. Em relação à incidência bacteriana dos lotes, apesar de não elevada, variando de 0 a 5,7%, vale ressaltar que muitas vezes o surgimento de fitobactérias na lavoura, o controle em plantas infectadas só é possível com a irradiação da planta.

Os resultados obtidos nos testes de envelhecimento acelerado e de frio, com avaliação aos 5 e 7 dias, estão exatamente de acordo com os obtidos para a emergência das plântulas em substrato em casa de vegetação. Assim, as diferenças na qualidade dos lotes detectadas nos lotes 1 e 2 e 3, foram confirmadas nos dois testes, as quais exibem as melhores condições fisiológicas, obtendo os maiores percentuais de plântulas emergidas e o lote 4 os menores resultados. Essa correspondência entre esses testes de laboratório e a emergência das plântulas, em termos de classificação dos lotes quanto ao

vigor, é de ocorrência frequente ao se trabalhar com avaliação do vigor de sementes.

## CONCLUSÃO

Os testes de primeira contagem, envelhecimento acelerado e de frio, com estresse aos 3 e 5 dias, apresentam eficiência na separação de lotes de sementes de pepino em níveis de vigor.

A incidência dos fungos associados às sementes de pepino interfere na expressão da qualidade fisiológica dos lotes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNETT, H.L. e HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd ed. Minneapolis MN. **Burgess Publishing Company**. 1972.

BHERING, M.C.; DIAS, D.C.F.; GOMES, J.M.; BARROS, D.I. Métodos para avaliação do vigor de sementes de pepino. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 2, p.171-175, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**, 4. Ed. Jaboticabal: Funep, 2000.588p.

CASAROLI, D., GARCIA, D.C., MUNIZ, M.F.B & MENEZES, N.L. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de abóbora variedade Menina Brasileira. **Fitopatologia Brasileira**, v.31,p.158-163, 2006.

FREITAS, R.A.; DIAS, D.C.F. DOS S.; CECON, P. R.; REIS, M.S. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p.94-101, 2000.

GARCIA, D.C.D.C.; MENEZES, N.L.; MUNIZ, M.F.B.; CARLOS ANDRÉ BAHRY, C.A. O teste de frio sem solo em sementes de abóbora. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1923-1926, 2006.

JIANHUA, Z.; McDONALD, M.B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, v.25, n.1, p.123-131, 1997.

GOULART, L.S.; TILLMANN, M.A. Vigor de sementes de rúcula (*Eruca sativa* L.) pelo teste de deterioração controlada. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 29, n.2, p.179-186, 2007.

MARCOS FILHO, J. **Testes de vigor: importância e utilização**. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). Vigor de sementes: conceito e testes. Londrina: Abrates, 1999. cap.1, p.1-21.

MIGUEL, M.H.; CARVALHO, M.V.; BECKERT, O.P.; MARCOS FILHO, J. Teste de frio para avaliação do potencial fisiológico de sementes de algodão. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n.4, p.741-746, 2001.

NASCIMENTO, W.M.; PEREIRA, R.S. Testes para avaliação do potencial fisiológico de sementes de alface e sua relação com a germinação sob temperaturas adversas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p.156-160, 2007.

NAKADA, P.G.; OLIVEIRA, J.A.; MELO, L.C. DE.; SILVA, A.A. DA.; SILVA, P. A. DA.; PERINA, F.J. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.22, n.3, p. 42-51, 2010.

PAIVA, A.S.; LOPES, M.M.; TESSER, S.M.; PANOBIANCO, M.; VIEIRA, R.D. Avaliação do potencial fisiológico de sementes de couve-flor. **Científica**, Jaboticabal, v.33, n.1, p.103-105, 2005.

RAMOS, N.P.; FLOR, E.P.O.; MENDONÇA, E.E.F.; MINAMI, K. Envelhecimento acelerado em sementes de rúcula (*Eruca sativa* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.26, n.1, p.98-103, 2004.

RODO AB; PANOBIANCO M; MARCOSFILHO J. Metodologia alternativa do teste de envelhecimento acelerado para sementes de cenoura. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 289-292. 2000.

## CAPÍTULO VI

### ROUTES OF SEED INFECTION OF *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IN *Brassica oleracea*\*

#### ABSTRACT

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) is the causal agent of black rot of brassicas the most important disease, affecting plants in any development stage and provoking reduction in quantity and quality of the yield. A polytunnel greenhouse experiment was conducted at two locations in the Netherlands to study dissemination routes of Xcc in cauliflower plants (*Brassica oleracea*), that can result in seed infection. In Rilland, in the South-West of the Netherlands, plants were cultivated under conventional conditions and in Voorst, in the East; plants were grown under organic conditions. Plants were spray-inoculated before cabbage head formation with two Xcc strains (Xcc 3076 and Xcc 3078) on the left and right side respectively and non-inoculated plants in the centre. Samples were analysed with dilution plating on a semi-selective medium and a selection of the Xcc-typical colonies were characterized with BOX-PCR. Part of the samples were analysed with Xcc-specific TaqMan assay. It is concluded that cultivation of cauliflower plants under organic conditions resulted in a high incidences of black rot and a high seed infection incidence. In the experiment at Rilland incidences of black rot were low and seed infections were not detected. The incidence of seed infections in the plot inoculated with Xcc strain 3076 was higher than the incidences in the two other plots. Identification of Xcc isolates by their DNA fingerprints revealed that Xcc strain 3076 was spread to the other plots of the experiment. However, Xcc strain 3078 was recovered only from plants inoculated with this strain. The presence of Xcc in both peduncles and seeds in the majority of the plants inoculated with Xcc strain 3076 suggests that in these plants seed became infected via translocation of Xcc from leaves, via stems, peduncles and pedicels into the seeds. Probability pollinating bees were not involved in the transmission of Xcc.

**Keywords:** diseases, transmission, insects, vegetables, detection, BOX PCR and TaqMan.

---

\*Desenvolvido durante o doutorado sanduíche na Universidade de Wageningen

## VIAS DE INFECÇÃO DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* EM SEMENTES DE *Brassica oleracea*

### RESUMO

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) é o agente causal da podridão negra das brassicas, é considerada a doença mais importante porque afeta as plantas em todos os estágios de desenvolvimento, provocando a redução na qualidade e quantidade da produção. Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, em dois locais da Holanda, com objetivo de estudar a via de disseminação de Xcc em plantas de couve flor (*Brassica oleracea*), e se a disseminação pode resultar na infecção de sementes. O primeiro experimento foi conduzido em sistema convencional em Rilland, região sudoeste. Um segundo experimento foi conduzido em sistema orgânico em Voorst, região leste do país. Antes da formação da cabeça, as plantas foram inoculadas do lado esquerdo e direito respectivamente e as plantas do centro não foram inoculadas. As amostras foram analisadas por diluição e plaqueamento em meio semi-seletivo e as colônias típicas de Xcc foram analisadas e caracterizadas por BOX-PCR. Parte das amostras foram analisadas por TaqMan. Conclui-se que o cultivo de couve flor em condições orgânicas resultou em alta incidencia de podridão negra e alta incidência de infecção de sementes. Em Rilland a incidência de podridão negra foi baixa e não foram detectadas sementes infectadas. A incidência de sementes infectadas na parcela inoculada com o isolado 3076 foi maior do que nas outras duas parcelas. A identificação de isolados de Xcc pelos seus DNA fingerprinting revelou que o isolado 3076 foi disseminado para outras duas parcelas do experimento. Entretanto, o isolado 3078 foi detectado apenas em plantas inoculadas com este isolado. A presença de Xcc na maioria dos pedúnculos e sementes sugere que as sementes tornaram-se infectadas por translocação de Xcc pela folha, caule, pedúnculos e pedicelos para dentro da semente. Provavelmente as abelhas não estão envolvidas na transmissão de Xcc.

**Palavras-chave:** doenças, transmissão, insetos, hortaliças, detecção, BOX PCR e TaqMan.

### INTRODUCTION

Black rot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc) is probably the most important disease in crucifers and it occurs in all continents (Williams, 1980; Qian et al., 2005). Plants belonging to this family are susceptible to this disease in all developmental stages (Mariano et al, 2001) and the infection may move into the vascular tissue of the petiole and spread up or down the stem of the plant and into roots. The presence of black

veins in yellow lesions along leaf margins is diagnostic of black rot (Hildebrand, 1994).

