

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Pseudomonas*
spp. EM SEMENTES DE TRIGO

MARISSÉIA RAAB

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, abril de 2014

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DETECCÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Pseudomonas*
spp. EM SEMENTES DE TRIGO

MARISSÉIA RAAB

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Norimar D'Ávila Denardin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, abril de 2014

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“Detecção e identificação de *Pseudomonas spp.* em sementes de trigo”

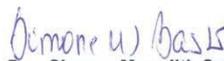
Elaborada por

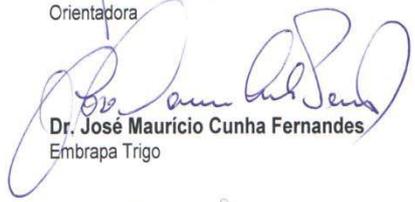
Marisséia Raab

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em
Agronomia – Fitopatologia

Aprovada em: 28/04/2014
Pela Comissão Examinadora


Dra. Norimar D'Ávila Denardin
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia


Dr. José Mauricio Cunha Fernandes
Embrapa Trigo


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dra. Andréa Bittencourt Moura
UFPEL

CIP – Catalogação na Publicação

R111dRaab, Marisséia

Detecção e identificação de *Pseudomonas* spp. em sementes de trigo/ Marisséia Raab. – 2014.
84f. : il. color. ; 25 cm.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2014.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Norimar D'Ávila Denardin.

1. Agronomia. 2. Trigo – Doenças e pragas. 3. Trigo - Cultivo. 4. Fitopatologia.I. Denardin, Norimar D'Ávila, orientadora. II. Título.

CDU: 633.11

Catálogo: Bibliotecária Fernanda Spíndola - CRB 10/2122

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me dar o dom da vida e por iluminar meu caminho com força e coragem para prosseguir na busca por meus ideais. Colocando em minha vida a pessoa que me fez acreditar que tudo é possível desde que se tenha e faça com amor. Obrigada José Domingos Lemos Teixeira, eterno amor, amigo, companheiro para toda a vida.

Em especial, quero agradecer à minha família, principalmente, meus pais Elio e Lúcia, pelo exemplo de vida digna na qual sempre irei me espelhar, pelo apoio e incentivo, dando mais do que o necessário para superar todos os obstáculos na caminhada acadêmica e na elaboração deste trabalho.

Sinceros agradecimentos à Ciência, ao PPGAgro Fitopatologia e principalmente, à Dra. Norimar D'Ávila Denardin por ter sido essencial na escolha deste caminho percorrido.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 A cultura do trigo.....	16
2.2 A triticultura e as bacterioses.....	20
2.3 Gênero <i>Pseudomonas</i>	22
2.3.1 Classificação taxonômica.....	22
2.3.2 Características fisiológicas, bioquímicas, celulares e de patogenicidade.....	23
2.3.3 <i>Pseudomonas syringae</i>	24
2.3.4 Fontes de inóculo de <i>Pseudomonas syringae</i>	26
2.3.5 Dispersão e infecção de <i>Pseudomonas syringae</i>	27
2.3.6 Controle de <i>Pseudomonas syringae</i>	27
2.3.6.1 Resistência de plantas.....	28
2.3.6.2 Controle biológico com antagonistas bacterianos....	28
2.3.6.3 Controle químico.....	29
2.3.7 A bactéria <i>Pseudomonas syringae</i> subsp. <i>syringae</i>	30
2.3.8 A bactéria <i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	33
2.4 A importância da semente para a disseminação de bactérias.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Bactérias “tipo” de <i>Pseudomonas</i> spp.	41
3.2 Detecção e incidência de bactérias em sementes de trigo.....	42
3.3 Germinação.....	43

3.4 Isolamento e seleção de bactérias junto à sementes.....	43
3.5 Reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco.....	44
3.6 Teste de patogenicidade em folhas de trigo.....	44
3.7 Características culturais e morfológicas.....	45
3.8 Características fisiológicas, nutricionais, bioquímicas e tintoriais.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Sanidade de sementes de trigo.....	47
4.2 Incidência de <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Xanthomonas</i> spp. em sementes de trigo.....	47
4.3 Germinação.....	48
4.4 Isolamento e seleção das bactérias das sementes de trigo.....	49
4.5 Reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco.....	50
4.6 Patogenicidade dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp.	51
4.7 Características culturais.....	55
4.8 Características fisiológicas, nutricionais, bioquímicas e tintoriais.....	57
4.9 Preservação dos isolados.....	70
5 CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Relação das cultivares de trigo e do número das amostras, da origem e da safra das sementes empregadas no estudo.....	41
2	Germinação de sementes de trigo em relação à incidência de bactérias fitopatogênicas nas amostras de trigo.....	49
3	Caracterização dos 72 isolados de colônias crescidas junto às sementes de nove amostras de trigo.....	58
4	Comparação das características resultantes dos isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 de <i>Pseudomonas</i> spp. isoladas de sementes de trigo, com as espécie de <i>P. fuscovaginae</i> , <i>P. cichorii</i> , <i>P. fluorecens</i> (estirpes A, B, C, F e G), <i>P. putida</i> , <i>P. marginalis</i> e <i>P. syringae</i> , adaptado de Schaad et al. (2001), Duveiller et al. (1997), Lelliot & Stead (1987) e Krieg & Holtz (1984).....	60
5	Comparação das características entre os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 de <i>Pseudomonas</i> spp. isolados de amostras de sementes de trigo utilizando o Kit Bactray I e II.....	65
6	Comparação das características entre os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 de <i>Pseudomonas</i> spp. retirados das amostras de sementes de trigo e as fitobactérias <i>P. syringae</i> subsp. <i>syringae</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> , <i>P. cichorii</i> , <i>P. fuscovaginae</i> , <i>Burkholderia glume</i> , <i>Acidovorax avene</i> subsp. <i>avena</i> (resultados do Biolog GEN III Micro-Plate™) e ICMP11283 (isolado de <i>P. fuscovaginae</i> na Austrália, Cother, 2009).....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Incidência de <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Xanthomonas</i> spp. em sementes de cultivares de trigo, oriundas dos municípios de Ijuí, Passo Fundo e Tupanciretã, estado do Rio Grande do Sul, safras 2010, 2011 e 2012.....	48
2	Reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco positiva para o isolado do grupo 1 (A), isolado do grupo 2 (B) e isolado do grupo 3 (C) e controle negativo (D).....	50
3	Folha de trigo com exsudação bacteriana dos isolados do grupo 1 de <i>Pseudomonas</i> sp. (A), crescimento em meio de cultura da fitobactéria isolada da folha com exsudação (B), sintomas a partir de inoculação com palito, tanto na folha como na espiga (C, D, E, F e G).....	52
4	Semente de trigo com exsudação bacteriana dos isolados do grupo 2 de <i>Pseudomonas</i> sp. (A), folha de trigo inoculada com um dos isolados do grupo 2 e presença de exsudação bacteriana (B), sintomas a partir da inoculação com palito (C, D e E).....	52
5	Folhas e espiga de trigo inoculadas com isolados do grupo 3 de <i>Pseudomonas</i> sp. através da técnica do palito (A, B, C e D).....	53
6	Folhas de tomateiro controle negativo (A), folhas inoculadas com isolado do grupo 1 de <i>Pseudomonas</i> sp., sintomas após um, três e 23 dias respectivamente (B, C, D e E), mancha cor palha a castanho escuro com bordas roxo/preto (E).....	54
7	Colônias do isolado do grupo 1 de <i>Pseudomonas</i> sp. 48 horas (A), 72 horas (B) e 60 dias (C).....	55

Figura		Página
8	Isolado 2 em meio 523 colônias pequenas de cor creme (A), Isolado 3 em meio 523, colônias de coloração creme e serrilhadas (B), após cinco dias colônias cremes translúcidas e bordos transparente (C), após 15 dias de incubação (D).....	58
9	Atividade pectolítica negativa para pimentão (A) e para discos de batata (B) dos isolados do grupo 1 de <i>Pseudomonas</i> sp.....	61
10	Elevação das colônias bacterianas em meio Levan pela produção de levana e também ocorre formação de bolhas de ar (A, B, C e D).....	62
11	Testemunha, meio B de King sem bactéria (A), meio B de King contendo isolado do grupo 1 de <i>Pseudomonas</i> sp. e formação de pigmentação castanho-claro a partir de 4 dias (B), castanho-escuro com 11dias após incubação (C), meio de King B com 24 horas de incubação, sob luz UV apresentando pigmento fluorescente difusível amarelo-esverdeado (D e E), meio B de King com 48 horas de incubação apresentando pigmentação difusível amarelo-esverdeado (F).....	63
12	O isolado do grupo 3 em meio B de King, sete dias após a incubação (A), 14 dias após a incubação (B), após seis meses o meio tornou-se marrom (C), meio B de King sem inóculo (D).....	63
13	Nucleação do gelo realizado por isolados do grupo 1 de <i>Pseudomonas</i> sp. a -2,5 °C (A), solução fisiológica pura não ocorreu nucleação do gelo (B) e sementes de trigo formando blocos de gelo (C)...	64

