



Detecção, quantificação e identificação de fitobactérias em sementes de trigo

Paula STEILMANN^{1*}, Norimar D'Avila DENARDIN¹, Marisseia RAAB¹,
Ana Carolina MENEZES¹, Suzete Aparecida Lanza DESTEFANO³

¹Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

³Instituto Biológico, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Campinas, SP, Brasil.

*E-mail: paulasteilmann@gmail.com

Recebido em maio/2018; Aceito em setembro/2018.

RESUMO: A qualidade sanitária das sementes merece atenção, considerando os reflexos negativos que a associação de patógenos em sementes pode gerar. Este estudo objetivou detectar, quantificar e identificar bactérias fitopatogênicas em sementes de trigo. A incidência foi avaliada utilizando as sementes diretamente dispostas sobre os meios de cultura 523, WBC e XTS. Dez diferentes métodos de quantificação foram testados, utilizando 100, 500, 1000 e 3000 sementes com e sem incubação; 3000 sementes com centrifugação e 3000 trituradas. Através do meio 523 não foi possível avaliar a incidência devido a presença de contaminantes. Utilizando o meio WBC obtiveram-se incidências de 92, 82 e 78 % para os cultivares Quartzo, Marfim e BRS 331 respectivamente e com o meio XTS 68% de incidência na cultivar BRS 331. Os resultados permitiram observar que o melhor método para quantificação de bactérias em sementes de trigo foi a utilização de 3000 sementes com incubação, com trituração e com centrifugação. Os resultados das avaliações como morfologia colonial, testes bioquímicos e fisiológicos permitem concluir que as bactérias isoladas pertencem às espécies *Xanthomonas translucens* e *Pseudomonas fuscovagine*, sendo que, alguns desses isolados a identificação só foi possível ao nível de gênero sendo identificados como *Xanthomonas* e *Pseudomonas*.

Palavras-chave: bacteriose; patogenicidade; patologia de sementes; *triticum aestivum*.

Detection and quantification of phytopathogenic bacteria in wheat seed

ABSTRACT: The sanitary quality of seeds deserves attention, considering the negative impact that the association of pathogens in seeds can generate. This study aimed to detect, quantify and identify phytopathogenic bacteria in wheat seeds. The incidence of bacteria was evaluated using the seeds directly arranged on the culture medium 523, WBC and XTS. Ten different methods of quantification of pathogenic bacteria were tested with 100, 500, 1000 and 3000 seeds with and without incubation; 3000 seeds with crushed and 3000 with centrifugation. Across the middle 523 was not possible to assess the impact due to the presence of contaminants. Using the WBC light yielded incidences of 92, 82 and 78 % for Quartzo, Marfim and BRS 331 cultivars respectively. With the environment XTS 68 % incidence BRS 331. Results showed that the best method for quantification of bacteria in wheat seeds was to use incubation with 3000 seeds with milling and centrifuging. The isolates were identified by colony morphology, biochemical and physiological tests showed that the isolated bacteria belonging to the species *Pseudomonas fuscovaginae* and *Xanthomonas translucens* and genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas*.

Keywords: bacterial; pathogenicity; seed pathology; *triticum aestivum*.

1. INTRODUÇÃO

Na triticultura brasileira existem relatos de doenças ocasionadas por bactérias dos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas*. Estes patógenos podem reduzir o rendimento da cultura em função de fatores ambientais preponderantes ao tempo da infecção, à fase de crescimento da cultura hospedeira e, entre outros, à tolerância da cultivar (BOTÍN; LOPEZ, 2012; DUBIN; DUVEILLER, 2011).

A queima da folha do trigo, induzida por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (KAWAGUCHI et al., 2018), e a mancha da base da gluma, incitada por *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, têm sido relatadas na maioria das regiões de clima temperado e subtropical do mundo (MATVEEVA et al., 2003).

A estria bacteriana da folha é a doença mais importante de origem bacteriana em trigo, é incitada pelos patógenos *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis*, pv. *hordei*, pv. *secalis*,

pv. *translucens* e pv. *undulosa* (XU et al., 2010). Uma recente análise filogenética realizada utilizando dados do sequenciamento do genoma apoiam a existência de especificidade dos patógenos ao hospedeiro (LANGLOIS et al., 2017). É uma característica destes patógenos, promover exsudação bacteriana nas folhas que está associada a temperaturas normalmente acima de 26°C, situação está comum em ambientes de clima tropical (Embrapa, 2010). Dentre os aspectos epidemiológicos, a semente é sem dúvida, um dos principais mecanismos de sobrevivência e de disseminação de patógenos a longas distâncias.

Um dos graves problemas relativos à veiculação de bactérias por sementes reside na operacionalidade e/ou fragilidade dos métodos de detecção e de quantificação desses organismos. Diversos métodos têm sido desenvolvidos para testes de sanidade de sementes, visando detectar bactérias fitopatogênicas, os quais variam quanto à sensibilidade, à

especificidade e à complexidade. Alguns são frágeis e outros onerosos, por requererem equipamentos sofisticados ou mão de obra extremamente qualificada, como é o caso do uso de bacteriófagos, de técnicas de imunofluorescência, sorológicas ou de sondas de DNA. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar métodos para a detecção e isolamento de bactérias fitopatogênicas presentes em sementes de trigo, assim como a identificação dos isolados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo, em Passo Fundo, RS nos anos de 2012 e 2013. Foram utilizadas sementes de trigo das cultivares BRS 331, Quartzo e Marfim, todas colhidas na safra agrícola de 2012.