The main way of spreading the pathogen is through contaminated seed and plant-seedlings (Rodrigues Neto, 1995). In particular Xcc will rapidly spread in seedbeds from infected seedlings (Köhl and Van der Wolf, 2005). In addition, the dispersal of the bacteria can be in wind-driven droplets (aerosols), in droplets of rain splash, by mechanical injury and dissemination by insect also has been demonstrated (Shelton and Hunter, 1985; Van der Wolf and Van der Zouwen, 2010). One of the most effective methods of controlling the disease is the use of pathogen-free seeds to reduce pathogen dissemination. For the production of pathogen-free seeds and for ecological research to determine control measures in the cultivation areas, the availability of effective methods for pathogen detection in plants and seeds is important.

Some insects and pollinators can serve as vectors for pathogens and in this way play an important role in the transmission of several plant pathogens including bacteria (Alexander and Antonovics 1988; Hildebrand et al., 2000; Zandjanakoutachin et al., 2007; Roy 1994;). In some bacterial diseases, an insect vector is required to transfer the pathogen from an infected seedling to other plants (Pataki & Ikin, 2003; Nunes et al., 2007). Van der Wolf and Van der Zouwen (2010) found that the use of Xcc contaminated flies for pollination resulted in internal seed infections. In addition to pollen, honey bees can transfer fungal spores and bacteria among flowers of several plant species (Batra et al., 1983; Harrison et al., 1980; Sandhu & Waraich, 1985). No information is available about transmission of Xcc to flowers by honey bees and it is not known if such transmission can result in internal seed infections and for developing management practices a clear understanding of these topics is important.

This present work is part of an extensive research on the possible role of honey bees in the transmission of Xcc in cauliflower seed production crops. This study aims at establishing the routes in which seeds produced by inoculated cauliflower plants become infected with Xcc, if by vascular transport of the bacterium, via stems and peduncles or by flower infection of bee transmitted bacterial cells.

## MATERIAL AND METHODS

### Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. Xcc strains 3076 and 3078 were used in all assays as reference strains. Isolates were initially considered to be *X. campestris* on the basis of colony characteristics on yeast extract- dextrose- calcium carbonate (YDC) medium.

Table 1. Xcc strains used for Taq-Man and BOX-PCR.

Species	IPO nr. <sup>1</sup>	Other collection nr.	Country of origin
<i>X.c. pv. carotae</i>	2247	P5577	The Netherlands
<i>X.c. pv. campestris</i>	3076	364	<i>Brassica oleracea</i> , Billing
<i>X.c. pv. campestris</i>	3078	PHW824-1	Brassica, Wisconsin
<i>X.c. pv. campestris</i>	3357	P5002	seed, USA California
<i>X.c. pv. campestris</i>	3358	P5106	seed, Italy
<i>X.c. pv. campestris</i>	3359	P5145	seed, Tasmania
<i>X.c. pv. campestris</i>	3360	P5164	seed, Australia
<i>X.c. pv. campestris</i>	3361	P5183	seed, New Zealand
<i>X.c. pv. campestris</i>	3362	Xcc3	Collection D. Morrison phw331
<i>X.c. pv. campestris</i>	3363	Xcc4	Collection D. Morrison A4 USA
<i>X.c. pv. campestris</i>	3364	BR1 race 0	Broccoli, Russia
<i>X.c. pv. campestris</i>	3365	M 1/3/98 race 1	Pointed Cabbage, Germany
<i>X.c. pv. campestris</i>	3366	M2/198 race 4	Red Cabbage, Germany
<i>X.c. pv. campestris</i>	3367	VN1 race 3	Cabbage, Russia
<i>X.c. pv. campestris</i>	3368	B-172	Broccoli, Chili
<i>X.c. pv. campestris</i>	3369	B-441	Broccoli, Mexico
<i>X.c. pv. campestris</i>	3370	2017	Brassica sp., Malaysia
<i>X.c. pv. campestris</i>	3371	2053	<i>Brassica oleracea</i> , South Africa
<i>X.c. pv. campestris</i>	3372	3044	Brassica sp. France
<i>X.c. pv. campestris</i>	3373	3125	Cabbage, Belgium
<i>X.c. pv. campestris</i>	3374	3178	Cabbage, Netherlands
<i>X.c. pv. campestris</i>	3375	LMG568	<i>Brassica oleracea</i> , UK
<i>X.c. pv. campestris</i>	3376	B-525	seed, Japan
<i>Dickeya</i> sp. <sup>2</sup>	3499	PD5732	Unknown

<sup>1</sup> Bacterial collection of Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.

<sup>2</sup> Formerly identified as *Erwinia chrysanthemi*.

For the preparation of inoculum for polytunnel greenhouse experiments the strains Xcc 3076 and 3078 were transferred to TSA (Tryptone Soya Agar; Oxoid) and incubated O/N at 28°C before use. Re-isolation of these strains Xcc 3076 and 3078 from plant tissues was done on mFS+ agar medium, which is mFS agar medium (Roberts and Koenraadt, 2007) with an enhanced concentration of Cephalexin of 100 µl/ml. Plates were incubated 5 – 7 d at 28 °C.

### **Locations and experimental set up**

Polytunnel experiments were conducted in the 2011 growing season in two different areas of the Netherlands, one of them was conducted in Rilland in the southwest and the other in Voorst in the middle of the country. Cauliflower seedlings, variety Vinson, produced from Xcc-free seeds were planted in the plastic tunnel greenhouses. In Rilland the tunnel greenhouse was 13 m long and 8 m wide. The 3 plots, each consisting of a long bed with 4 rows of 23 plants, were situated lengthwise of the tunnel. The plots at the sides of the tunnel were inoculated with strain 3076 or 3078. The plot in the middle of the tunnel was not inoculated. In Voorst the tunnel greenhouse was 42 m long and 5.5 m wide. The plants were planted in 4 long rows of 24 plants. Sectioning was done transversely in 3 plots of 96 plants. The plots at the front and at the back of the tunnel were inoculated with strains 3076 or 3078 and the plot in the middle of the tunnel was not inoculated.

At both locations, the crops were watered by drip irrigation. During flowering beehives were placed in the tunnel greenhouses for pollination. In Rilland honey bees were presents between day 68 and until harvest day. After transplanting, in Voorst it was from day 68 until harvest day. The plots at Voorst and Rilland were harvested 152 and 154 days after transplanting. At harvest the plants of Voorst were senescent and in Rilland the plants carried inflorescences in various stages of development between flowering and senescence.

### **Inoculation**

The cauliflower plants at Rilland were spray-inoculated 14 days after transplanting. Plants at Voorst were inoculated 8 days later. At both locations,

plants had 8 – 12 true leaves and at the time of inoculation few (2 – 3%) plants had a small cauliflower head. Inoculum of Xcc was prepared from fresh cultures on TSA (tryptone, soya and agar) plates incubated at 28 °C for 24 h. A bacterial suspension was used with an OD<sub>600</sub> of 0.1, equivalent to 1.5x10<sup>8</sup> bacterial cells/ml<sup>1</sup> was sprayed on the leaves of cauliflower plants using a compressed air sprayer. On average each plant was inoculated with 20 ml suspension and to facilitate penetration of bacterial cells the wax layer of 3 leaves per plant was damaged by rubbing the lamina with latex gloves at sites with droplets of inoculum. The non-inoculated plants were sprayed with water.

The cauliflower heads were covered with a plastic bag before spraying inoculation to prevent early contamination of peduncles with Xcc. The plastic bags were removed after inoculation and during spray-inoculation adjacent plots were protected. After spray-inoculation at Rilland only a few plants developed symptoms. Therefore plants were inoculated 82 days after transplanting for a second time. Two leaves per plant were inoculated by injection of a suspension (1.5x10<sup>8</sup> cells/ml) of the appropriate Xcc strain into the midrib close to the petiole.

### **Harvesting operation**

The harvest was carried out by hand. The peduncles of each individual plant were cut off at the base and packed in a tissue bag. In the laboratory, the inflorescence axes with siliques were removed from the peduncles and air dried in their tissue bags. The peduncles of the individual plants were stored in plastic bags in a freeze at – 20 °C. The dried siliques were threshed and the seeds separated from other plant materials by hand. Latex gloves were used during handlings. At any time, contamination was avoided by changing gloves between samples. The cleaned seeds of the individual plants were stored at room temperature in paper bags.

### **Analysis of seed and peduncle samples**

The seed samples were individually weighed and placed in extraction bags (Bioreba). A volume of hot water (52 °C) equivalent to the sample weight was poured into the bags with seeds, then the bags were immersed in a 52 °C water bath for 10 minutes, the hot water was immediately replaced by the same

volume of sterile tap water at room temperature to cool down the samples for 5 minutes. After cooling the seeds the water was poured off. The seeds were soaked in PBST buffer (8 g/l NaCl, 1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 2 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, with 10% of Tween 20) in a proportion of 10 ml buffer per 1000 seeds. The peduncle samples were not treated with hot water, but directly soaked in a volume of PBST buffer equivalent to twice the sample weight. Seed and peduncle samples were crushed thoroughly in the extraction bags using a hammer. A total of 274 samples were processed in the Rilland and 162 in the Voorst experiment. The seed and peduncle extracts were sampled for molecular analysis and for plating on FS medium. The sub samples for molecular analysis were deep-freezed, whereas, the sub samples for plating were processed immediately after extraction.