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE *Pseudomonas* spp. EM SEMENTES DE TRIGO

MARISSÉIA RAAB¹

RESUMO - Vários são os patógenos que causam doenças na cultura do trigo (*Triticum aestivum*). Entre esses, estão as bactérias, que se encontram disseminadas em todas as regiões produtoras de trigo do mundo e do Brasil, com destaque para os gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. Nesse sentido, este trabalho objetivou detectar e identificar a presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* em amostras de sementes de diferentes cultivares de trigo cultivadas no Rio Grande do Sul. As amostras de sementes utilizadas foram oriundas de três locais (Ijuí, Passo Fundo e Tupanciretã) e de três safras (2010, 2011 e 2012), contemplando seis cultivares (Mirante, Quartzo, BRS 327, BRS 331, BRS Guamirim e Marfim). Para as análises, foram empregadas nove amostras. O processo analítico utilizou caixas acrílicas, tipo Gerbox, contendo meio de cultura 523, onde foram distribuídas 25 sementes por Gerbox, perfazendo 500 sementes de cada amostra e de cada cultivar. A seguir, os isolados das bactérias foram purificados em meio de cultura 523 e identificados mediante comparação com as bactérias “Tipo”. Para tanto, foram realizados testes bioquímicos, fisiológicos e de patogenicidade em plantas de trigo, bem como a utilização do Kit Bac tray e do sistema de identificação Biolog GEN III Micro-Plate™. Formaram-se três grupos de isolados com

¹ Eng. Agr., mestranda da Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - Universidade de Passo Fundo.

características semelhantes. Em todas as amostras de sementes analisadas detectou-se isolados de bactéria com características do gênero *Pseudomonas*, sendo que os isolados do grupo 2 possuíram reação de oxidase negativa, mas dihidrolase de arginina e reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco positivas. Os isolados do grupo 3 apresentaram reação positiva para oxidase, dihidrolase de arginina e reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco. Em 67% das amostras houve isolados do grupo 1, identificados como da espécie *P. fuscovaginae*, caracterizada pela reação positiva para oxidase e dihidrolase de arginina, reação positiva para hipersensibilidade em plantas de tabaco e sua incapacidade de utilizar 2-ketogluconato e produzir ácido a partir de inositol. Todos os isolados foram patogênicos às plantas de trigo.

Palavras-chave: bacteriose, disseminação, patogenicidade.

DETECTION AND IDENTIFICATION OF *Pseudomonas* spp. IN SEEDS OF WHEAT

ABSTRACT - There are several pathogens that cause diseases in wheat (*Triticum aestivum*). Among these are the diseases caused by bacteria, which are spread in all wheat producing areas of Brazil. In this group are the *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. In order to verify the presence of these in wheat seeds work aimed to detect and identify the presence of bacteria in the group of *Pseudomonas* at different seed samples of different wheat cultivars. The seed samples used for the study were from three sites in RS (Ijuí, Passo Fundo and Tupanciretã),

the 2010, the 2011 and 2012 harvest. To verify the presence of bacteria in the seeds were analyzed six cultivars, namely: Mirante, Quartzo, BRS 327, BRS 331, BRS Guamirim and Marfim. The analysis comprised a total of nine samples, which were subjected to analysis for detection of bacteria using plastic boxes of the type containing culture medium Gerbox 523. Were distributed 25 seeds per seedling in a total of 500 seeds per sample for each cultivar. After the isolates were purified in culture medium 523 of Kado. The identification was carried out along the bacteria "type". For this purpose, biochemical, physiological and pathogenicity testing in wheat plants as well as the identification Bactray Kit and Biolog GEN III Micro -Plate TM system were made. They formed three groups of isolates with similar characteristics. In all samples of wheat seeds analyzed there were detected bacteria of the genus *Pseudomonas* being that strains of group 2 had a negative oxidase reaction, but dihidrolase arginine and hypersensitivity in positive tobacco plants. Strains of group 3 showed a positive reaction for oxidase, arginine and dihidrolase hypersensitive response in tobacco plants. And 67% of the samples had strains of group 1, identified as the species *P. fuscovaginae* characterized by positive reaction for oxidase and dihidrolase arginine, positive reaction for hypersensitivity in tobacco plants and their inability to use 2-ketogluconato and produce acid from inositol. All isolates were pathogenic to wheat plants.

Key words: bacteriosis, dissemination, pathogenicity.

1 INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) representa 30% da produção mundial de grãos, sendo utilizado na alimentação humana e animal e na elaboração de produtos não alimentícios. A produção brasileira de trigo corresponde, em média, a 0,65% da produção mundial. O consumo interno de 10,4 milhões de t/ano denota um déficit de 7,01 milhões de t/ano, que são supridos mediante importação do produto ao custo aproximado de US\$ 2,2 bilhões. Esses recursos poderiam ser poupados e aplicados em investimentos para a elevação e o melhoramento da produção nacional de trigo (CONAB, 2013).

A produção anual brasileira é variável em função de fatores abióticos e fatores bióticos, que limitam a produtividade. Entre esses fatores, se destacam as condições climáticas, que favorecem a incidência de doenças incitadas por fungos, bactérias e vírus. Porém, o fator que, sem dúvida, contribui decisivamente para a frustração de safras é a disseminação de doenças através de sementes com baixa qualidade fitossanitária, que concorrem, expressivamente, para a redução da produtividade e da produção da cultura e da competitividade do agronegócio.

O uso de sementes comprovadamente sadias é uma forma simples, segura e econômica de prevenir a ocorrência de diversas patologias no campo. Assim, a produção, avaliação e subsequente utilização de sementes livres de patógenos são medidas relevantes para a prevenção de diversas doenças na cultura de trigo.

O desenvolvimento de cultivares resistente a determinadas fitobactérias necessita de atenção diferenciada, pois a resistência de planta a uma determinada fitobactéria é definida, sob o aspecto genético funcional, como sendo a capacidade da planta em evitar ou retardar a entrada ou a subsequente atividade fitobacteriana em seus tecidos. Por outro lado, as bactérias têm desenvolvido uma variedade de mecanismos para sobrepor as barreiras físicas e químicas das plantas e, assim, se estabelecer e prover sua sobrevivência na planta. Esses mecanismos decorrem da habilidade do patógeno em produzir uma variedade de compostos para viabilizar a infecção da planta hospedeira e incitar a doença.

Entre as bactérias incitadoras de doenças em trigo, os gêneros de importância econômica são *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. A ocorrência do gênero *Pseudomonas* tem sido frequente em regiões de clima temperado e subtemperado, como as regiões tritícolas do Rio Grande do Sul, pois é favorecida por temperaturas amenas (15 °C a 25 °C) e umidade relativa do ar superior a 60% (PIRES et al., 2011). A presença de bactérias desse gênero pode ser detectada em sementes, no solo, em restos culturais e na água.

A ocorrência do gênero *Xanthomonas* é mais frequente em regiões tropicais, onde a temperatura diurna é igual ou superior a 25 °C, associada a períodos de três a cinco dias de água livre na superfície das folhas das plantas (KIETZEL & RUDOLPH, 1997; PIRES et al., 2011).

Os danos são aparentes quando ocorre o sintoma da doença, porém a mensuração destes é minuciosa, pois as interações entre duas ou mais doenças em determinado hospedeiro podem

produzir efeitos antagônicos, neutros e sinérgicos. Portanto, a ocorrência de doenças incitadas por esses gêneros depende de um conjunto de fatores favoráveis relativos ao hospedeiro, ao patógeno e ao ambiente. Cada doença apresenta graus distintos de complexidade, tanto na epidemiologia como no sistema de manejo, porém o que as doenças têm em comum são os danos e as perdas, com prejuízos ao produtor e ao agronegócio.

Este trabalho teve por objetivo detectar e identificar a presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* em amostras de sementes de diferentes cultivares de trigo cultivadas no Rio Grande do Sul, a fim de descrever suas características de forma a auxiliar na identificação de sintomas em escala de campo, na detecção em laboratório e na avaliação de incidência em sementes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do trigo

O trigo é um cereal utilizado na alimentação humana (farinha, macarrão, biscoitos, bolos, pães etc.), na alimentação animal (forragem, grão e composição de ração), bem como na elaboração de produtos não alimentícios (misturas adesivas ou de laminação para papéis ou madeira, colas, misturas para impressão, agentes surfactantes, embalagens solúveis ou comestíveis, álcool, na composição de antibióticos, vitaminas, fármacos, cosméticos etc.) (PIRES et al., 2011).

O trigo é cultivado em 51,9% dos 193 países do mundo (USDA, 2012). Na safra 2012/2013, a produção mundial de trigo foi a segunda em expressão, atingindo 677,5 milhões de toneladas, sendo superada apenas pela cultura do milho (*Zea mays* L.), com 868,06 milhões de toneladas. A União Européia liderou a produção de trigo, nesta safra, com 270,8 milhões de toneladas (MAPA, 2013).