Os diferentes métodos utilizados para a detecção e quantificação de bactérias em sementes de trigo estão expostos na Tabela 1.

Para o método 1, o qual foi utilizado apenas para detecção, as sementes foram depositadas diretamente sobre os meios de cultivo 523 (KADO; HESKETT, 1970), WBC (DUVEILLER; MARAITE, 1990) e XTS (SCHAAD, 1995). Após o período de incubação cada caixa tipo gerbox foi avaliada individualmente, de acordo com a presença ou não de bactérias crescidas junto às sementes para avaliar a incidência na amostra. Para os demais métodos de detecção e quantificação (métodos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) a suspensão de sementes foi centrifugação a 15000 RCF por três minutos e em seguida realizou-se a técnica de diluições seriadas. De cada uma das diluições foram retirados 200 µL para o plaqueamento em meio de cultura 523, estas placas foram levadas a estufa bacteriológica a 28°C por 24 e 48 horas. Avaliou-se a quantidade de UFC crescidas sobre o meio de cultura com características semelhantes, para através disso, verificar qual o método mais eficiente capaz de detectar o maior número de UFC/mL em menor tempo. A quantificação das UFC foi processada a partir do cálculo: fator de diluição x volume (mL) x número de UFC (colônias típicas) crescidas no meio de cultura.

Após as avaliações, foram pegas colônias das bactérias incluídas na contagem com características típicas do gênero *Xanthomonas* e foram semeadas em meio de cultura WBC.

Colônias com características gênero *Pseudomonas* foram semeadas em meio de cultura 523 e em meio King B (KING et al., 1954). As placas foram colocadas em estufa bacteriológica durante 24 e 48 horas a 28 °C. Após procedeu-se a preservação dos isolados para os estudos subsequentes.

Os experimentos foram conduzidos no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). O experimento de incidência de bactérias fitopatogênicas em sementes de trigo, foi realizado com três tratamentos (3 cultivares), com dez repetições por tratamento. O experimento de quantificação foi composto por dez tratamentos (métodos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11). Cada tratamento foi composto por três repetições de cada cultivar e na fase de diluições sucessivas foram preparadas três placas de cada uma das diluições, totalizando ao final nove repetições, as quais foram utilizadas na análise estatística. Os resultados foram submetidos aos pressupostos da Análise de Variância (ANOVA), e posteriormente ANOVA, os resultados da análise de incidência foram comparados pelo teste de comparação de médias de Tukey e os resultados obtidos pelo teste de quantificação foram testados pelo teste de comparação de médias de Scott-Knott, ambos a 5% de probabilidade de erro.

A patogenicidade das bactérias isoladas foi confirmada através de testes de hipersensibilidade em tabaco e tomate e de patogenicidade em trigo, cevada, aveia e arroz. Para a realização dos testes de hipersensibilidade e patogenicidade utilizou-se uma suspensão bacteriana de cada um dos isolados correspondente a $DO_{600nm} = 0,1$ aproximadamente 108 UFC/mL. Esta suspensão foi inoculada em folhas de tabaco e tomateiro com uma seringa estéril, os sintomas foram observados em 24 horas. Todos os isolados provenientes das sementes de trigo e que mostraram reação de hipersensibilidade positiva, foram testados quanto a sua capacidade de causar a doença em diferentes cereais. A suspensão foi inoculada em plantas de trigo, cevada, aveia e arroz, para isso utilizou-se o método tesoura a qual foi mergulhada na suspensão bacteriana e em seguida provocou-se os ferimentos, essa avaliação também foi realizada com as bactérias "Tipo". Antes das inoculações as plantas permaneceram em câmara úmida por 24 horas e após a inoculação por mais 24 horas. Após procedeu-se o reisolamento cumprindo-se os Postulados de Koch.

Tabela 1. Métodos de detecção e quantificação de bactérias em sementes em sementes de trigo.

Table 1. Methods of detection and quantification of pathogenic bacteria in wheat seeds.

	Detecção	Quantificação	Quantidade de sementes	Procedimento	Solução salina	Tween 20	Incubação
1	X	-	3000	Sementes inteiras	-	-	72 horas a 28 °C
2	X	X	3000 (125g)	Trituração por 30 segundos	125 mL	2 gotas	-
3	X	X	3000 (125g)	Sementes inteiras	125 mL	2 gotas	-
4	X	X	3000 (125g)	Sementes inteiras	125 mL	2 gotas	-
5	X	X	3000 (125g)	Sementes inteiras	125 mL	2 gotas	12 horas a 4 °C
6	X	X	1000	Sementes inteiras	41,6 mL	1 gota	-
7	X	X	1000	Sementes inteiras	41,6 mL	1 gota	12 horas a 4 °C
8	X	X	500	Sementes inteiras	20,8 mL	1 gota	-
9	X	X	500	Sementes inteiras	20,8 mL	1 gota	12 horas a 4 °C
10	X	X	100	Sementes inteiras	4,2 mL	1 gota	-
11	X	X	100	Sementes inteiras	4,2 mL	1 gota	12 horas a 4 °C

A identificação dos isolados foi feita através da caracterização morfológica por testes como KOH; presença de xantomonadina; LOPAT; Oxidação-fermentação pelo meio O/F; produção das enzimas oxidase e catalase; hidrólise do

amigo, da caseína do leite, da gelatina; capacidade de nucleação do gelo e através da utilização de kits bioquímicos Biolog® e Bactray®. Todos estes testes de identificação foram realizados em comparação com bactérias "tipo" X.t. pv.

cerealis 580 - ICMP 1409, X.t. pv. translucens 581 - ICMP 5752, X.t. pv. undulosa 579 - ICMP 5755, P.s. pv. syringae van Hall 1902 (1022) e P. fuscovaginae Miyajima, Tanii □ Akita 1983 (743) provenientes da coleção de fitobactérias do Instituto Biológico de Campinas.