### **Detection of Xcc by plating**

An aliquot of each undiluted extract (0.1 ml) was spread on two plates of FS medium. Pure cultures of the two reference strains (3076, 3078) were also plated on the modified FS medium and on YDC medium (yeast extract-dextrose-CaCO<sub>3</sub>) as a positive control. The plates were incubated at 27 °C for seven days. The plates were visually examined for the presence of colonies showing morphology similar to the reference strains. Suspected colonies (convex with zones of starch hydrolysis around them) as well as the reference strains grown on FS medium were transferred to YDC and incubated for 5-7 days at 27 °C. The morphology of the colonies of the isolates was once again compared with the reference strains. If possible, from each seed or peduncle extract five colonies suspected to be Xcc were selected for further analysis by molecular techniques for verification for genetic similarity to Xcc strains 3076 and 3078.

### **DNA analysis of bacterial strains**

For TaqMan PCR a thick suspension of bacterial growth on YDC plates were prepared in 1 ml of MQ water. DNA was extracted by simple lysis of cells (95 °C for 5 min). The lysates were centrifuged at 7300 rpm for 3 min. Total DNA for BOX PCR was extracted using QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's recommendations. The DNA of the strains 3357 till

3376 was isolated with the magnetic DNA Purification System for Food (Promega), for the strains 3076 and 3078 this was done with the Plant Mini Kit (Qiagen). The final volume of DNA sample was 2 ml per strain.

### PicoGreen fluorescence measurements

The concentration of DNA present in each sample was measured using the PicoGreen fluorescence method. Fresh PicoGreen working stock was made by diluting the commercial stock solution obtained from Invitrogen Molecular Probes in 1 x TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) at a ratio of 1:200. One hundred  $\mu$ l of sample was pipetted into 96-well flat bottom black polystyrol microplates (Greiner Bio-one, Germany). One hundred  $\mu$ l of PicoGreen working stock was added to each well, and the plates were incubated in the dark at room temperature for 2 to 5 min. The fluorescence of the samples was measured with a Tecan InfiniteTM M200 plate reader (Tecan, Switzerland) with fifteen minutes after excitation at 485 nm and peak emission at 530 nm.

### TaqMan real time PCR assay conditions

Primers and probe concentrations were optimized according to the manufacturer's recommendations. Representative Xcc strains were furthermore subjected to TaqMan, using forward primer 5'-GTGCATAGGCCACGATGT-3' and reverse 5' CGGATGCAGAGGGTCTTA-3' and probe 5'-CAAGCGATGTACTGCAGGCCGTG-3'.

TaqMan PCRs was carried out in a 25  $\mu$ l volume using 96- well reaction plate which was composed of 12.5 $\mu$ l Premix Ex Taq (Takara), ROX II 0.5  $\mu$ l, Probe Xcc (2,5  $\mu$ M) 0.8  $\mu$ l, 0.8 $\mu$ l each of forward and reverse primers (100  $\mu$ M), 7.6  $\mu$ l MQH<sub>2</sub>O, and 2  $\mu$ l DNA template. The reaction was carried out using the following reaction cycles: two initials of which a first one of 2 min at 50 °C and a second one of 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles, each consisting of 10 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Amplification was performed with a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

### **BOX primer and BOX-PCR reactions**

BOX PCR was done as described by Louws *et al.* (1994) with few modifications. Xc strains were subjected to BOX-PCR genomic fingerprinting using BOX primer 5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'. All PCR reactions were performed in a total volume of 25 µl using 0.5 µl DNA (25 ng/ µl), 2.5 µl 10 x stoffel buffer, 2.75 µl MQ water, 15 µl (1 mM each) dNTP, 3.75 MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0.25 µl of BOX primer 261 (100 µM) and 0.25 µl stoffel *Taq*. Cycling conditions were: an initial of 7 min at 95 °C, 29 cycles, each consisting of 30 s at 90 °C, 1 min at 95 °C, 1 min at 52 °C, 8 min at 65 °C, followed by a final of 16 min at 65 °C. After completing the final cycle, the PCR products were stored at 10 °C. PCR products were detected by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel in 0.5 x TBE buffer which was stained with gel red and the gel was run at 160 V for 5 to 6 h. A 1-kb DNA ladder was included in each electrophoresis gel. The gel was visualized and photographed with a transiluminator (Herolab, Germany). Reference strains of *X. campestris* pv. *campestris* (3076, 3078) were included in the comparison of BOX PCR fingerprinting to explore the possibility to distinguish these strains by their banding patterns and strains of *X. carotae* and *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*) were used as out-groups.

The gel image was further analyzed using GelCompar II version 5.0 (Applied Maths). The similarities among profiles were calculated based on Pearson's correlation coefficient and the clustering was performed with the UPGMA algorithm implemented in GelCompar II. Each fragment was considered as a separate marker in pairwise comparisons.

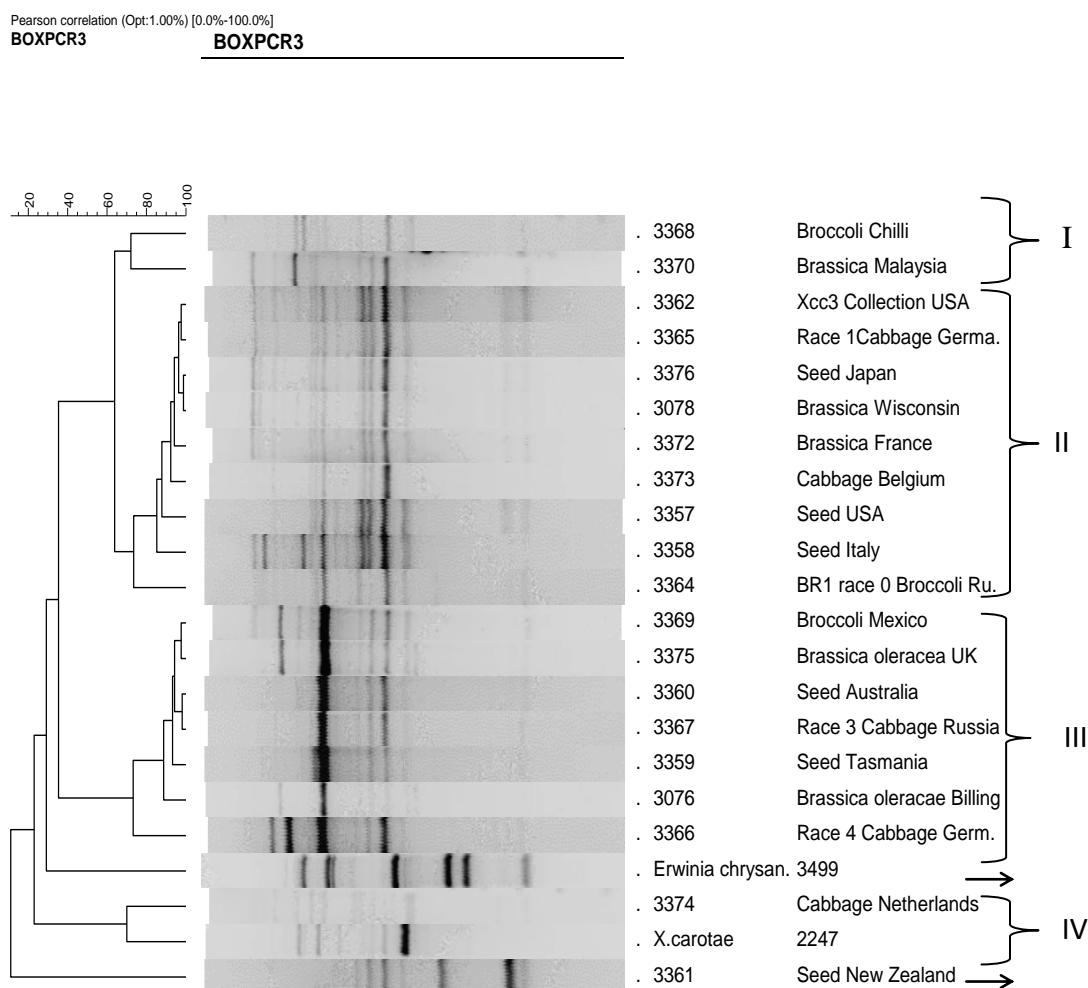
## **RESULTS**

### **Growth on FS medium**

On FS medium colonies of the Xcc strains 3076 and 3078 were mucoid with zones of starch hydrolysis formed around them. However, colonies of strain 3076 appeared within 5 days of incubation, whereas colonies of strain 3078 needed an incubation period of 7 days to become visible.