Na safra 2012, a produção de trigo no Mercosul atingiu 20,2 milhões de toneladas, e no Brasil, 4,379 milhões de toneladas, correspondendo a 0,65% da produção mundial (MAPA, 2013) e ocupando a quarta posição na produção de grãos do país. A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a primeira, com 71,287 milhões de toneladas, o milho a segunda, com 29,020 milhões de toneladas, e o arroz (*Oryza sativa* L.) é a terceira, com 11,462 milhões de toneladas.

A área cultivada com trigo no país é de 1,895 milhões de hectares. O Paraná é o principal estado produtor, com 2,112 milhões

de toneladas, seguido do Rio Grande do Sul, com 1,894 milhões de toneladas (CONAB, 2013).

O consumo nacional, de 10,4 milhões de t/ano, denota um déficit de 7,01 milhões de t/ano, que são supridas pela importação do produto, ao custo aproximado de US\$ 2,2 bilhões. Esses recursos poderiam ser poupados e investidos para o aumento da produção nacional (CONAB, 2013). Desse consumo, estima-se que 94,5% são destinados ao processamento industrial, 2,5% à reserva de sementes e 3,0% são utilizados diretamente na alimentação animal (PIRES et al., 2011).

A cultura de trigo tem demonstrado, em várias regiões do Brasil, amplo potencial de adaptação, com produção de grãos de elevada qualidade e competição comercial, superando a produtividade de regiões tradicionais. Novas fronteiras agrícolas estão surgindo, como nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Distrito Federal, além das áreas tradicionais do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, respeitando o zoneamento agrícola (PIRES et al., 2011).

A produção anual de trigo é variável em função de fatores abióticos e bióticos, os quais limitam a produtividade. Dentre esses, o fator abiótico, relativo às condições ambientais, favorece o surgimento de doenças incitadas por fungos, vírus e bactérias. Porém, o fator que, sem dúvida, contribui decisivamente para frustrações de safras é a ocorrência de doenças e, entre essas, a disseminação daquelas veiculadas por sementes com baixa qualidade fitossanitária, concorrendo expressivamente para a redução da produtividade e da produção da cultura e da competitividade do agronegócio.

Entre as doenças que acometem a cultura do trigo destacam-se:

a) doenças fúngicas, como: doenças do sistema radicial [mal-do-pé (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) e podridão comum das raízes (*Bipolaris sorokiniana*)]; doenças da parte aérea [manchas amarela (*Pyrenophora tritici-repens*), mancha marrom (*Cochliobolus sativus*), mancha da gluma (*Phaeosphaeria nodorum*), oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), ferrugem da folha (*Puccinia triticina*), ferrugem amarela (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) e ferrugem do colmo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*)]; e doenças de espiga [giberela (*Giberella zeae*), brusone (*Magnaphorte oryzae*) e carvão-da-espiga (*Ustilago nuda* f. sp. *tritici*)] (PIRES et al., 2011). Cada uma dessas doenças apresenta graus distintos de complexidade, tanto na epidemiologia como no sistema de manejo, porém o que as doenças têm em comum são os danos e as perdas, ao gerarem prejuízos aos agricultores e, conseqüentemente, ao agronegócio (BOHATCHUK et al., 2008).

b) viroses, como: nanismo-amarelo-da-cevada causado por mais de uma espécie de vírus (*Barley yellow dwarf vírus* (BYDV) e o *Cereal yellow dwarf vírus* (CYDV)) e mosaico-comum causado pelo *Soil-borne wheat mosaic vírus* (SBWMV) (PIRES et al., 2011). Essas viroses causam sintomas de redução de crescimento da planta e amarelecimento das folhas, prejudicando seu desenvolvimento e diminuindo a produção. Para as viroses causadas por BYDV/CYDV, foram estimadas perdas de até 60% em parcelas de cultivares de trigo (BIANCHIN, 2008);

c) doenças causadas por bactérias, como: queima da folha incitada por *P. syringae* subsp. *syringae* (van Hall 1902) Janse 1982 e estria bacteriana incitada por *X. campestris* pv. *undulosa* (MOHAN & MEHTA, 1985; PIRES et al., 2011). Segundo Romeiro (2005) acrescenta-se a essas a queima da bainha causada por *P. fuscovaginae* (ex Tanii et al. 1976) Miyajima et al. 1983 e *X. translucens* pv. *cerealis*, descritas no Brasil. O efeito decorrente de plantas com essas doenças são: alterações metabólicas, modificações no nível de reguladores de crescimento, liberação de exsudatos e outras substâncias, redução no período de incubação, alterações nutricionais na planta, alterações na composição celular da planta hospedeira, acarretando incremento na suscetibilidade das plantas ao patógeno e aumentando a atividade das fitobactérias que acometem a planta (PAULA JÚNIOR et al., 2003).

O fato é que em uma lavoura estão presentes diversas espécies de fitopatógenos, que variam em complexidade estrutural, ciclo infeccioso e condições requeridas para incitar a doença. A ocorrência dessas espécies depende de um conjunto de fatores favoráveis relativos: ao hospedeiro (acúmulo de indivíduos suscetíveis, propensão do hospedeiro à doença e presença de hospedeiros alternativos apropriados); ao fitopatógeno (alta capacidade de infecção, condicionada pela presença de patógeno agressivo, alta capacidade reprodutiva, eficiente dispersão e não haver restrições para seu desenvolvimento); e ao ambiente (condições meteorológicas ótimas para o desenvolvimento do fitopatógeno) (VALE et al., 2004).

2.2 A triticultura e as bacterioses

A lavoura de trigo no Brasil é implantado basicamente em sistema plantio direto (>90% da área cultivada). Há regiões, como as do estado de Goiás, Minas Gerais e do Distrito Federal, em que parte da lavoura é irrigada.

Quanto ao clima, a cultura de trigo diferencia-se da maioria das culturas produtoras de grãos. Na fase inicial do ciclo, tolera geada e requer temperaturas de 15 a 20 °C, fato que minimiza o ataque de pragas e de doenças e impede a aceleração do crescimento apical e, conseqüentemente estimula o afilhamento. Na fase de floração e enchimento de grãos, requer clima com umidade relativa do ar entre 60 a 70% e temperatura entre 20 a 25 °C, por favorecer a floração e a qualidade do grão (PIRES et al., 2011).

As doenças bacterianas, na cultura de trigo, ocorrem tanto em regiões temperadas e subtemperadas, com temperaturas amenas em torno de 15 °C a 25 °C, como em regiões tropicais com temperatura igual ou superior a 25 °C, seguidas de períodos chuvosos (KIETZEL & RUDOLPH, 1997; PIRES et al., 2011). As condições ambientais influenciam na severidade das doenças, com conseqüente efeito no rendimento de grãos. O caráter esporádico das doenças e a deficiência de informação quanto à epidemiologia, e a significativa similaridade com sintomas observados a campo, causados por fitobactérias, têm sido o motivo de poucos esforços para estudo destas doenças.

A resistência da planta a uma determinada fitobactéria é definida, sob o aspecto genético funcional, como sendo a capacidade

da planta em evitar ou retardar a entrada ou a subsequente atividade fitobacteriana em seus tecidos (ROMEIRO, 2005).

Bactérias, por outro lado, têm desenvolvido uma variedade de mecanismos para sobrepor as barreiras físicas e químicas das plantas e, assim, se estabelecer e prover sua sobrevivência na planta. Esses mecanismos decorrem da habilidade do patógeno em produzir uma variedade de compostos para viabilizar a infecção da planta hospedeira e incitar a doença. Toxinas, exopolissacarídeos (EPS), enzimas de degradação de paredes e de certos hormônios são alguns produtos de fitobactérias responsáveis pelo seu estabelecimento na planta. Uma vez estabelecida na planta, inicia-se o ciclo da doença bacteriana, que é constituído pela multiplicação da fitobactéria na planta hospedeira, expressão dos sintomas e produção do inóculo nos tecidos mortos. Ao findar esse ciclo primário, o processo é repetido várias vezes, mediante liberação, remoção, transporte por gotículas de água, deposição, penetração e colonização das células fitobacterianas em novos sítios, resultando na propagação da doença na lavoura (VALE et al., 2004).

Para sobreviver e se multiplicar na superfície das folhas, as bactérias necessitam resistir a períodos de estresse hídrico, elevados níveis de radiação ultravioleta (UV) e se adaptarem a amplitudes térmicas e condições nutricionais variáveis. A formação de biofilmes pode ser uma estratégia utilizada pelas bactérias epífitas para tolerarem as grandes variações das condições ambientais (RUIZ, 2010). A produção de EPS por bactérias fitopatogênicas pode aumentar a sobrevivência fora e no interior dos tecidos do hospedeiro, ser quelante de metais, formar matriz para retenção de água e nutrientes, sendo, por isto, considerado um componente importante na

formação dos biofilmes (COSTERTON et al., 2005), podendo, ainda beneficiar as bactérias do filoplano. Dado que a disponibilidade de água é um dos fatores mais variáveis na superfície da folha, os EPS podem proteger as bactérias da dessecação e do estresse ocasionados por espécies ativas de oxigênio (KIRALY et al., 1997).