Para a análise dos dados obtidos na identificação, realizou-se análise multivariada para variáveis multicategóricas, mediante a geração de uma matriz de dissimilaridade obtida pelo coeficiente (c) de similaridade. Posteriormente foi gerado um dendrograma pelo método de ligação média entre grupos (UPGMA).

3. RESULTADOS

Os resultados apontam que a cultivar Quartzo apresentou a maior incidência sendo que 92% das sementes apresentaram-se infectadas, a cultivar Marfim com 84% de incidência e, a cultivar BRS 331 apresentando o menor índice de incidência tendo 72% das sementes infectadas (Tabela 2).

O meio de cultura semi-seletivo XTS possibilitou a identificação de X. t. pv. translucens em 72 horas. Dentre as cultivares utilizadas neste estudo apenas a cultivar BRS 331 apresentou o crescimento desta bactéria pela deposição direta das sementes em meio de cultura, obtendo 78% de incidência.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* também foram detectadas neste estudo, ao utilizar o meio B de King verificou-se em média uma incidência 86% para o cultivar Quartzo, de 62% para o cultivar Marfim e, para o cultivar BRS 331 uma incidência média de 8% destes patógenos.

Tabela 2. Incidência de bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* sp. em sementes de trigo de três cultivares.

Table 2. Incidence of phytopathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas* sp. in wheat seeds of three cultivars.

Cultivares	Incidência (%)
Quartzo	92 a*
Marfim	84 a
BRS 331	72 c

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Todos os métodos avaliados no presente estudo foram capazes de detectar bactérias fitopatogênicas presentes em sementes de trigo. Contudo, observou-se que houve diferenças no número de UFC semente⁻¹ detectadas pelos diferentes métodos testados.

A partir dos testes de detecção, foi realizada a quantificação, sendo possível formar 11 grupos de isolados bacterianos, os quais foram classificados pelas semelhanças em características morfológicas das colônias, como cor, consistência, brilho, opacidade, translúcidas, bordos e elevação (Tabela 3).

Na Tabela 4 pode ser observada a diferença estatística entre as médias de UFC/semente⁻¹ do grupo de isolados BRS-AG, MSF-AG e QTZ-AG encontradas nas sementes avaliadas. Assim, pode-se afirmar que os tratamentos onde obteve-se o maior número de UFC crescidas em meio de cultura foram os que utilizaram maior quantidade de sementes.

O grupo de isolados BRS-AC, MRF-AC e QTZ-AC foi detectado em todas as amostras de sementes por todos os métodos testados (Tabela 5). Para todas as cultivares os melhores métodos foram os que utilizaram 3000 sementes, através deles obteve-se o maior número de UFC semente⁻¹.

Tabela 3. Grupos de bactérias isoladas de sementes de três cultivares de trigo e suas principais características coloniais.

Table 3. Groups of bacteria isolated from seeds of three wheat cultivars and their colonial characteristics.

Cultivar	Grupo	Características da colônia
BRS 331	BRS-AG	Colônias de coloração amarela, brilhantes, grandes e gomosas
	BRS-AC	Colônias de coloração amarela clara, brilhantes, grandes e gomosas
	BRS-AF	Colônias pequenas de coloração amarelo forte e brilhantes
Marfim	MSF-AG	Colônias de coloração amarela, brilhantes, grandes e gomosas
	MRF-AC	Colônias de coloração amarela clara, brilhantes, grandes e gomosas
	MRF-ATR	Colônias de coloração amarela, translúcidas a luz
	MRF-VD	Colônias de coloração creme, com pigmento difusível em meio de cultura de cor verde
Quartzo	QTZ-AG	Colônias de coloração amarela, brilhantes, grandes e gomosas
	QTZ-AC	Colônias de coloração amarela clara, brilhantes, grandes e gomosas
	QTZ-ATR	Colônias de coloração amarela, translúcidas a luz
	QTZ-VD	Colônias de coloração creme, com pigmento difusível em meio de cultura de cor verde

(BRS-AG) BRS indica a cultivar e o AG indicam as principais características, neste caso Amarela gomosa, AC amarela clara e AF amarela forte. (MRF-AG) MRF indica a cultivar Marfim e AG e AC amarela gomosa e amarela clara, ATR amarela translúcida e VC verde. (QTZ - AC) QTZ representa a cultivar Quartzo e AG, AC e ATR, amarela gomosa, amarela clara e amarela translúcida respectivamente e VC indica os isolados com coloração verde das colônias.

Tabela 4. Quantificação dos isolados BRS-AG, MSF-AG e QTZ-AG (UFC/ml⁻¹) em sementes de trigo através de diferentes métodos de detecção.

Table 4. Quantification of BRS-AG, MSF-AG and QTZ-AG (UFC/ml⁻¹) isolates in wheat seeds by different detection methods.