**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis of BOX PCR fingerprinting patterns from genomic DNA of *Xanthomonas* strains and *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*), strain obtained from bacterial collection. Lane M, marker is a 1 kb-ladder molecular weight. Lane 1-22, *X. campestris* pv. *campestris* strains Xcc3357 (1), Xcc3358(2), Xcc3359(3), Xcc3360(4), Xcc3361(5), Xcc3362(6), Xcc3363(7), Xcc3364(8), Xcc3365(9), Xcc3366(10), Xcc3367(11), Xcc3368(12), Xcc3369(13), Xcc3370(14), Xcc3371(15), Xcc3372(16), Xcc3373(17), Xcc3374(18), Xcc3375(19), Xcc3376(20), Xcc3076 (reference)(21), Xcc3078 (reference)(22), lane 23, *X. carotae* strain 2247, lane 24, *Dickeya* sp. strain 3499, lane 25, Miliq water (negative control).

A dendrogram displaying the distance between the 24 strains is shown in figure 2. The BOX PCR fingerprinting profiles clearly distinguished the majority of Xcc strains from *Dickeya* sp. and *X. carotae* which were used as outgroup strains. The Xcc strains 3076 and 3078, used in this study for the inoculation of cauliflower plants in the transmission experiments, were grouped in two different clusters. This demonstrates that the DNA fingerprint of Xcc strain 3076, which was assigned to cluster III, can be distinguished from that of Xcc strain 3078 of cluster II.



**Figure 2.** Dendrogram showing genetic similarity of 21 *Xanthomonas* strains together with one *Dickeya* sp. strain.

The relationships between the Xcc strains based on cluster analysis of the BOX PCR generated are presented in the dendrogram of figure 2 (and accordingly denominated in Table 1). Three clusters of Xcc strains were distinguished, each with an internal similarity of at least 70%. Cluster I comprised of two strains, one obtained from Broccoli grown in Chilli and the other from Brassica in Malaysia. Nine strains were grouped together in cluster II. Cluster III included seven isolates with at least 75% similarity. A separated cluster (IV) was formed by strain Xcc 3374 from cabbage Netherlands and *Xanthomonas carotae* (2247), although the two strains in this group were classified in different genera, their BOX PCR fingerprinting profiles had a similarity of approximately 65%. The strain of *Dickeya* was used as an out-group and as was expected that strain did not group into any Xcc cluster. Xcc strain 3361 collected from seed from New Zealand could not be considered to belong to these delineated groups and therefore also considered as out-group strain. No obvious relationship was observed between the different Xcc strains contained in each cluster, and their geographic origin.

#### **Incidences of Xcc infections in seeds and peduncles**

In the experiment at Rilland the majority of the plants were still vigorously growing at harvest time. The plants had peduncles with ripe siliques as well as peduncles with flowers and green siliques. Each plot yielded at least 90 plants with ripe seeds (Table 2). During harvest of the Rilland experiment few plants showed external and/or internal symptoms of black rot. In contrast to the experiment at Rilland, at Voorst almost all plants inoculated with Xcc rapidly developed symptoms of black rot. In addition to black rot, other not-identified disease and pest problems affected the cauliflower plants of the experiment at Voorst. Because of this only 64, 47 and 69 out of the 96 plants per plot were harvested from the plots inoculated with Xcc strain 3076, Xcc strain 3078 and the non-inoculated plot, respectively.

The presence of Xcc in the seed and peduncle samples obtained from both experiments was assessed by plating on FS medium. All seed samples from the experiment at Rilland were negative in the plating assay (Table 2).

Because of the negative seed samples from Rilland, of this experiment only peduncles from 20 plants inoculated with Xcc strain 3076 and 20 plants inoculated with Xcc strain 3078 were processed. Of these peduncles 75% and 35% were Xcc-positive. With the seed samples from the experiment at Voorst it was different. Especially in seeds from plants inoculated with Xcc strain 3076 the incidence of the pathogen was high. Percentages of seed samples positive in the plating assay for plants inoculated with Xcc strain 3076, Xcc strain 3078 and the non-inoculated plants were 65.6, 2.1 and 8.7, respectively. For the corresponding peduncle samples percentages were 89.1, 24.6 and 17.

**Table 2.** Number of peduncles and seeds infected with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* detected in dilution plating.

Inoculum	Plant part	Rilland experiment		Voorst experiment	
		Nº. of plants	% positive	Nº. of plants	% positive
Xcc 3076	Seeds	90	0.0	64	65.6
	Peduncles	20	75.0	64	89.1
None	Seeds	91	0.0	69	8.7
	Peduncles	0	0.0	69	24.6
Xcc 3078	Seeds	93	0.0	47	2.1
	Peduncles	20	35.0	47	17.0

In addition to plating, the presence of Xcc infections in seeds from plants of the experiment at Voorst was also assessed in Xcc specific TaqMan Real-Time PCR. In the TaqMan assays more positive samples were found than by plating on FS medium (Table 3). In the TaqMan assay the incidences of Xcc infections for plants inoculated with Xcc strain 3076, Xcc strain 3078 and the non-inoculated plants were 85.9%, 38.3% and 21.7%, respectively. All seed samples, except one, from the plants inoculated with Xcc strain 3076, which were positive in the plating assay were also positive in the TaqMan assay. The exception which was positive on FS medium, but negative in TaqMan Real-Time PCR, had a CT-value of 35.3. This sample was scored positive in the plating assay because 1 Xcc colony had developed on only one of the two plates on which suspension was spread out. All seed samples from the plants inoculated with Xcc strain 3078 and those from and the non-inoculated plants

which were positive in the plating assay were also positive in the TaqMan assay. Of the non-inoculated plants 23.2% of the seed samples had CT-values within the range of the CT-values of the seed samples from the plants inoculated with Xcc strain 3076. For seed samples from the plants inoculated with Xcc strain 3078 this was 40.4%.

**Table 3.** Incidences of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* infections in seeds of the experiment in Voorst assessed by plating on FS medium and by TaqMan Real-Time PCR.

	Inoculum		
	Xcc 3076	None	Xcc 3078
Number of seed samples	64	69	47
Percentage samples positive in plating assay <sup>1</sup>	65.6	8.7	2.1
Percentage samples positive in TaqMan assay <sup>2</sup>	85.9	21.7	38.3
Percentage samples positive in both assays	64.1	8.7	2.1
Percentage samples with CT-values of 21.8 - 35.3 <sup>3</sup>	65.6	23.2	40.4

<sup>1</sup> Seed samples were considered positive on FS medium if one or more colonies had developed on one or both duplicate plating series.

<sup>2</sup> Seed samples with CT values <35 were considered positive in the TaqMan assay.

<sup>3</sup> All seed samples from plants inoculated with Xcc strain 3076 which were positive in the FS+ plating assay had CT values between 21.8 and 35.3.

### Identification of Xcc isolates obtained from seeds and peduncles

From 21 out of the 22 peduncle samples of the experiment at Rilland which were positive in the plating assay, one or more isolates of Xcc were obtained. Of each peduncle sample with successful isolations one Xcc isolate was characterized by BOX-PCR DNA fingerprinting as described above and checked for their genetic similarity to Xcc strains 3076 and 3078. Of these 21 isolates 15 were obtained from peduncles of plants inoculated with Xcc strain 3076 and 6 from peduncles of plants inoculated with Xcc strain 3078 (Table 4).

The relationships between the Xcc strains 3076 and 3078 and the Xcc isolates from the plants of the Rilland tunnel experiment are presented in figure 3 e 4. The cluster analysis assigned 13 of the isolates from plants inoculated with Xcc strain 3076 and Xcc strain 3076 itself to one of the two subgroups (A and B) of group I with similarity values derived from the Pearson correlation coefficient of 72.9% and 82.6%, respectively. The isolates 3078 (90) and 3078

(84), obtained from the plants 90 and 84 of the plot which had been inoculated with Xcc strain 3078, were placed in group II.