Mundialmente, há uma gama de bactérias que causam doenças na cultura do trigo, incluindo os gêneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Burkholderia*, *Erwinia* e *Bacillus* (DUVEILLER et al., 1997). No Brasil, a ocorrência de bacterioses mais comuns na cultura do trigo é ocasionada pelas bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, sendo as mais expressivas as espécies e patovares *P. fuscovaginae*, *P. syringae* subsp. *syringae*, *X. translucens* pv. *cerealis* e *X. translucens* pv. *undulosa* (DUVEILLER & MARAITE, 1990; MARQUES & ROBBS, 1994; ROMEIRO, 2005; MALAVOLTA et al., 2008).

2.3. Gênero *Pseudomonas*

2.3.1. Classificação taxonômica

O gênero *Pseudomonas* Migula 1894, pertence à classe Gamaproteobacteria, ordem Pseudomonadales Orla-Jensen 1921, família Pseudomonadaceae Winslow et al., 1917 (YOUNG et al., 2001; LPSN, 2014).

Uma nova lista, reclassificando espécies e subespécies, foi validada em 1998 (LPSN, 2014) e, de acordo com as características fenotípicas e de patogenicidade em plantas hospedeiras, o grupo está

subdividido em mais de 60 patovares (KUDELA et al., 2002). O gênero *Pseudomonas* compreende 156 espécies reconhecidas (MOORE et al., 2006). Os membros deste gênero podem estar presentes no solo, na água e em muitos outros habitats naturais (PALLERONI, 1992), possuem capacidade de utilizar ampla diversidade de compostos orgânicos, incluindo poluentes ambientais (WACKETT, 2001; ANDERSEN et al., 2000), e podem ser empregados na agricultura como bactérias promotoras de crescimento de plantas (MARIANO et al., 2004).

2.3.2. Características fisiológicas, bioquímicas, celulares e de patogenicidade

As bactérias desse gênero são aeróbias, Gram-negativa, catalase positiva, podendo produzir pigmento fluorescente e, dentre as *Pseudomonas* há dois grupos: oxidase positiva para *P. agarici*, *P. cichorri*, *P. corrugata*, *P. fuscovaginae*, *P. tolaasii*, *P. apleonii*, *P. marginalis*; e oxidase negativa para o grupo das *P. syringae* (WOESE, 1987; SCHAAD, 2001). Apresentam colônias de coloração branca, cinza clara ou creme, as células são em forma de bastonetes, movendo-se por um ou mais flagelos, raramente são imóveis, algumas produzem pigmentos hidrossolúveis chamados de piocianinas (pigmento verde-azulado) e de pioverdina (fluoresceína). Os pigmentos piorrubina (marrom avermelhado) e piomelanina (marrom) desenvolvem-se lentamente e são detectáveis somente após a incubação por uma a duas semanas. Em adição, algumas espécies são patogênicas a humanos,

animais e plantas (BRADBURY, 1986; ZEIGLER & ALVAREZ, 1990; KING et al., 1954).

Estas bactérias possuem propriedades metabólicas variadas, conferindo ampla distribuição em diferentes ambientes. Algumas bactérias são descritas como residentes comuns no filoplano de inúmeras plantas (ROMEIRO, 2005; DELMOTTE et al., 2009), o qual é um habitat único e dinâmico para populações microbianas, onde podem estabelecer relações de protocooperação, mutualismo e parasitismo. São usadas em controle biológico, protegendo as plantas contra fungos. Embora submetidas a mudanças de temperatura, radiação UV e variações de umidade, crescem em abundância no filoplano, mas requerem água para se deslocarem e infectarem. Assim, pode-se afirmar que as condições ambientais são mais relevantes para que ocorra epidemia da doença do que a mera presença de células bacterianas (LINDOW & BRANDL, 2003).

2.3.3 *Pseudomonas syringae*

Esta bactéria é responsável por uma série de doenças economicamente importantes no mundo. Ela infecta uma grande variedade de plantas entre essas frutas, legumes, ornamentais e culturas de grãos. Patovares de *P. syringae* (Van Hall 1902) causam uma variedade de sintomas em plantas, incluindo crestamentos, manchas foliares e galhas. As toxinas geralmente aumentam a virulência de *P. syringae* e a severidade da doença. Dentre as toxinas produzidas por esse grupo, encontram-se coronatina, faseolotoxina, tabtoxina,

syringopeptina e syringomicina (PALMER & BENDER, 1995; STRANGE, 2007).

Fatores importantes sobre doenças causadas por fitobactérias devem ser considerados antes da implementação de medidas de controle, como a realização de diagnóstico dos sintomas e da intensidade da doença, a qual depende da espécie e parte da planta infectada, do patovar de *P. syringae* e do ambiente. Mais de um sintoma poderá ser encontrado em uma única planta simultaneamente, como mudança de cor dos tecidos infectados, gemas dormentes e mortas, manchas necróticas, manchas internervais, cancrios e gomosis (PALMER & BENDER, 1995; ROMEIRO, 2005).

P. syringae é considerada um patógeno fraco, um oportunista que aproveita uma série de predisposições do ambiente e da planta, não havendo um consenso sobre a gravidade da doença. Uma série de fatores torna as plantas mais suscetíveis à infecção, acima de tudo aqueles danos causados pelo congelamento. Ferimentos causados pelo congelamento na planta permitem que a bactéria entre e destrua as células vegetais. Vários são os trabalhadores que relatam o desenvolvimento de sintomas no campo e estes estariam relacionados com temperaturas frias (LINDOW et al., 1978).

Patovares de *P. syringae* podem catalisar a formação de cristais de gelo sobre e no interior dos tecidos das plantas. Estas são geralmente referidas como bactérias ativas de nucleação de gelo. A sua presença na planta serve para elevar a temperatura de congelamento acima daquela a que os tecidos de plantas sensíveis normalmente não congelam. A maioria das plantas sensíveis ao congelamento não tem nenhum mecanismo de tolerância a geadas e

devem ser protegidas contra a formação de gelo para evitar lesões por congelamento (LINDOW et al., 1978).

Atividade de nucleação de gelo de *P. syringae* é conferida por um único gene que codifica uma proteína da membrana externa. Proteínas individuais de nucleação de gelo não servem como núcleos de gelo, mas formam agregados grandes, homogêneos, que coletivamente junto a moléculas de água orientam para uma configuração que imita a estrutura cristalina do gelo, catalisando, assim, a formação de gelo. Moléculas de água orientadas congelam a temperaturas ligeiramente abaixo de zero (-2 a -10 °C) (LINDOW et al., 1978; HIRANO et al., 1985).

2.3.4 Fontes de inóculo de *Pseudomonas syringae*

Várias são as fontes potenciais que asseguram a sobrevivência da *P. syringae*, no entanto, a contribuição relativa de cada fonte para o desenvolvimento da doença é desconhecida. Infecções latentes, dentro de tecidos assintomáticos, podem representar uma importante fonte de inóculo primário. A invasão sistêmica dos tecidos por *P. syringae*, portanto, assume considerável importância ecológica e representa um desafio significativo, quando se trata de controlar a doença através da aplicação de bactericidas via aérea (KIETZEL & RUDOLPH, 1997).

P. syringae também sobrevive na superfície de muitas plantas como lilás-comum (*Syringa vulgaris* L.), frutíferas de caroço, feijão (*Phaseolous vulgaris* L.), trigo, sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), plantas daninhas e, por conseguinte, em condições de

provocar infecção, caso as condições ambientais sejam adequadas (LELLIOTT et al., 1966; BRADBURY, 1986).

2.3.5 Dispersão e infecção de *Pseudomonas syringae*

A bactéria *P. syringae* pode ser levada de um lugar para outro por meio da chuva, de insetos, do vento através de borbulhas infestadas, pelo transporte de mudas de viveiros e por sementes infectadas e infestadas. Equipamentos e ferramentas podem ser meios frequentemente negligenciados de dispersão ou de geração de aerossóis que contêm as bactérias (ROMEIRO, 2005).

A penetração ocorre por aberturas naturais e ferimentos. A multiplicação ocorre nos espaços intercelulares, no caso de fitobactérias causadoras de manchas foliares, e no tecido vascular, quando causadoras de cancos (BRADBURY, 1986; ROMEIRO, 2005).

2.3.6 Controle de *Pseudomonas syringae*

Uma variedade de métodos tem sido testada para o controle de *P. syringae* em plantações comerciais. Ela inclui a gestão cultural, a resistência do hospedeiro, o controle biológico com antagonistas microbianos e o controle químico. Os esforços têm sido dirigidos principalmente, para controlar a doença ou para reduzir o risco de danos provocados pela geada. No entanto, os resultados desses esforços de controle não têm sido sempre bem-sucedidos (ROMEIRO, 2005).