Métodos	Cultivar		
	BRS 331	Marfim	Quartzo
2	5,3 X 10 ⁵ a	1,7 X 10 ⁶ a	8,8 X 10 ⁶ a
3	5,3 X 10 ⁵ a	7,9 X 10 ⁵ a	7,9 X 10 ⁶ a
4	6,6 X 10 ³ a	4,5 X 10 ⁴ a	1,7 X 10 ⁵ a
5	1,8 X 10 ⁶ a	9,5 X 10 ⁵ a	6,5 X 10 ⁶ a
6	1,9 X 10 ³ b	2,5 X 10 ³ c	3 X 10 ³ c
7	1,5 X 10 ³ b	2,1 X 10 ³ c	2,2 X 10 ³ c
8	1,7 X 10 ² b	1,9 X 10 ³ c	2,2 X 10 ³ c
9	1,5 X 10 ³ b	1,7 X 10 ³ c	1,8 X 10 ³ c
10	4,8 X 10 ² b	7,1 X 10 ² d	8,8 X 10 ² d
11	6,4 X 10 ² b	5 X 10 ² d	6,4 X 10 ² d
C.V. (%)	17,27	7,97	2,75

Método 2 utilizou 3000 sementes trituradas; método 3 utilizou 3000 sementes com centrifugação; método 4 utilizou 3000 sementes sem incubação; método 5 com 3000 sementes com período de incubação; método 6 com 1000 sementes com incubação; método 7 com 1000 sementes sem incubação; método 8 com 500 sementes com incubação; método 9 com 500 sementes sem incubação; método 10 com 100 sementes com incubação; método 11 com 100 sementes sem incubação. As médias dentro de cada coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

O grupo dos isolados BRS-AF, foi detectado apenas na cultivar BRS 331. Tendo como melhores tratamentos para quantificação, os métodos de 3000 sementes com trituração e centrifugação (Tabela 6). Foram detectados e quantificados os isolados MRF-VD, QTZ - VD nas cultivares Marfim e

Quartzo, sendo mais eficientes os métodos que utilizaram 3000 sementes (Tabela 7).

Tabela 5. Quantificação dos isolados BRS-AC, MRF-AC e QTZ - AC (UFC/ml⁻¹) em sementes de trigo através de diferentes métodos de detecção.

Table 5. Quantification of BRS-AC, MRF-AC and QTZ-AC (UFC/ml⁻¹) isolates in wheat seeds by different detection methods.

Método	Cultivar					
	BRS 331		Marfim		Quartzo	
2	5,3 x 10	a	4,6 X 10	b	4,1X 10	a
3	4,3 x 10	a	7,9 X 10	a	2,7 X 10	b
4	3,4 x 10	b	3,4 X 10	b	1,9 X 10	c
5	4,2 x 10	a	3,8 X 10	b	2,9 X 10	b
6	4,2 x 10	a	2,9 X 10	c	3,6 X 10	a
7	1,6 x 10	c	1,4 X 10	d	2 X 10	c
8	2,8 x 10	b	3,4 X 10	b	3,1 X 10	b
9	1,5 x 10	c	1,7 X 10	d	1,8 X 10	c
10	4,5 x 10	a	3,1 X 10	b	2,2 X 10	c
11	2,2 x 10	b	1,5 X 10	d	1,4 X 10	c
CV. (%)	6,75		6,39		13,29	

Método 2 utilizou 3000 sementes trituradas; método 3 utilizou 3000 sementes com centrifugação; método 4 utilizou 3000 sementes sem incubação; método 5 com 3000 sementes com período de incubação; método 6 com 1000 sementes com incubação; método 7 com 1000 sementes sem incubação; método 8 com 500 sementes com incubação; método 9 com 500 sementes sem incubação; método 10 com 100 sementes com incubação; método 11 com 100 sementes sem incubação. As médias dentro de cada coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 6. Quantificação do isolado BRS-AF (UFC/ml⁻¹) em sementes de trigo através de diferentes métodos de detecção.

Table 6. Quantification of BRS-AF(UFC/ml⁻¹) isolate in wheat seeds by different detection methods.

Método	Cultivar					
	BRS 331		Marfim		Quartzo	
2	6,6 X 10	a	ND*	ND*	ND*	ND*
3	4,2 X 10	b	ND	ND	ND	ND
4	3,4 X 10	c	ND	ND	ND	ND
5	4,2 X 10	b	ND	ND	ND	ND
6	4 X 10	b	ND	ND	ND	ND
7	2,2 X 10	e	ND	ND	ND	ND
8	2,7 X 10	e	ND	ND	ND	ND
9	1,7 X 10	f	ND	ND	ND	ND
10	2,1 X 10	e	ND	ND	ND	ND
11	1,4X 10	f	ND	ND	ND	ND
C.V. (%)	7,24		-		-	

Método 2 utilizou 3000 sementes trituradas; método 3 utilizou 3000 sementes com centrifugação; método 4 utilizou 3000 sementes sem incubação; método 5 com 3000 sementes com período de incubação; método 6 com 1000 sementes com incubação; método 7 com 1000 sementes sem incubação; método 8 com 500 sementes com incubação; método 9 com 500 sementes sem incubação; método 10 com 100 sementes com incubação; método 11 com 100 sementes sem incubação. As médias dentro de cada coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. *ND – não detectada.