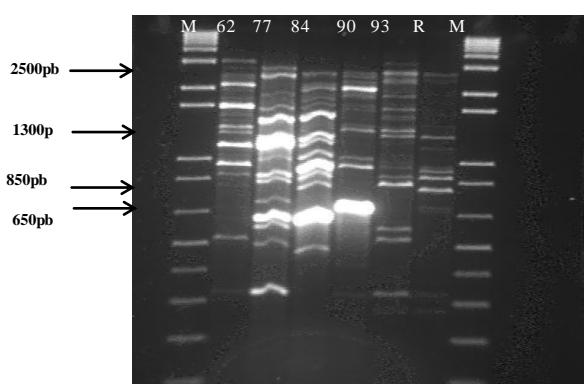
**Table 4.** Numbers of peduncles of the experiment at Rilland found positive by plating on FS medium, with successful isolations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and of which an isolate was subjected to BOX-PCR analysis, and numbers of isolates with DNA banding pattern similar to that of Xcc strain 3076 or Xcc strain 3078.

	Inoculum	
	Xcc 3076	Xcc 3078
Number of peduncles <sup>1</sup> positive in plating assay	15	7
Number of peduncles with successful isolations	15	6
Number of peduncles of which an isolate was subjected to BOX-PCR analysis	15	6
Number of isolates with Xcc 3076 pattern	13	0
Number of isolates with Xcc 3078 pattern	0	0
Number of isolates with other pattern	2	6

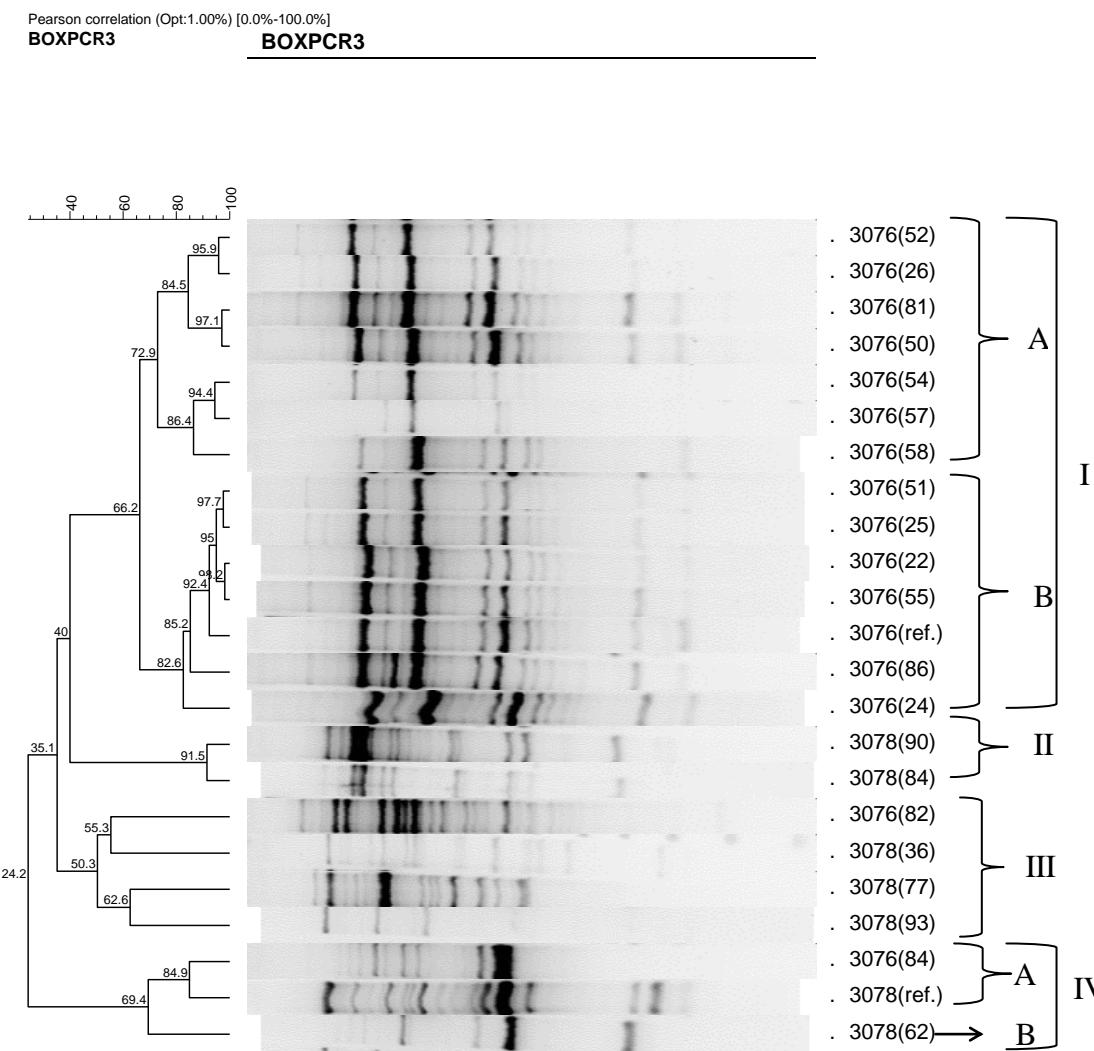
<sup>1</sup> Only peduncles of 20 plants of the plot inoculated with Xcc strain 3076 and 20 plants of the plot inoculated with Xcc strain 3078 were analyzed in the plating assay.

The DNA fingerprints of the two isolates included in group II, with a mutual similarity of 91.5%, differed considerably from that of Xcc strain 3078. The isolates 3076 (82), 3078 (36), 3078 (77), 3078 (93) were clustered in group III, however, the isolates of this group had low mutual similarities of 50% to 60% and their DNA fingerprints also differed from that of Xcc strain 3078. The isolates 3076 (84), 3078 (62) and Xcc strain 3078 were assigned to group IV. The mutual similarity of the fingerprinting patterns within this group was 69,4%.

The BOX-PCR analysis of Xcc isolates from Rilland reveals that Xcc strain 3076 was recovered from 13 plants inoculated with this strain. Xcc strain 3078 was not recovered from any plant (Table 4).



**Figure 3.** BOX-PCR fingerprinting patterns obtained from references strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and peduncles and seeds (from Rilland). Lane 1 (sample 62); lane 2 (sample 77); lane 3 (sample 84); lane 4 (sample 90); lane 5(sample 93); lane R (3078- reference strain). M- DNA molecular size marker (1Kb ladder).

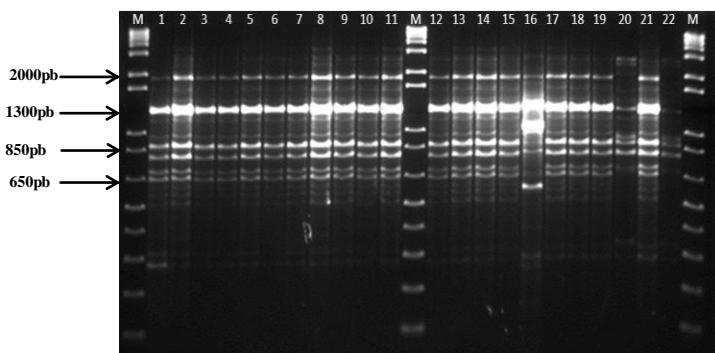


**Figure 4.** Dendrogram showing genetic similarities of *Xanthomonas* isolates obtained from peduncles of plants of the Rilland experiment. The genomic fingerprints were generated by PCR amplification with BOX primer set. The information in the column right of the BOX-PCR DNA fingerprints refers to the origin of the isolates: the Xcc strain (3076 or 3078) used to inoculate the plant .

#### **BOX-PCR fingerprints of isolates of *Xanthomas campestris* pv. *campestris* obtained from cauliflower samples from Voorst tunnel experiments.**

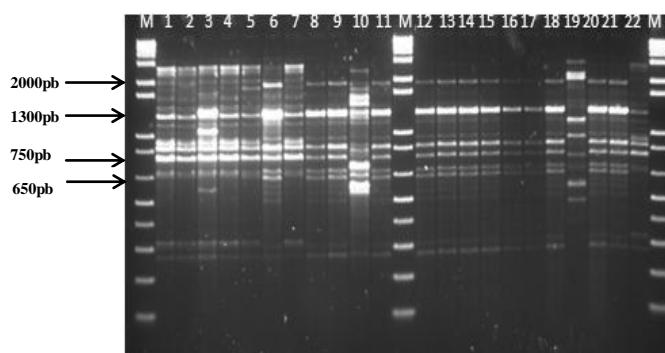
Representative genomic fingerprints are shown in Fig. 5 and the corresponding dendrogram is shown in Fig. 8. Identical BOX PCR fingerprinting

profiles among the Xcc strains were obtained for the most of the samples material. For example, no notable difference was observed between the strains lanes 1 to 11 and 12 to 15 and 17 to 19 and between the reference strain 3076 (lane 21) (Fig.5).