2.3.6.1 Resistência de plantas

Trabalhos de melhoramento para cerejeira (*Prunus* sp.) foram obtidos com sucesso para o controle de *P. syringae*, utilizando germoplasma de plantas resistentes (MARAITE et al., 2007). Contudo, para trigo, soja e outras culturas, ainda são escassas ou inexistentes linhagens com resistência para essa bacteriose (PIRES et al., 2011).

2.3.6.2 Controle biológico com antagonistas bacterianas

O controle biológico tem sido dirigido quase que inteiramente ao controle de geada, usando antagonistas de bactérias para evitar a nucleação de gelo em populações com de *P. syringae* ativas a esse fenômeno (LINDOW et al., 1978). Muitas dessas experiências têm sido bem sucedidas, mas, em Washington, testes de campo em pomares de maçã (*Malus* sp.) e pera (*Pyrus* sp.) não obtiveram sucesso através da aplicação de antagonistas ou bactericidas químicos. Pode haver uma molécula de nucleação de gelo ativa intrínseca no tecido vegetal não relacionada com as bactérias ativas a nucleação de gelo (LINDOW et al., 1978).

Com relação às doenças causadas por fitotoxinas, em que o fitopatógeno é o produtor de uma fitotoxina, que é um determinante de patogenicidade e/ou virulência, é possível, pelo menos em princípio, encontrar um agente de controle biológico que atue detoxificando a fitotoxina produzida (ROMEIRO & GARCIA, 2007).

2.3.6.3 Controle químico

Trabalhos demonstram que compostos de cobre (tais como hidróxido de cobre) e estreptomicina são eficientes para o controle dessa bacteriose (LOPES & QUEZADO-SOARES, 1997). A resistência bacteriana a esses agentes bactericidas pode limitar sua utilidade. Muitos viveiros de produção de mudas de frutíferas têm utilizado pulverizações desses componentes alternando o cobre e a estreptomicina ou combinando-os para reduzir a formação de estirpes resistentes e evitar a fitotoxicidade (ANDERSEN et al., 1991; CARMO et al., 2001).

Melhor controle de *P. syringae* pv. *tomato* (incitadora da mancha bacteriana de tomate) foi avaliado a partir da aplicação de uma mistura de cobre e os fungicidas Maneb ou Mancozeb (CONOVER & GERHOLD, 1981). Essa mistura produz um carbamato de cobre, que é mais eficaz do que apenas cobre. Uma mistura de chlorothalonil, oxicloreto de cobre e Maneb foi registrada para controlar *P. syringae* em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), pêssego (*Prunus pérsica* (L.) Batsch) e nectarina (*Prunus persica* var. *nectarina* (Ait.) Maxim) (CONOVER & GERHOLD, 1981).

Na cultura do trigo as medidas de controle são dificultadas, pois a bactéria é veiculada pela semente, que possibilita a sua disseminação a longas distâncias (YOUNG et al., 1996). O controle mais eficiente e econômico é o uso de sementes livres dessas fitobactérias (MEZZALAMA, 2010) e o uso de cultivares resistentes (PIRES et al., 2011).

2.3.7 A bactéria *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae*

P. syringae subsp. *syringae* é uma bactéria considerada habitante natural das folhas de trigo e das glumas, vivendo como epífita, que em condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (água livre sobre a planta, umidade relativa do ar igual ou superior a 65% e temperatura amena de 15 a 25 °C), a população bacteriana aumenta e penetra por aberturas naturais, como hidatódios e estômatos, ou por ferimentos, e com a ação de toxinas produzidas, observa-se os sintomas de manchas nas folhas (PIRES et al., 2011).

Essa bactéria encontra-se disseminada no mundo e no Brasil. *P. syringae* subsp. *syringae* afeta o trigo, citros (*Citrus* spp.), feijão, tomate, pimentas, cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.) dentre outras (MALAVOLTA et al., 2008). É um patovar extremamente heterogêneo, com ampla gama de hospedeiros: trigo, cevada (*Hordeum vulgare* L.), aveias, centeio (*Secale cereale* L.), triticale (*Triticosecale rimpaii* Wittm.), milho, sorgo, árvores com frutos de caroço, feijoeiro, e muitas plantas daninhas. Em contraste com a maioria dos outros patovares, que são caracterizados por uma gama estreita de hospedeiros, sendo prática comum empregar patovar *syringae* como um repositório para todos os patovares de *P. syringae*, cuja gama de hospedeiros exata é desconhecida (RUDOLPH, 1995).

Sua identificação é extremamente dificultada devido às características fisiológicas e bioquímicas, pois é de difícil diferenciação entre sua família, como por exemplo, em comparação

com *P. syringae* pv. *atrofaciens* (McCull) Young, Dye, Wilkie 1973, classificada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento como praga quarentenária ausente no país (A1), que causa a doença chamada de podridão da gluma (MAPA, 2013).

Os sintomas característicos da podridão da gluma são observados nas folhas e sementes, formando pontos marrons. A infecção precoce causa nanismo nas plantas, as folhas secam e, muitas vezes, ocorre deformação do ápice das folhas, e quando a infecção ocorre nas sementes estas não se desenvolvem. A doença é favorecida por temperatura entre 15 e 18 °C e períodos chuvosos principalmente antes da maturação das sementes (PAIVA et al., 2010). Os sintomas nas folhas são característicos do grupo das *P. syringae* subsp. *syringae* geralmente referidos como crestamento foliar (SELLAM & WILCOXSON, 1976) ou necrose da folha (OTTA, 1974). Nas plantas infectadas por *P. syringae* subsp. *syringae*, os sintomas iniciais aparecem na forma de numerosas e pequenas manchas encharcadas ou aquosas, em torno de 1 mm, que evoluem, no período de dois a três dias, para manchas de coloração branco-amarelada ou verde acinzentado com áreas cloróticas, que podem coalescer, formando áreas com aspecto desidratado na folha bandeira e na primeira e segunda folhas abaixo da folha bandeira, próximo ao estágio de espigamento. A exsudação (pequenas gotículas viscosas) pode se desenvolver junto às lesões sob condições ambientais extremamente úmidas (PIRES et al., 2011).

Nas sementes, a bactéria infecta primeiro as glumas, o lema, a pálea e a cariopse, invadindo e multiplicando-se nos espaços intercelulares dos tecidos das semente (BOTÍN et al., 2011).

A incidência e severidade de *P. syringae* subsp. *syringae* vêm sendo incrementadas ao passar dos anos (BOTÍN et al., 2007), principalmente por ser uma fitobactéria presente nas sementes, que se disseminam facilmente. Os sintomas observados em escala de campo, na região de Passo Fundo, RS, e na Argentina, desenvolveram-se depois de geadas severas (EMBRAPA, 2012). O efeito causado pela doença no rendimento e na produção de grãos bem como na distribuição da biomassa na planta de trigo é desconhecido (BOTIN et al., 2011). Porém, recentes estudos têm sido realizados para caracterizar e identificar o patógeno e para determinar sua agressividade e padrão de colonização em sementes, bem como seus efeitos sobre os componentes de produção, o rendimento de grãos e as relações fonte-dreno durante e após o florescimento. Estudos realizados por Botín et al. (2011) verificaram que a redução na produção de biomassa aérea é a melhor forma de avaliar a agressividade da bactéria. Esses autores relatam que o melhor método para esse estudo seria a inoculação da semente através de pulverização ou de vácuo com a infiltração da bactéria. Em geral, *P. syringae* subsp. *syringae* reduz a altura das plantas de trigo, a produção de sementes e os componentes de rendimento, bem como o crescimento da maioria dos órgãos do trigo. Esta fitobactéria está presente em uma vasta gama de espécies de plantas (BRADBURY, 1986).

Dentre os fatores de virulência ou patogenicidade estão a toxina syringomycina e os polissacarídeos. Esta toxina quando liberada causa distúrbios fisiológicos nas plantas, afeta os reguladores de canais de transporte de íons através da membrana plasmática da célula vegetal, os quais controlam a liberação de nutrientes no

filoplano. Determinantes genéticos para a biossíntese e secreção da toxina syringomycina foram encontrados na maioria das cepas de *P. syringae* subsp. *syringae*. Este fluxo de íons leva à liberação de metabólitos da célula vegetal e, finalmente à lise celular (HUTCHISON & GROSS, 1997). A syringomycina também pode atuar como biosurfactante, que são surfactantes biológicos que formam compostos biodegradáveis, que auxiliam na proteção ambiental, na recuperação de resíduos e óleos e nos cuidados com a saúde e indústria de processamento de alimentos (BUNSTER et al, 1989; SHAFI & KHANNA, 1995; BANAT et al., 2000).