Os isolados MRF-ATR e QTZ-ATR foram detectados nas cultivares Marfim e Quartzo. Para a cultivar Marfim o melhor método de detecção foi o método dois, o qual utiliza 3000 sementes trituradas. Para a amostra de sementes do cultivar Quartzo os métodos de detecção com 3000 sementes e trituração, centrifugação e sem incubação não se diferenciaram entre si, sendo os melhores para a detecção destes isolados nesta amostra (Tabela 8).

A detecção das bactérias nos métodos com maiores números de sementes e com períodos de incubação à temperatura de 4 °C foram mais eficientes, tendo apresentado maior número de UFC semente⁻¹. Ressalta-se neste contexto a importância do tamanho da amostra na detecção de bactérias

fitopatogênicas em sementes. Não se pode apontar para o uso rotineiro, se o objetivo for quantificação de bactérias em sementes a utilização de amostras com 100 ou 500 sementes, pois, deste modo amostras com menor porcentagem de infecção poderão não ser detectados como contendo o patógeno, pode-se subestimar a quantidade da bactéria na amostra e consequentemente no lote.

Tabela 7. Quantificação dos isolados MRF-VD e QTZ - VD (UFC/ml⁻¹) em sementes de trigo através de diferentes métodos de detecção.

Table 7. Quantification of MRF-VD and QTZ-VD (UFC/ml⁻¹) isolates in wheat seeds by different detection methods.

Método	Cultivar					
	BRS 331		Marfim		Quartzo	
2	ND*		1,3 X 10 ⁶	a	7,8 x 10 ⁶	a
3	ND		7,9 X 10 ⁵	b	7,5 x 10 ⁶	a
4	ND		8,8 X 10 ⁵	b	5,6 x 10 ⁶	a
5	ND		2,1 X 10 ⁵	c	4,6 x 10 ⁴	b
6	ND		2,3 X 10 ³	d	2,6 x 10 ³	c
7	ND		2,2 X 10 ³	d	4,6 x 10 ⁴	b
8	ND		1,7 X 10 ³	e	2,1 x 10 ³	d
9	ND		1,6 X 10 ³	e	1,7 x 10 ³	d
10	ND		5,7 X 10 ²	f	7 x 10 ²	e
11j	ND		1,5 X 10	g	1,4 x 10	f
C.V. (%)	-		24,20		22,47	

Método 2 utilizou 3000 sementes trituradas; método 3 utilizou 3000 sementes com centrifugação; método 4 utilizou 3000 sementes sem incubação; método 5 com 3000 sementes com período de incubação; método 6 com 1000 sementes com incubação; método 7 com 1000 sementes sem incubação; método 8 com 500 sementes com incubação; método 9 com 500 sementes sem incubação; método 10 com 100 sementes com incubação; método 11 com 100 sementes sem incubação. As médias dentro de cada coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. *ND – não detectada.

Tabela 8. Quantificação dos isolados MRF-ATR e QTZ-ATR (UFC/ml⁻¹) em sementes de trigo através de diferentes métodos de detecção.

Table 8. Quantification of MRF-ATR and QTZ-ATR (UFC/ml⁻¹) isolates in wheat seeds by different detection methods.

Método	Cultivar					
	BRS 331		Marfim		Quartzo	
2	ND*		5,2 X 10 ²	a	5,8 X 10 ²	a
3	ND		1,8 X 10 ²	b	1,7 X 10 ²	a
4	ND		1,5 X 10	e	1,6 X 10 ²	a
5	ND		2,0 X 10	e	2,8 X 10	b
6	ND		1,6 X 10	e	1,4 X 10	c
7	ND		9,4 X 10	c	7,1 X 10	c
8	ND		8,7 X 10	c	1,2 X 10	c
9	ND		9,5 X 10	c	9,1 X 10	b
10	ND		1,6 X 10	e	1,0 X 10 ¹	b
11	ND		7 X 10	d	6,7 X 10	c
C.V. (%)	-		10,36		8,96	

Método 2 utilizou 3000 sementes trituradas; método 3 utilizou 3000 sementes com centrifugação; método 4 utilizou 3000 sementes sem incubação; método 5 com 3000 sementes com período de incubação; método 6 com 1000 sementes com incubação; método 7 com 1000 sementes sem incubação; método 8 com 500 sementes com incubação; método 9 com 500 sementes sem incubação; método 10 com 100 sementes com incubação; método 11 com 100 sementes sem incubação. As médias dentro de cada coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. *ND – não detectada.

Trabalhos mostram a capacidade de patógenos bacterianos de ficarem por longos períodos de tempo associados às sementes. As análises realizadas mostram que mesmo após seis meses, aproximadamente, ainda foi possível detectar as bactérias. Tendo em vista a falta de controle para doenças de origem bacteriana em trigo, a utilização de sementes livres destes patógenos e de cultivares resistentes, são as melhores

formas de evitar a ocorrência de epidemias. Dentre dos aspectos epidemiológicos, a semente é um dos principais mecanismos de sobrevivência e disseminação de bactérias a longa distância.

Observou-se que houve diferença nas reações de hipersensibilidade causada pelos isolados em tabaco e tomateiro. Os grupos BRS-AG, BRS-AC, BRS-AF, MRF-AG, MRF-AC, QTZ-AC e QTZ-AG apresentaram sintomas de hipersensibilidade mais intensos em tomateiro, já os grupos MRF-ATR, MRF-VD, QTZ-ATR e QTZ-VD reagiram positivamente em tabaco.