**Figure 5.** BOX-PCR fingerprinting patterns obtained from references strains of *Xanthomonas campetris* pv. *campestris* and peduncles and seeds. Lane 1, seed 3076; lane from 2 to 11, peduncle (water); lane from 12 to 19, peduncle (water); lane 20, peduncle 3078; lane 21, 3076 (reference strain); lane 22, 3078 (reference strain). M; 1Kb- ladder molecular weight size marker.

The common pattern of amplified bands indicated the close genetic relationship to each other. Most of the bands were present in all tested strains, but there were differences in the intensity of some amplified fragments, especially to the PCR fingerprinting of the Xcc isolates with the xcc reference 3078. The banding patterns of the Xcc strain collected from peduncle of a plant inoculated with Xcc 3078 (lane 20) were highly similar to banding pattern reference strain 3078. The strain 3076 has a banding pattern which is different from that of strain 3078. Therefore, it is possible to distinguish the two strains in BOX PCR.

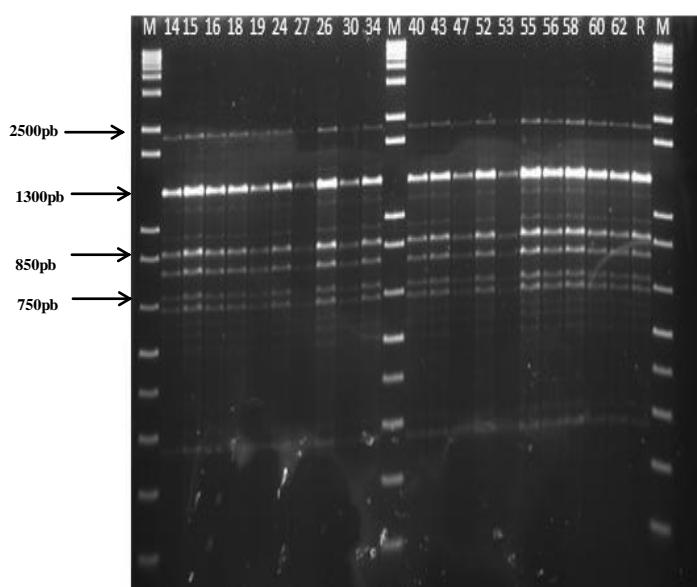


**Figure 6.** BOX-PCR fingerprinting patterns obtained from references strains of *Xanthomonas campetris* pv. *campestris* and peduncles and seeds. Lane from 1 to 7, peduncle 3078; lane from 8 to 11, peduncle (water); lane 12 and 13, seed water; lane from 14 to 20, seed 3076; lane 21, 3076 (reference strain); lane 22, 3078 (reference strain). M- DNA molecular size marker (1Kb ladder).

The Box-PCR amplified bacterial genomic fragments were resolved on agarose gel, resulting in fingerprinting patterns with multiple bands of distinct intensities (Figure 6), some of these bands were weak. The Box-PCR patterns of Xcc strains from peduncles and seeds derived from Xcc inoculated plants were identical to the reference strain Xcc 3076 and, similarly, the isolates from Xcc inoculated plants were similar to reference strain 3078 but different from Xcc line (19) (Fig. 6).

Two isolates from seed and derived from non-inoculated plants were analyzed and the Box-PCR patterns were identical to Xcc 3076, besides, four isolates from peduncles obtained from non-inoculated plants were also analyzed and at least three of the four isolate showed very similar fingerprinting profile of reference strain (3076) these results are indicating *Xanthomonas campetris* pv. *campestris* transmission during the poly tunnel experiment.

Genomic finngerprints generated after BOX-PCR (Fig 7) were identical for all *Xanthomonas* strains including the reference strain 3076. They exhibited banding patterns with highest similarity to banding patterns to each other.



**Figure 7.** BOX-PCR fingerprinting patterns obtained from seeds (3076) obtained in Voorst and references strains of *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. Lane from 1 to 10 (14 to 34); lane from 8 to 17, (from 40 to 62); lane R 3076 (reference strain), M; DNA molecular size marker (1Kb ladder).

The numbers of seed and peduncle samples of the tunnel experiment at Voorst which were positive in the plating assay are presented in table 5. Except one seed sample of a plant inoculated with Xcc strain 3076, all samples yielded one or more isolates of Xcc.

**Table 5.** Numbers of samples of the tunnel experiment at Voorst found positive by plating on FS medium, with successful isolations of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and of which an isolate was subjected to BOX-PCR analysis, and numbers of isolates with DNA banding pattern similar to that of Xcc strain 3076 or Xcc strain 3078.

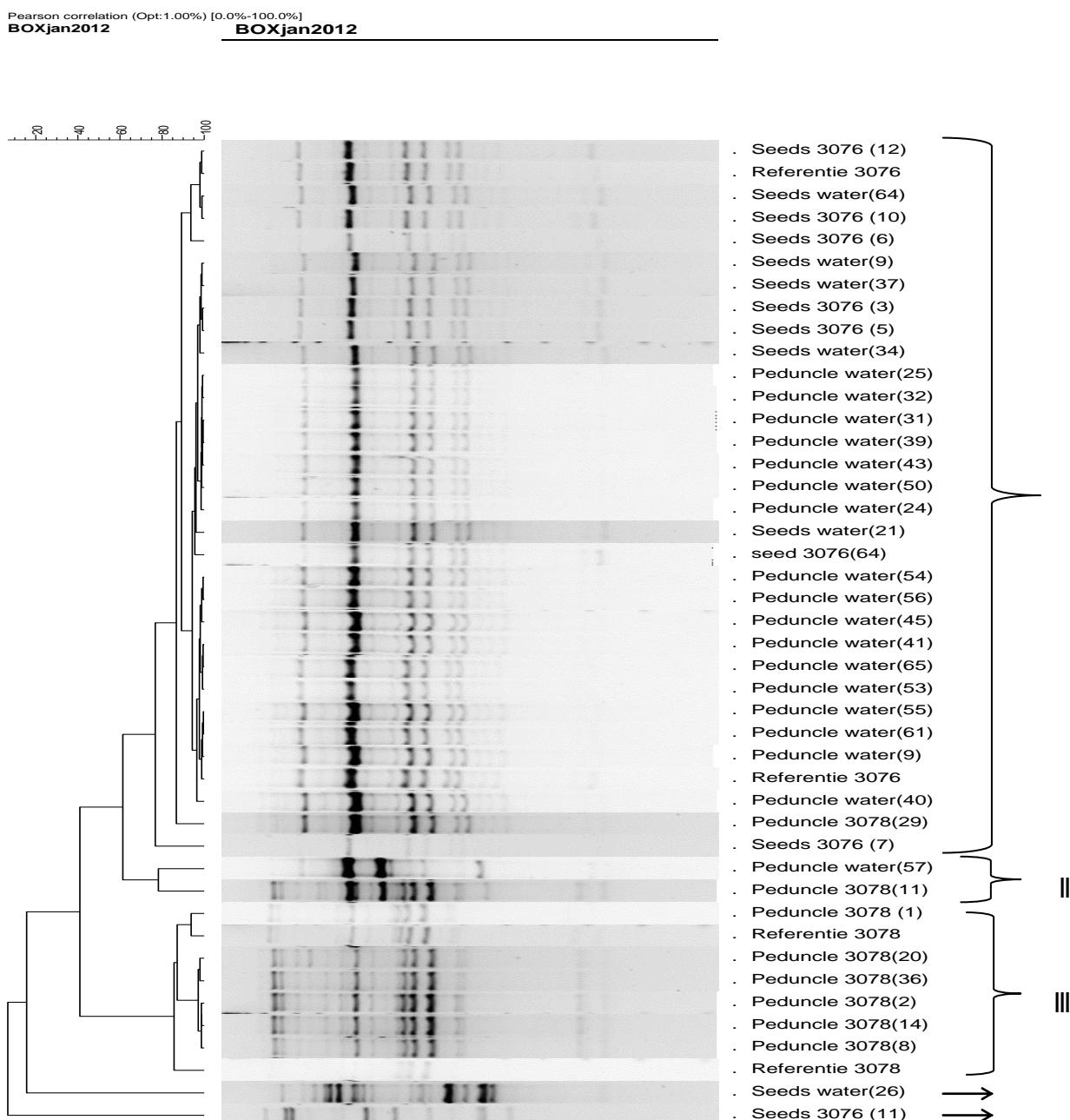
	Inoculum					
	Xcc 3076		None		Xcc 3078	
	Seed	Ped <sup>1</sup>	Seed	Ped	Seed	Ped
Number of samples positive in plating assay	42	57	6	17	1	8
Number of samples with successful isolations	41	57	6	17	1	8
Number of samples of which an isolate was subjected to BOX-PCR analysis	8	0	6	16	0	8
Number of isolates with Xcc IPO 3076 pattern	7	-	5	15 <sup>2</sup>	-	1
Number of isolates with Xcc IPO 3078 pattern	0	-	0	0	-	6
Number of isolates with other pattern	1	-	1	1	-	1

<sup>1</sup> Ped: Peduncle.