2.3.8 A bactéria *Pseudomonas fuscovaginae*

P. fuscovaginae possui células aeróbias, é Gram-negativa, as células são em forma de bastonete com extremidades arredondas, movendo-se por um a quatro flagelos de inserção lofotríquia. Oxidam a glicose em meio de oxidação-fermentação e produzem um pigmento fluorescente verde difusível em meio B de King. São negativas para a desnitrificação e produção de β -glucosidase, não utilizam o polipectato e não crescem a partir de 37 °C. As características que distinguem esta espécie de outras pseudomonas são dihidrólise de arginina e oxidase positivas, a capacidade para produzir reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e a incapacidade de utilizar 2-ketogluconate ou inositol. Apresenta colônias convexas, de coloração branca a cinza, com margens claras e superfície lisa ou ligeiramente rugosa (BRADBURY, 1986; ZEIGLER & ALVAREZ, 1990; KING et al., 1954).

Considerada como fitopatógeno que causa a queima da bainha ou podridão parda/marrom da bainha de várias plantas incluindo milho, sorgo, (DUVEILLER et al., 1989), trigo, (DUVEILLER & MARAITE, 1990), cevada, azevém (*Lolium perenne* L.), aveia branca (*Avena sativa* L.), bromus (*Bromus marginatus* Nees ex Steud.), prado de gato (*Phleum pratense* L.), capim-amarelo (*Phalaris arundinacea* L.), salsa (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A. W. Hill), couve (*Brassica oleracea* L.), alface (*Lactuca sativa* L.), limão (*Citrus limon* (L.) Burm), mas não aparente em duas espécies de Solanaceae e seis espécies de Fabaceae (MIYAJIMA et al., 1983).

Em cultivo de arroz, a bactéria *P. fuscovaginae* encontra-se distribuída em vários países da África, das Américas, da Ásia e da Europa, reduzindo a produtividade desta espécie em até 72,2% na Indonésia (CAHYANIATI & MORTENSEN, 1997), aproximando-se a 100% em Madagascar (ROTT, 1987), além de reduzir a qualidade e o valor nutricional dos grãos. Cultivares suscetíveis podem apresentar até 30% de descoloração dos grãos (CORTESI & PIZZATTI, 2008). No México, foi constatada redução de biomassa da ordem de 18 a 39% (BOTÍN et al., 2007). Na Austrália, esta bactéria foi relatada pela primeira vez, em plantas de arroz, em 2009, quando causou sintomas na bainha e panícula e esterelidade dos grãos (COTHER et al., 2009). No Brasil, há relatos de *P. fuscovaginae* afetando as culturas de arroz, trigo e aveia (MALAVOLTA et al., 2008; ROMEIRO, 2005).

No México, observações realizadas em bainhas foliares de trigo pão, trigo duro e triticale, nos estádios iniciais das culturas, permitiram descrever sintomas como: lesões castanho-escuro com 10

a 20 cm de comprimento, delimitadas por um contorno roxo/negro com área angular de 12 milímetros de largura, mostrando no centro cor acinzentada (DUVEILLER & MARAITE, 1990). Estas lesões diminuem a área foliar fotossinteticamente ativa e, conseqüentemente prejudicam a produção de fotoassimilados responsáveis pelo desenvolvimento das plantas e produção de grãos. Esta doença vem sendo percebida com maior frequência, pois o meio de disseminação são as sementes.

A identificação e caracterização deste patógeno é considerada um processo longo e minucioso, devido à semelhança com outras espécies como *P. fluorescens* e *P. marginalis*, através da caracterização citológica, morfológica e bioquímica (ROTT et al., 1991).

As pseudomonas, que apresentam reação positiva para reação de dihidrólise de arginina e oxidase, pertencem ao grupo IV e V de Lelliott et al. (1966), diferindo de outras espécies por ocorrer reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco (BRADBURY, 1986). *P. fuscovaginae* é uma das 18 espécies de *Pseudomonas*, validamente descritas como espécie fitopatogênica do grupo das bactérias oxidase positiva (ANZAI et al., 2000; HOFTE & DE VOS, 2006). Foi identificada pela primeira vez no Japão, como patógeno de arroz, em 1976 (TANII et al., 1976; MIYAJIMA et al., 1983), em plantas cultivadas em altitudes de 249 a 640 metros acima do nível do mar. Desde 1990, ela é considerada um fitopatógeno de ampla gama de hospedeiros, causando doenças em várias culturas economicamente importantes (DUVEILLER & MARAITE, 1990).

Nas plantas de arroz, no estágio de maturação, ocorre a doença conhecida como queima da bainha ou podridão parda/marrom da bainha. Os sintomas típicos de *P. fuscovaginae* são manchas verdes encharcadas no lado adaxial da folha bandeira. Essas manchas tornam-se marrom principalmente na folha bandeira. Com o passar do tempo, tornam-se alongadas de coloração marrom escuro (ZEIGLER & ALVAREZ 1987; ROTT et al., 1989) e o centro da lesão pode ser marrom claro a cinza (JAUNET et al., 1995). Quando ocorre infecção das panículas jovens, estas descoloram ou apresentam diferentes tons de marrom. Também ocorre a descoloração dos grãos e em casos graves ocorre esterilidade ou baixa emergência de sementes (MIYAJIMA et al., 1983; ZEIGLER & ALVAREZ, 1987; DUVEILLER et al., 1989). É uma doença grave nas regiões temperadas da Ásia, África e América do Sul (COTHER et al., 2009).

A doença ocorre devido à ação de toxinas excretadas pela bactéria, a qual produz três diferentes tipos de metabólitos fitotóxicos: syringotoxin, fuscopeptin A (FP-A) e fuscopeptin B (FP-B), envolvidas na geração dos sintomas (BALLIO et al., 1996; FLAMAND et al., 1996). Syringotoxin pertence a um grupo de metabólitos antifúngicos conhecidos como lipodepsipeptide (PLL), agindo ao nível de membrana, formando canais iônicos e, conseqüentemente, aumentando a permeabilidade da membrana (HUTCHISON & GROSS, 1997; BATOKO et al., 1998). As toxinas fuscopeptina A (FP-A) e fuscopeptina B (FP-B) possuem propriedades tóxicas semelhantes a syringotoxin e são estruturalmente relacionadas com syringopeptin produzidos por estirpes fitopatogênicas de *P. syringae* (BALLIO et al., 1991).

Em outras espécies de poáceas, como (cevada, trigo, milho, aveia) os sintomas são lesões encharcadas nas folhas e, que em seguida tornam-se manchas brancas ou, castanho avermelhado/acinzentado, atualmente conhecido como podridão parda da bainha em outros cereais (PATEL et al., 2012).

A incidência de *P. fuscovaginae* está se tornando generalizada, sendo esta bactéria considerada de grande importância em cereais por possuir ampla gama de hospedeiros e ser transmitida por sementes (BOTÍN & LÓPEZ, 2012). Em avaliações realizadas em plantas de trigo foi constatada a presença de *P. syringae* subsp. *syringae* (EMBRAPA, 2010), confirmando-se a hipótese de que esta bactéria encontra-se disseminada nas lavouras de trigo.

Pesquisas realizadas pela Embrapa Trigo (2012) demonstraram que os sintomas causados por bacterioses são variáveis em função das cultivares de trigo. Porém, não há ainda, no Brasil, resultados de pesquisa que indiquem quais cultivares são resistentes ou suscetíveis as quais bacterioses.

2.4 Importância da semente para a disseminação de bactérias

A produtividade agrícola depende da qualidade das sementes, que são compostas por aspectos genéticos, fisiológicos, físicos e sanitários, os quais, quando avaliados conjuntamente, revelam o valor potencial e real do uso de um determinado lote de sementes (BORÉM, 2005). A semente é o meio mais eficiente de disseminação e sobrevivência desses patógenos (DUVEILLER et al., 1997), sendo responsável pela disseminação de doenças de uma região para outra

(CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). As espécies vegetais cultivadas propagadas por sementes têm, as doenças, como fator responsável pela redução da produtividade ou do aumento do custo de produção, podendo, estas, ser evitadas ou minimizadas pela utilização de sementes sadias e/ou tratadas (MENTEN, 1991).

A semente, por ser negligenciada, quanto aos aspectos fitossanitários é considerada como o principal meio de propagação dessas doenças nas regiões produtoras do Brasil, constituindo-se em fator potencial de limitação da produtividade. O cultivo de sementes contaminadas em mistura com sementes sadias é um dos meios mais eficientes de se introduzir ou acumular patógenos em áreas novas ou tradicionais de cultivo. Tal eficiência está relacionada ao fato de as sementes contendo patógeno constituírem-se no foco primário de infecção, pois não são facilmente reconhecidas em um lote e, portanto, havendo chances para seu estabelecimento (MACHADO, 1987). As sementes contaminadas são importantes fontes de inóculo primário e um meio de difusão do agente patógeno para novas áreas (ZEIGLER & ALVAREZ, 1990).