Todos os isolados causaram patogenicidade em trigo, o isolado com colônias de coloração amarela clara foram patogênicos ao trigo e a cevada. Os isolados com colônias amarelas gomosas causaram sintomas em plantas de trigo, aveia e cevada. Os isolados com colônias de coloração creme com pigmento difusível verde em meio de cultura e os de coloração amarela forte, foram patogênicos ao trigo, ao arroz e a cevada. Os isolados que apresentaram colônias amarelas translúcidas a luz foram capazes de causar doença em todos os hospedeiros testados.

Os testes LOPAT foram realizados apenas com os isolados que apresentaram características coloniais do gênero *Pseudomonas*. Ao realizar os testes com os isolados, observou-se que houve reação igual a todos os testes, exceto para reação de oxidase, que foi positiva para as bactérias com colônia creme e pigmento verde difusível, enquanto que as bactérias com colônias amarelas translúcidas à luz reagiram negativamente para este teste.

Os testes básicos de identificação permitiram a formação de dois grandes grupos: Grupo I - gênero *Xanthomonas*, identificados para este gênero pela produção de xantomonadina e, por terem células em forma de bastonetes, individuais ou em pares, móveis e estritamente aeróbicas, Gram negativas, oxidase negativa e reação alcalina em leite de lítimo, apresentam colônias amarelas com superfície lisa e gomosa, e por terem causado reação de hipersensibilidade em tomateiro e tabaco. Grupo 2 - gênero identificado como *Pseudomonas* através do teste LOPAT, com células em bastonete reto, móvel, Gram negativas, estritamente aeróbicas e apresentaram reação ácida em leite de lítimo. As colônias são de coloração amarela translúcida a luz e creme, produção de pigmento fluorescente e pigmento difusível no meio de cultura.

Todos os isolados foram capazes de realizar nucleação do gelo. Nas regiões tritícolas são comuns temperaturas que possibilitam as bactérias à formação de nucleação do gelo, fenômeno este, que tem propiciado aumento das epidemias por bacterioses.

Em relação aos meios de cultura, o meio YDC proporcionou observar a coloração amarela das bactérias do gênero *Xanthomonas*. Já o meio B de King possibilitou visualizar o pigmento fluorescente liberado pelos isolados do gênero *Pseudomonas* sob luz ultravioleta em 24 horas. No meio WBC, descrito como meio semi-seletivo para *X. t. pv. undulosa*, apenas os isolados com características das colônias amarelas e gomosas apresentaram crescimento em 48-72 horas. O meio de cultura semi-seletivo XTS é utilizado para a identificação de *X. t. pv. translucens*, este meio favoreceu o crescimento do grupo de bactérias com características coloniais amarela forte em 48-72 horas.

Os grupos de bactérias MRF-ATR e QTZ-ATR apresentaram características semelhantes, sendo que o sistema

Biolog GEN III Micro-Plate™ detectou um percentual de 95% de semelhança comparada ao modelo padrão do sistema para a espécie *Pseudomonas fuscovaginae*. Os isolados de *P. fuscovaginae* mostraram-se patogênicos às plantas arroz, de cevada e de trigo, causando hipersensibilidade em plantas de tabaco. Esse isolado não utilizou 2-ketogluconato e não produziu ácido a partir de trealose, sendo oxidase positiva e arginina dihidrolase positiva, característica esta citada por Duveiller (2011) como fundamental para distinguir *P. fuscovaginae* de outras *Pseudomonas* fluorescentes.

Os grupos com característica amarela gomosa, amarela forte e amarela clara pertencem à espécie *X. translucens* pelo grau de similaridade encontrado em comparações com as bactérias "Tipo" *X. t. pv. cerealis* 580 - ICMP 1409, *X. t. pv. translucens* 581 - ICMP 5752 e *X. t. pv. undulosa* 579 - ICMP 5755.

Pode-se observar a formação de oito grupos pelo método de ligação média entre grupos (UPGMA) (Figura 1), permitindo o agrupamento de bactérias com maior similaridade.

O grupo I foi formado apenas pelos isolados do gênero *Pseudomonas*, assim como pelas bactérias "tipo" pertencentes à este gênero, apresentando aproximadamente 20% de similaridade. O grupo II foi formado pelas bactérias isoladas das sementes e as bactérias "tipo" 581, 579 e 580 pertencentes ao gênero *Xanthomonas* com aproximadamente 15% de similaridade. No V grupo de isolado manteve-se os isolados BRS-AF e a bactéria "tipo" *X. t. pv. translucens* 581. No grupo VI, por sua vez, foram alocados às bactérias pertencentes aos grupos MRF-AG, QTZ-AG, BRS-AG junto a bactéria "tipo" 579 (*X. t. pv. undulosa*). Os grupos BRS-AC, MRF-AC foram alocados ao grupo filogenético VII. O grupo VIII foi composto pelo isolado QTZ-AC e pela bactéria *X. t. pv. cerealis* (580).

No grupo III encontram-se o grupo de isolados QTZ-VD, MRF-VC os quais se agruparam à bactéria "tipo" *P. s. pv. syringae* 1022. Analisando o grupo IV, observa-se a bactéria "tipo" *P. fuscovaginae* 743 e o grupo dos isolados QTZ-ATR, MRF-ATR.

A análise multivariada aplicada aos dados mostrou-se adequada à matriz pelo elevado índice de correlação cofenética obtido (0,99). Isto demonstra que os testes realizados para caracterizar as bactérias fitopatogênicas detectadas em sementes de trigo apresentam robustez para identificar os grupos de isolados.