<sup>2</sup> Figure 3 shows DNA band patterns of 17 isolates from peduncles of non-inoculated plants, however two isolates (peduncle water (31) and peduncle water (32)) were mislabeled because these extracts were negative in the plating assay.

Out of in total 130 samples with successful isolations, 38 samples were selected for identification of one Xcc isolate per sample by BOX-PCR analysis. The relationships between the Xcc strains 3076 and 3078 and the selected Xcc isolates from plants of the Voorst polytunnel experiment are presented in figure 4. The cluster analysis arranged the isolates in three distinct groups (I, II and III). Group I comprises 30 isolates obtained from seeds of plants inoculated with Xcc strain 3076 (7 isolates), peduncles of a plant inoculated with Xcc strain 3078 (1 isolate) and seeds and peduncles of non-inoculated plants (5 and 17 isolates) with high similarity (often >95%) to Xcc strain 3076. Although the

banding pattern of isolate seed 3076 (7), obtained from seed of plant 7 of the plot inoculated with Xcc strain 3076, had a similarity of only about 75% to that of Xcc strain 3076, it was also included in group I. The isolate from peduncles of non-inoculated plant 57 (peduncle water (57)) and that from peduncles of plant 11 inoculated with Xcc strain 3078 (peduncle 3078 (11)), exhibiting banding patterns with a similarity of approximately 75%, were classified in group II. Group III includes six isolates from peduncles of plants inoculated with Xcc strain 3078, exhibiting profiles of at least 85% of similarity to Xcc strain 3078. The isolates from seed of non-inoculated plant 26 (seed water (26)), and from seed of plant 11 inoculated with Xcc strain 3076 (seeds 3076 (11)) showed profiles highly different from the strains Xcc 3076 and Xcc 3078 used for the inoculation of the plant in this experiment.



**Figure 8.** Dendrogram showing genetic relatedness of isolates and 2 reference strains of *Xanthomonas* determined by analysis of BOX-PCR fingerprint patterns using Pearson similarity coefficient and UPGMA cluster methods.

The cluster analysis of isolates obtained from Xcc-infected plant samples of the tunnel experiment in Voorst revealed that Xcc strain 3076 was recovered from seeds of 7 out of 8 plants inoculated with this strain. Moreover, Xcc strain 3076 was also isolated from seeds of 5 non-inoculated plants, peduncles of 15 non-inoculated plants and peduncles of 1 plant inoculated with Xcc strain 3078 (Table 5). On the other hand Xcc strain 3078 was only recovered from peduncles of plants inoculated with that strain.

## DISCUSSION

Several techniques such as genomic fingerprinting analysis have been reported for the identification of the bacterial strains. Especially, REP, ERIC and BOX PCR were effectively used to generate genomic fingerprints of a variety of *Xanthomonas* isolates and to identify pathovars and strains that were previously not distinguishable by other classification methods (Louws et al., 1994, 1995; Opgenorth et al., 1996; Cubero and Graham, 2002). Repetitive sequences such as BOX are present in the genome of *Xanthomonas* strains and BOX PCR protocols are very suitable and sensitive for rapid molecular characterization of pathogens and it can be used for them at pathovar levels.

In this study, the clustering based on BOX band profiles might reflect the genetic relation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) in Rilland and Voorst. It is observed a high number of bands, allows detection of a polymorphism sufficiently high for the genetic analysis of bacteria (CHUEIRE et al., 2000). The BOX PCR discriminated at Xcc strains level and they were also illustrated by the dendograms (Figures from 1 to 4), which differentiates between the groups and discriminates within group. Lows et al. (1995) found that BOX primer was useful for differentiating the strains of *Xanthomonas*. In the present study, we have demonstrated with great volume of information generated, the transmission of Xcc from one plant to another. The BOX PCR method clearly discriminated that the transmission of Xcc from Xcc 3076 inoculated plants to flowers of untreated plants resulting in seed infections.

The approach of a selective isolation based on difference in antibiotic sensitivity was less successful. In antibiotic concentration series Xcc strains 3076 and 3078 did not differ in sensitivity to Tobramycin and Vancomycin (data no shown). However, Xcc strain 3076 was less sensitive to Cephalexin than Xcc strain 3078. This finding was used to adapt the FS medium (Roberts and Koenraadt, 2007) to the purpose of present study.

Although the experiments at Rilland and Voorst were carried out with the same batch of young plants, disease progress at the two locations differed significantly. At Rilland only few plants showed disease symptoms, whereas at Voorst most plants succumbed to black rot and other disease and pest problems. The reasons for these differences are not fully understood. The Rilland experiment was situated near a location exposed to salty sea breezes. The influence of the sea was absent at Voorst. Anyhow, the differences in disease progress are reflected by the incidences of seed infections. For one thing all seed samples from Rilland were negative in the plating assay, for another a substantial portion of the seed samples from Voorst were found infected with Xcc, especially seeds from plants inoculated with Xcc strain 3076.

In case of the experiment at Voorst two methods were used to assess the presence of Xcc infections in seeds. In a Xcc specific TaqMan Real-Time PCR more positive samples were found than by plating on FS medium. This may be due to a greater sensitivity of the PCR method. On the other hand the differences in results of the plating and TaqMan assays may as well be an effect of the hot water treatment. This treatment was done with the intention to eliminate external contaminations incurred during threshing and seed cleaning. The heat kills the bacterial cells closely associated with the seed coat (thus negatively influencing the plating assay) but does not disintegrate the DNA of the dead cells. So, with the plating assay only vital bacterial cells inside the seeds are detected whereas with the TaqMan assay both vital and dead cells are detected.

The 65% seed samples of the experiment at Voorst obtained from plants inoculated with Xcc strain 3076 that were found Xcc positive in the plating assay had CT-values of 21.8 - 35.3 (Table 3). These CT-values were also recorded with 40% of the seed samples from plants inoculated with Xcc strain 3078. However, only 2% of the seed samples from these plants were positive in the

plating assay. This indicates that on FS medium the recovery efficiency of Xcc strain 3078 from infected seed was lower than that of Xcc strain 3076. The low recovery of strain 3078 might be linked to the enhanced concentration of Cephalexin in FS medium. It is not impossible that the Xcc cells in hot water treated seeds were more sensitive to Cephalexin than those used in the antibiotic sensitivity tests.

The aim of present study was to assess the routes in which seeds produced by cauliflower plants became infected in the presence of pollinating honey bees. In plants inoculated with Xcc strain 3076 or 3078 the expectation was that seeds produced by these plants would become infected with the pathogen via translocation of the bacterium through stems, peduncles, pedicels, funiculus and seed coat (Köhl and Van der Wolf, 2005). In most of these plants not only seeds but also the peduncles showed Xcc. If pollinating honey bees would be involved in the transmission of Xcc it was expected to detect the pathogen in seeds harvested from non-inoculated plants. Indeed, the results of the analysis of BOX-PCR patterns of Xcc isolates from the experiment at Voorst demonstrated that Xcc strain 3076 was transmitted to non-inoculated plants. Although the honey bees were extensively sampled during blooming, they were never found to carry Xcc (J.J.M. van der Steen, personal communication). In all probability pollinating bees were not involved in the transmission of Xcc. Maybe other insects were responsible for this. If flower visiting insects transmitted Xcc strain 3076 to the non-inoculated plants mainly plants should occur with seed infections only.

## CONCLUSION

It was concluded that cultivation of cauliflower plants under organic conditions resulted in a high incidences of black rot and a high seed infection incidence.

Present study demonstrated that Xcc can be transmitted from infected plants to non-infected plants and probability pollinating bees were not involved in the transmission of Xcc.

In inoculated plants seeds probably became infected with Xcc pathogen via translocation of the bacterium through stems, peduncles, pedicels, funiculus and seed coat.