A infecção de uma semente a ser colhida inicia-se a partir de uma semente contaminada, que foi semeada, a qual propicia a multiplicação e a liberação de células bacterianas para a solução do solo. Estas células são transportadas para a parte aérea da planta através da água livre sobre a planta ou pelo salpico de gotas de chuva fragmentadas em gotículas. Estas gotículas, contendo células da fitobactéria, permanecem em suspensão no ar, de onde o vento se encarrega de direcioná-las para órgãos da mesma planta ou para plantas vizinhas, até a inflorescência, em função de ciclos secundários,

procedendo, assim, à inoculação natural (ROMEIRO, 2005). Portanto, quanto maior for a quantidade de inóculo nos órgãos aéreos maior a probabilidade de incidência nas sementes (ZADOKS & SCHEIN, 1979). As plantas infectadas na lavoura, pelo inóculo proveniente da semente, servem como focos de disseminação para plantas sadias (YOUNG et al., 1996). A infestação das sementes é muito importante na epidemiologia da doença (VALENCIA-BOTÍN et al., 2007), havendo casos de transmissão via sementes (ZAVALETA-MANCERA et al., 2007).

Nos casos de infecção da semente, os patógenos podem sobreviver no interior das sementes por períodos de tempo mais prolongados do que outras partes da planta (BAKER, 1972). Isto ocorre devido ao patógeno sobreviver de forma latente e em baixas populações, tendo sua multiplicação paralisada (BRASIL, 2009a) e ao fato das sementes possuírem camadas protetoras e acumularem reservas nutritivas das quais muitos patógenos se beneficiam (MACHADO, 1987). A semente infectada pode ou não apresentar sintomas, prevalecendo a ausência de sintomas (BRASIL, 2009a).

Lavouras de trigo sob sistema plantio direto poderão ser sustentáveis mediante o uso de sementes sadias e a diversificação de culturas que minimizem a densidade de inóculo de fitopatógenos nas sementes, no solo e nos restos culturais (ZAMBOLIM et al., 2001). O uso de sementes comprovadamente sadias é uma forma simples, segura e econômica de evitar a ocorrência de diversas patologias no campo. Assim, a produção, a avaliação e a subsequente utilização de sementes livres de patógenos são medidas pertinentes ao controle de diversas doenças bacterianas (MEZZALAMA, 2010).

O comércio internacional de sementes tem sido afetado significativamente pelas mudanças das regulamentações fitossanitárias, contudo, nem sempre com base científica. Neste sentido, esforços estão em andamento para revisar regulamentos fitossanitários no intuito de refletir os resultados de análise de risco de pragas e para desenvolver normas para métodos de teste de sanidade de sementes que aumentem a segurança e eficiência no comércio internacional de sementes (MUNKVOLD, 2009).

Pesquisas na área de patologia de sementes são fundamentais para garantir padrões de sanidade e atender as exigências do consumidor em todo mundo. Dentre estas, a detecção de bactérias em sementes é um passo primordial para o controle, em face de uma série de implicações epidemiológicas, que acarretam prejuízos ao setor agrícola. O desenvolvimento, de novas técnicas na patologia de sementes permite a execução de testes de sanidade mais confiáveis e a realização de tratamentos de sementes menos agressivos ao ambiente, tornam-se comuns em pesquisas relacionadas ao tratamento biológico de sementes, devido ao crescente interesse nos aspectos econômicos e ambientais (NAMETH, 1998).

A problemática do desenvolvimento agrícola não será solucionada com a patologia de sementes. Porém, é um item importante que precisa ser devidamente considerado para assumir sua posição no processo tecnológico de produção de sementes (WETZEL, 1985), garantindo que as sementes estejam livres de fitopatógenos e evitando a dispersão destes em novas áreas de cultivo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fitobacteriologia e em casa de vegetação da Universidade de Passo Fundo, no período de março de 2012 a fevereiro de 2014. Foram empregadas as cultivares Mirante, Quartzo, BRS 327, BRS 331, BRS Guamirim e Marfim, oriundas dos municípios de Ijuí, Passo Fundo e Tupanciretã, do estado do Rio Grande do Sul, das safras 2010, 2011 e 2012, totalizando nove amostras oriundas de localidades distintas (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação das cultivares de trigo e do número das amostras, da origem e da safra das sementes empregadas no estudo

Cultivar	Amostra	Origem	Safra
BRS Guamirim	BRS Guamirim-a1	Ijuí	2010
BRS 327	BRS 327-a1	Passo Fundo	2011
BRS 331	BRS 331-a1	Passo Fundo	2011
Marfim	Marfim-a1	Passo Fundo	2011
Mirante	Mirante-a1	Passo Fundo	2011
	Mirante-a2	Passo Fundo	2011
	Mirante-a3	Passo Fundo	2011
Quartzo	Quartzo-a1	Passo Fundo	2011
	Quartzo-a2	Tupanciretã	2012

3.1 Bactérias “Tipo” de *Pseudomonas*

Os isolados provenientes da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico - IBSBF, do Laboratório de

Bacteriologia Vegetal do Centro Experimental de Campinas, São Paulo (SP), foram: *P. syringae* subsp. *syringae* (1022 - V. A. Malavolta Jr. ex. W. C. Luz, de *Triticum aestivum*, 1993, Brasil); e *P. fuscovaginae* (743 - V. A. Malavolta Jr., de *Triticum aestivum*, 1989, Brasil) (IBSBF, 2013).

As bactérias foram reativadas por ressuspensão em solução peptonada esterilizada e incubadas por 60 minutos, a temperatura de 28 °C. A suspensão bacteriana foi semeada em meio 523 (KADO & HESKETT, 1970) e incubadas em estufa bacteriológica durante 24 a 48 horas, a 28 °C. A identidade e a pureza do material foi confirmada pela coloração de Gram e teste de KOH 3%, e avaliada quanto à morfologia, à fisiologia, aos testes bioquímicos (SCHAAD et al., 2001) e, através de teste de patogenicidade em plantas de trigo e reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco. Após confirmação da pureza e identidade do patógeno, procedeu-se ao preparo e à padronização do inóculo para os estudos estabelecidos.

3.2 Detecção e incidência de bactérias em sementes de trigo

As sementes de trigo foram submetidas à assepsia em álcool 70%, por três minutos, e, a seguir, em solução de hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos, e lavagem, por seis vezes sucessivas, em água destilada e esterilizada.

Em caixas acrílicas, tipo Gerbox, contendo meio de cultura 523, foram distribuídas 25 sementes, perfazendo um total de 500 sementes de cada amostra das cultivares estudadas. As sementes

foram incubadas a 28 °C, por cinco dias, e a partir de 48 horas de incubação foram realizadas avaliações observando-se colônias típicas do gênero *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. O resultado foi expresso qualitativamente quanto à presença ou ausência de bactérias nas sementes (BRASIL, 2009a). Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro, determinando-se assim, a incidência de bactérias.

3.3 Germinação

Todas as amostras de semente foram submetidas à análise de germinação, em conformidade com as Regras de Análises de Sementes (BRASIL, 2009b).

3.4 Isolamento e seleção de bactérias junto às sementes

Após a análise de incidência, de cada gerbox foram tomadas aleatoriamente colônias bacterianas morfológicamente distintas crescidas junto a essas sementes com a finalidade de se obter colônias isoladas e puras. Estas colônias foram passadas para os meios de cultura 523 (KADO & HESKETT, 1970), em meio GYCA (SCHAAD et al., 2001) e meio B de King (KING et al., 1954) e extração de xantomadina (JENKINS & STARR, 1985) e para estudo dos parâmetros de semelhança dos aspectos culturais e morfológicos. Nesses mesmos meios de cultura as bactérias “tipo” também foram cultivadas. Esse procedimento teve como objetivo

comparar as colônias semelhantes de modo a agrupá-las para posterior realização de testes de caracterização do gênero e posteriormente da espécie. Os isolados bacterianos obtidos foram submetidos a uma série de testes para caracterização. As metodologias descritas a seguir.

3.5 Reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco

Após a purificação das colônias obtidas das sementes, realizou-se a reação de hipersensibilidade - RH (LELLIOTT et al., 1966), as quais foram comparadas às bactérias “Tipo”. Suspensões de células em água destilada estéril, com concentrações ajustadas para 10^8 UFC/mL (unidade formadoras de colônias por mililitro) foram infiltradas com ajuda de uma seringa hipodérmica estéril, nos espaços intercelulares da face adaxial das folhas de tabaco (MARIANO & SILVEIRA, 2005). Folhas infiltradas somente com água estéril foram utilizadas como testemunha. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e as avaliações realizadas nas 24 horas após a infiltração.

3.6 Teste de patogenicidade em folhas de trigo

A reação de patogenicidade foi realizada para os isolados de cada grupo e comparada às bactérias “Tipo”. Suspensões de células bacterianas, em água destilada estéril, com concentrações ajustadas para 10^8 UFC/mL, foram inoculadas em folhas de trigo por meio da técnica de corte das folhas com tesoura estéril, previamente imersa nesta suspensão, e pela técnica do palito de dente estéril, previamente colocado em contato com a colônia crescida em meio 523 (LELLIOTT

& STEAD, 1987). Para o controle negativo, empregaram-se as mesmas técnicas, porém com a tesoura e o palito de dente molhados com água esterelizada. As plantas, assim tratadas, foram mantidas em casa de vegetação e as avaliações foram realizadas diariamente após a inoculação.