4. DISCUSSÃO

No método de deposição direta das sementes sobre o meio de cultura 523 não foi possível analisar com precisão a presença de bactérias fitopatogênicas junto às sementes devido ao grande número de contaminantes sendo imprecisa a avaliação da incidência. Porém, quando foi realizada a semeadura direta das sementes sobre o meio de cultura semi-seletivo WBC (DUBIN; DUVEILLER, 2011) foi possível calcular a incidência dos grupos de isolados com características morfológicas coloniais de *Xanthomonas*.

León et al. (2008) avaliaram diferentes métodos para detecção de bactérias em sementes de tomate, verificando que os meios semi-seletivos são uma opção com grande potencial em comparação com meios tradicionais e métodos de sorologia, por serem capazes de detectar baixas concentrações de patógenos e reduzirem o crescimento de saprófitos. Iqbal et al. (2013) obtiveram em seus estudos no Paquistão, incidências variando de 20 a 80 % de *X. t. pv. undulosa* em folhas de

plantas de trigo, isolando o patógeno a partir de folhas com a presença de sintomas da estria bacteriana.

Valencia-Botín (2007) e Zavaleta-Mancera et al. (2007) trabalhando com sementes de trigo inoculadas artificialmente com *P. syringae* pv. *atropaciens* e *P. syringae* pv. *syringae* e posteriormente semeadas, demonstraram que houve transmissão do patógeno para as plântulas ao detectar a presença dos sintomas. Sementes infestadas e, ou infectadas com bactérias constituem fator relevante, tendo em vista, a possibilidade destas de virem a ser transmitidas para as plântulas e com isso afetar o desenvolvimento da cultura (BOTÍN et al., 2007).

Por serem estas bacterioses esporádicas na cultura do trigo, muito ainda falta para se entender o complexo planta-hospedeiro. Bactérias, pertencentes ao gênero *Pseudomonas* na cultura do trigo, embora classificadas como de baixa importância, segundo Duveiller (2011) diminuíram o rendimento da cultura entre 5 a 20% no México.

Pelas reduzidas formas de controle dessas doenças, a melhor maneira de reduzir danos causados por tais bactérias é evitar o semeio de sementes infectadas (IQBAL et al., 2013).

Deste modo, a detecção de patógenos em sementes é fundamental para evitar o aparecimento da doença.

A detecção e identificação de bactérias em sementes nem sempre é possível utilizando-se meios de cultura. Como observado neste estudo os meios semi-seletivos são os mais eficientes, entretanto, para muitos patógenos não há um meio semi-seletivo desenvolvido, ou ainda a concentração do patógeno no lote de semente é baixo e por isso não é detectado. Desse modo, deve-se para casos em que se sabe que essas bactérias podem vir a causar grandes prejuízos utilizar outras metodologias como técnicas moleculares. Diversos métodos moleculares têm sido desenvolvidos para a detecção de patógenos (CUI et al., 2016; FORY et al., 2014), contudo, pela sua complexidade e elevados custos a sua utilização ainda é reduzida.

Cottyn et al. (2009) realizaram testes buscando detectar bactérias em sementes de arroz, verificando uma grande diversidade morfológica e genética nos isolados obtidos, dentre eles identificaram bactérias do gênero *Pseudomonas* e confirmaram a sua patogenicidade.

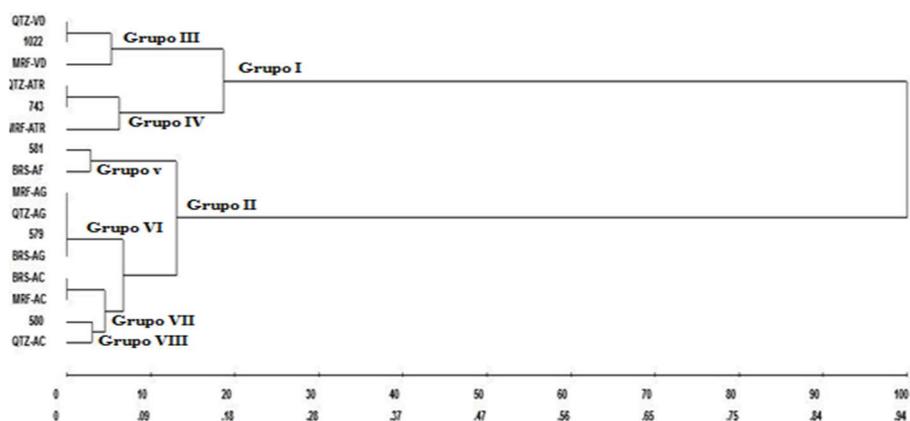


Figura 1. Dendrograma de dissimilaridades entre 16 isolados de bactérias fitopatogênicas isoladas de sementes de trigo, obtido pelo método UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade com dados multicategóricos. No eixo x encontram-se as distâncias relativas e no eixo y encontram-se os isolados.

Figure 1. Dendrogram of dissimilarities among 16 isolates of pathogenic bacteria isolated from wheat seeds, obtained by the UPGMA method, based on dissimilarity matrix with multicategorical data. In the x-axis are the relative distances and in the y-axis are the isolates.