## REFERENCES

- CUBERO, J. AND GRAHAM, J.H. The leucine-responsive regulatory protein gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v.54, p.429-437, 2004.
- HILDEBRAND, P.D. BLACK ROT. In Diseases and pests of vegetable crops in canada: an illustrated compendium. Eds. Howard, R.J.; Garland, J.A.; Seaman, W.L., **The Canadian Phytopathological Society and The Entomological Society of Canada**, Ottawa, p. 93-94, 1994.
- HILDEBRAND, M., DICKLER, E., GEIDER, K. Occurrence of *Erwinia amylovora* on insects in fire blight orchard. *J Phytopathology* v.148, p. 251-256, 2000.
- KÖHL, J. AND VAN DER WOLF, J. M. *Alternaria brassicicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in organic seed production of Brassicae: Epidemiology and seed infection. Note 363. **Plant Research International**, 2005.
- KOENRAADT, H., VAN BILSEN, J.G.P.M. AND ROBERTS, S.J. Comparative test of four semi-selective agar media for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in brassica seeds. **Seed Science and Technology** v.33, p.115-125, 2005.
- KÖHL, J.; VAN DER WOLF, J. *Alternaria brassicicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in organic seed production of Brassicae: Epidemiology and seed infection **Plant Research International** B.V., Wageningen. September 2005 Note 363.

LOWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C. T.; DE BRUIJN, F.J. Specific genomic fingerprint of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strain generated with repetitive sequences an PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p.2286-2295, 1994.

LOUWS, F.J.; FULBRUGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; DE BRUIJN, F.J. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Phytopathology**. v.85, p.528-536, 1995.

NUNES, W. M.C; MOLINA, R. O; ALBUQUERQUE, F. A; CORAZZA-NUNES, M. J; ZANUTTO, C. A; MACHADO. M. Population fluctuation of sharpshooters vectors of *Xylella fastidiosa* Wells et al. in commercial citrus groves in northwestern Paraná State. **Neotropical Entomology**, v.36 n.2, Londrina, 2007.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; OLIVEIRA, I.S.; NASCIMENTO, A.R.P. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste brasileiro. In: Michereff, S.J.; Barros, R. (Eds.) **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. 368 p.

OPGENORTH, D.C., SMART, C.D., LOUWS, F.J., DE BRUIJN, F.J. AND KIRKPATRICK, B.C. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting. **Plant Dis.**v.80, p.868-873, 1996.

QIAN, W., JIA, Y., REN, S., HE, Y., FENG, J., LU, L., SUN, Q., YING, G., TANG, D., TANG, H., WU, W., HAO, P., WANG, L., JIANG, B., ZENG, S., GU, W., LU, G., RONG, L., TIAN, Y., YAO, Z., FU, G., CHEN, B., FANG, R., QIANG, B., CHEN, Z., ZHAO, G., TANG, J AND HE, C. Comparative and functional genomic analysis of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**. v.15 p. 757-767, 2005.

VAN DER WOLF, J.M.; ZOUWEN, P.S. VAN DER. Colonization of cauliflower blossom (*Brassica oleracea*) by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, via flies (*Calliphora vomitoria*) can result in seed infestation. **Journal of Phytopathology** 158, 11-12. - ISSN 0931-1785 - p. 726 -732, 2010.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V.A. Diseases caused by bacteria in crucifers. **Informe Agropecuário**, v.17 p. 56-59, 1995.

SHELTON, A. M; HUNTER, J. E. Evaluation of the potential of the flea beetle *Phyllotreta cruciferae* to transmit *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causal agent of black rot of crucifers. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v. 7, p. 308-310, Issue 3, 1985.

WILLIAMS, P.H. Black rot: a continuing threat to world crucifers. **Plant Disease**, St. Paul, v.64, p.736- 742, 1980.

ZANDJANAKOU-TACHIN, M., FANOU, A., LE GALLP, WYDRA, K. Detection, survival and transmission of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*, causal agents of cassava and cowpea bacterial blight, respectively, in/by insect vectors. **Journal of Phytopathology** v.155, p. 159 -169, 2007.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos realizados nesse estudo mostraram que não existe um teste de vigor que seja eficiente para ser utilizado na avaliação do vigor de sementes de todas as espécies de hortaliças. Na realidade deve ser utilizado um conjunto de testes que expressem a real qualidade dos lotes e deve ser indicado o que apresentar maior relação com a emergência de plântulas em campo e de preferência que seja de fácil execução e rápido na obtenção dos resultados.

Dentre os testes para avaliação do vigor utilizados no presente trabalho podem ser destacados o teste de germinação em alta temperatura para sementes de alface, o teste de envelhecimento acelerado para sementes de rabanete e coentro, o teste de germinação em baixa temperatura para sementes de pepino e os testes de primeira contagem de germinação e envelhecimento acelerado para sementes couve manteiga, que se mostraram eficientes na estratificação de lotes. Por outro lado, todos os referidos testes foram efetivos na separação dos lotes de sementes de rúcula em níveis de vigor.

As sementes constituem-se em importante fonte de inóculo primário para diversos patógenos causadores de doenças em plantas. Além disso, podem introduzir em uma região novas raças fisiológicas com diferente especialização patogênica. A qualidade sanitária pode interferir na qualidade fisiológica das sementes de hortaliças conforme o vigor das sementes, os microrganismos associados às sementes e o nível de infecção das sementes. O teste de sanidade de sementes pode representar um valioso aliado dos testes de vigor fornecendo informações importantes sobre a qualidade dos lotes.

A infecção primária via semente pode ocorrer, embora não necessariamente as sementes infectadas ou contaminadas irão resultar em plântulas com sintomas de doença. O nível de infecção pode influenciar o desenvolvimento fisiológico da semente, produzindo plântulas anormais ou sementes mortas no teste de germinação.

A semente pode se constituir em meio eficiente de propagação de doenças de plantas. Uma doença transmitida por sementes e que causa

prejuízos econômicos aos produtores de hortaliças, em especial aos produtores de brássicas é a podridão negra, considerada uma das doenças mais importantes em muitos países. A doença é causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). As sementes de brássicas podem apresentar contaminação externa e infecção pela bactéria que normalmente penetra na planta hospedeira através de hidatódios e coloniza o sistema vascular, podendo infectar as sementes internamente.

A via de infecção das sementes por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) na presença de insetos, em especial abelhas polinizadoras, também foi investigada no presente estudo. Para isso, foram avaliados pedúnculos e sementes de couve flor por plaqueamento em meio semi-seletivo e por técnicas moleculares.

Sabe-se da possibilidade de transmissão de determinadas bactérias fitopatogênicas por insetos. No caso de *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (Xcc), levantou-se a possibilidade dessa bactéria ser disseminada por insetos, especialmente polinizadores. Após extensivo estudo, constatou-se a transmissão da bactéria de uma planta para outra, entretanto, acredita-se que provavelmente as abelhas não estejam envolvidas na transmissão de Xcc.

## APÊNDICE

### **Modification of Fieldhouse & Sasser medium (FS medium cited in the text)**

For the experiments with transmission of Xcc by bees a selective medium was needed that not only supported the growth of both Xcc strain 3076 and 3078 but also distinguished the two strains. In a comparative test the Fieldhouse & Sasser (FS) medium proved to be an excellent medium for the detection of Xcc in seed extracts (Roberts & Koenraadt, 2007). Therefore, this medium was selected and adapted to the purpose of present study.

One possibility to distinguish the Xcc strains 3076 and 3078 may be a difference in antibiotic sensitivity. This option was tested in FS medium in which the recommended 50 mg/L cephalexin was replaced several concentrations of the antibiotics Cephalexin (25, 50, 100, 200, 400 mg/l), Tobramycin (0.5, 1, 2, 4, 8mg/l) and Vancomycin (2, 4, 8, 16, 32 mg/l). The two strains did not differ in sensitivity to Tobramycin and Vancomycin (data no shown). At 100 mg/l Cephalexin growth of strain 3078 was slightly impeded, whereas growth of strain 3076 was not affected. This finding was used to distinguish the two strains.

The final composition of the modified FS medium was: 15g/L agar-agar (Bacto), 25 g/L starch (Merck), 0.1 g/l yeast extract (Oxoid), 0.8g/l Di-potassium hydrogen phosphate ( $K_2HPO_4$ ), 0.8g/l Potassium di hydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ ), 0.1 g/l Magnesium sulphate heptahydrate ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 1.5 ml/l Methyl green (1% aq), 1000 ml demineralized water supplemented with 1ml/l Cycloheximide (200mg/ml 70 % EtOH), 1 ml/l D-methionine (3 mg/ml 50% EtOH), 1 ml/l Pyridoxine-HCl (1 mg/ml 50% EtOH), 0.4ml/l Gentamycin<sub>®</sub> (1 mg/ml H<sub>2</sub>O), 2ml/l Cephalexin (50 mg/ml 70% EtOH) and 3 ml/l Trimethoprim (10 mg/ml 70% EtOH). The non-heat-labile components were dissolved in demineralized water and autoclaved for 15 min at 121 °C. Except for Gentamycine, which was added as filter sterilized aqueous solution, the heat-labile antibiotics and growth factors were added as ethanol solutions after cooling the agar medium to approximately 50 °C and before pouring into 9 cm plastic Petri dishes.