5. CONCLUSÕES

Para a utilização de rotina em patologia de sementes, pode-se afirmar que o tamanho da amostra a ser analisada e períodos de incubação interferem no número de UFC/semente, assim como, utilizando sementes trituradas obtêm-se o maior número de UFC/semente. As bactérias isoladas das sementes de trigo pertencem às espécies *X. translucens*, *P. fuscovagine* e as demais ficando no gênero *Pseudomonas*.

6. AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos de mestrado ao primeiro autor.

6. REFERÊNCIAS

BOTÍN, V. J. A.; LOPEZ, C. E. M. A Review of the Studies and Interactions of *Pseudomonas syringae* Pathovars on Wheat. **International Journal of Agronomy**, p. 2-5, 2012. DOI: <https://dx.doi.org/10.1155/2012/692350>
 BOTÍN, V. A. J.; ONOFRE, M. L. E.; ROJAS, S. H. V. Indicadores de agresividad y métodos de inoculación con

bacterias fitopatogenas en plantulas y semillas de trigo SerIM82. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Montecillo, v. 30, n. 3, p. 255-259, 2007.
 COTTYN, B.; DEBODE, J.; REGALADO, E.; MEW, T.W.; SWINGS, J. Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 107, n. 3, p.885-897, 2009. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04268.x>
 CUI, Z.; OJAGHIAN, M. R.; TAO, Z.; KAKAR, K. U.; ZENG, J.; ZHAO, W.; DUAN, Y.; VERA CRUZ, C. M.; LI, B.; ZHU, B.; XIE, G. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of six major bacterial pathogens of rice. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 120, p. 1357-1367, 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/jam.13094>
 DUBIN, H. J.; DUVEILLER, E. Fungal, bacterial and nematode diseases of wheat: breeding for resistance and other control measures. In *TheWorldWheat Book: Hist. Wheat Breeding*, Vol. 2, ed. A.P. Bonjean, W.J. Angus, M. Van Ginkel, pp. 1131-81. Paris: Lavoisier. 2011.

- DUVEILLER, E. A.; MARAITE, H. Bacterial Rot of wheat caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in the highlands of Mexico. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 11, p. 932-935, 1990. DOI: <https://dx.doi.org/10.1094/PD-74-0932>
- FORY, P. A.; TRIPLETT, L.; BALLEEN, C.; ABELLO, J. F.; DUITAMA, J.; ARICAPA, M. G.; PRADO, G. A.; CORREA, F.; HAMILTON, J.; LEACH, J. E.; TOHME, J.; MOSQUERA, G. M. Comparative analysis of two emerging rice seed bacterial pathogens. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 104, p. 436-444, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0186-R>
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, California, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970. DOI: <https://10.1094/Phyto-60-969>
- KAWAGUCHI, A.; YOSHIOKA, R.; MORI, M.; NISHIMURA, F.; KAWATA, K.; TOMIOKA, K.; TAKEHARA, T. Spatiotemporal distribution of barley and wheat plants naturally infected with bacterial black node in fields in western Japan. **Journal of General Plant Pathology**, v. 84, n. 1; p. 35-43, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s10327-017-0757-0>
- KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal laboratory clinical medical**, London, v. 44, n. 3, p. 301-307, 1954.
- LANGLOIS, P. A.; SNELLING, J.; HAMILTON, J. P.; BRAGARD, C.; KOEBNIK, R.; VERDIER, V.; TRIPLETT, L. R.; BLOM, J.; TISSERAT, N. A.; LEACH, J. E. Characterization of the *Xanthomonas translucens* complex using draft genomes, comparative genomics, phylogenetic analysis and diagnostic LAMP assays. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 107, n. 5, p. 519-527, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-16-0286-R>
- LEON, L. de; RODRIGUEZ, A.; LOPEZ, M. M.; SIVERIO, F. Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for the detection of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 776-786, 2008. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03595.x>
- MATVEEVA, I. E. V.; PEKHTEREVA, E. Sh.; POLITYKO, V. A.; IGNATOV, V. A.; NIKOLAEVA, E. V.; SCHAAD, N. W. Distribution and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*, causal agent of basal glume rot, in Russia. In: IACOBELLIS, N. S.; COLLMER, A.; HUTCHESON, S. W.; MANSFIELD, J. W.; MORRIS, C. E.; MURILLO, J.; SCHAAD, N. W.; STEAD, D. E.; SURICO, G.; ULLRICH, M. S. ***Pseudomonas syringae* and related pathogens, biology and genetic**. Netherlands: Kluwer academic publishers, 2003. p. 97-105.
- SCHAAD, N. W.; CHEONG, S. S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N. J. A combined biological amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, Illinois, v. 85, n. 2, p. 243-248, 1995. DOI: <https://10.1094/Phyto-85-243>
- VALENCIA-BOTÍN, A. J. **Caracterización, identificación, colonización y repercusión agronomica de bacterias fitopatogenas en trigo**. Tesis de Doctor en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico, 2007.
- XU, Y.; ZHU, X.; ZHOU, M.; KUANG, J.; ZHANG, Y.; SHANG, Y.; WANG, J. Status of Streptomycin Resistance Development in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in China and their Resistance Characters. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 158, n. 9, p. 601-608, 2010. DOI: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01657.x>
- ZAVALETA-MANCERA, H. A.; LÓPEZ-DELGADO, H.; LOZA-TAVERA, M.; MORA-HERRERA, C.; TREVILLA-GARCÍA, M.; VARGAS-SUÁREZ, M.; OUGHAM, H. Cytokinin promotes catalase and ascorbateperoxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 12, p. 1572-1582, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.02.003>