Além das plantas de trigo, também foram testadas plantas de: canola (*Brassica napus*), chicória (*Cichorium endivia*), melão (*Cucumis melo*), soja, milho, pimentão (*Capsicum annuum*), cebola (*Allium cepa*), lentilha (*Lens esculenta*), estévia (*Stevia rebaudiana*), violeta (*Viola odorata*) e tomate para verificar a ocorrência de sintomas.

3.7 Características culturais e morfológicas

Para a observação das características morfológicas das colônias dos isolados, promoveu-se o crescimento dos isolados em placas de Petri, contendo meios de cultura 523, B de King e NA (Nutriente Agar). As características morfológicas observadas foram: tamanho, consistência, bordos, elevação, forma, pigmentação e odor das colônias em cada meio. A caracterização das células bacterianas foi realizada em microscópio óptico (forma da célula, arranjo celular e mobilidade).

3.8 Características fisiológicas, nutricionais, bioquímicas e tintoriais

A caracterização fisiológica, nutricional, bioquímica e tintorial foi processada mediante teste de coloração diferencial de

Gram (RYU, 1940; SUSLOW et al., 1982), testes de LOPAT [levana, oxidase (SCHAAD, 1988; SCHAAD, 2001), podridão de discos de batata, dihidrólise da arginina (KLEMENT et al., 1990), reação de HR em folhas de tabaco (LELLIOTT et al., 1966)], Os isolados foram testados quanto a capacidade de oxidação e fermentação da glicose (O/F) (HUGH & LEIFSON, 1953), crescimento a 4 °C, 30 °C, 37 °C e 40 °C.

Foram realizados teste de produção de catalase (KLEMENT et al., 1990), teste de solubilidade em hidróxido de potássio (RYU, 1940; SUSLOW et al., 1982), produção de pigmento fluorescente e difusibilidade em meio B de King, utilização de arabinose, trealose, sacarose, 2-Ketogluconato, inositol, sorbitol, adonitol, manitol, asparagina (STARR & WEISS, 1943), hidrólise do amido e da gelatina, digestão da caseína do leite e nucleação do gelo (FAHY & HAYWARD, 1983), crescimento em pH 4,0 e pH 5,0 e crescimento em concentração de cloreto de sódio a 4% e 6%. Além desses testes, utilizou-se o kit Bactrey I e II e o Sistema de Identificação Biolog GEN III Micro-Plate™.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sanidade de sementes de trigo

Em 100% das amostras de sementes de trigo avaliadas detectou-se a presença de bactérias. Dentre as bactérias detectadas, o maior número foi para as bactérias com características dos gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, e, em número insignificante, verificou-se a presença de bacilos e de leveduras.

4.2 Incidência de *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp. em sementes de trigo

A incidência de *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp., nas nove amostras de semente, foi de 78,4%, 80,8%, 83,4% e 92%, respectivamente, nas amostras Mirante a.2, BRS 331 a.1, Quartzo a.1 e Quartzo a.2, não diferindo entre si, mas superiores à incidência de 54,4%, 55,4%, 57,6% e 61,8%, respectivamente nas amostras BRS Guamirim a.1, Mirante a.1, Marfim a.1 e BRS 327 a.1. Na amostra Mirante a.3, a incidência foi de apenas 3%, diferindo estatisticamente das demais amostras (Figura 1).

Testes realizados com amostras de sementes da safra 2011 da cultivar Quartzo apresentaram a ocorrência de isolados do grupo 1 de *Pseudomonas* spp. Testes de detecção foram realizados com o intuito de verificar se houve a transmissão da semente para a planta e da planta para a semente. Foi possível detectar a presença de bactérias do gênero *Pseudomonas* nas sementes produzidas por essa cultivar nas

sementes colhidas na safra 2012. Após seis meses de armazenamento realizaram-se novamente testes de detecção e constatou ainda presença dessa bactéria como também da presença do gênero *Xanthomonas* nas sementes.

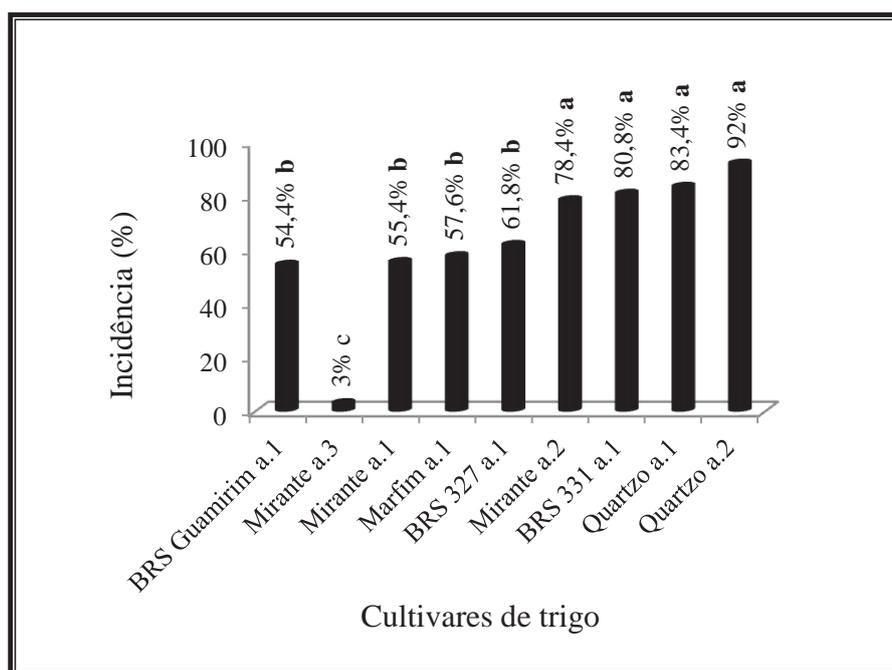


Figura 1 - Incidência de *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* spp. em sementes de cultivares de trigo, oriundas dos municípios de Ijuí, Passo Fundo e Tupanciretã, (Rio Grande do Sul), safras 2010, 2011 e 2012.

4.3 Germinação

Na germinação de sementes em relação à incidência de bactérias fitopatogênicas nas amostras de trigo, observou-se que houve um ótimo percentual de plântulas normais (Tabela 2). Os dados

permitem afirmar que, o desafio está no campo, desde o período vegetativo até o reprodutivo, ou seja, a partir do momento em que há área foliar, somando-se com condições ambientais favoráveis. Isto somado ao genótipo e a outros fatores, é onde a pesquisa deve projetar esforços, na busca do entendimento da relação planta-patógeno uma vez que estes microorganismos encontram-se distribuídos em praticamente em todas as lavouras onde o trigo é tradicionalmente cultivado.

Tabela 2 - Germinação de sementes de trigo em relação à incidência de bactérias fitopatogênicas nas amostras de trigo

Cultivar	Safra	Incidência	Sementes mortas	Plântulas normais	Plântulas anormais
BRS Guamirim-a1	2010	54,40	14,00	66,50	19,50
Mirante-a3	2011	3,00	5,25	61,25	33,50
Mirante-a1	2011	55,40	5,25	80,75	14,00
Marfim-a1	2011	57,60	3,25	78,25	18,50
BRS 327-a1	2011	61,80	3,25	75,75	21,00
Mirante-a2	2011	78,40	3,00	90,50	6,50
BRS 331-a1	2011	80,80	1,50	79,75	18,75
Quartzo-a1	2011	83,40	5,25	91,25	3,50
Quartzo-a2	2012	92,00	6,25	88,75	5,00

4.4 Isolamento e seleção das bactérias das sementes de trigo

Após avaliar a incidência de bactérias nas sementes de trigo, foram isoladas 72 colônias. As colônias nos meios de culturas mostraram coloração branca/creme a marrom castanho sendo que alguns isolados produziram pigmento fluorescente não difusível e outros isolados, pigmentos difusíveis em meio B de King. Nessas

avaliações a realização de extração de xantomonadina foi decisiva para separar os grupos de bactérias de interesse para o estudo. Assim, foi possível selecionar grupos de isolados que foram denominados de isolados do grupo 1, isolados do grupo 2 e isolados de grupo 3, a partir das características morfológicas e culturais. Os isolados que não possuíam características de *Pseudomonas* foram preservados.

4.5 Reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco

Para a confirmação dos resultados foi realizado o teste de reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco para os isolados selecionados. Os testes permitiram observar a reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco (Figura 2) sendo observado o encharcamento do tecido vegetal em 48 horas e após 96 horas ocorreu à morte do tecido vegetal para os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3, sendo que nos isolados do grupo 3 houve ruptura do tecido vegetal após a necrose. Em torno da região infectada a continuidade da ocorrência de uma região clorótica circundando a necrose foi observada nos isolados do grupo 1 e grupo 2.

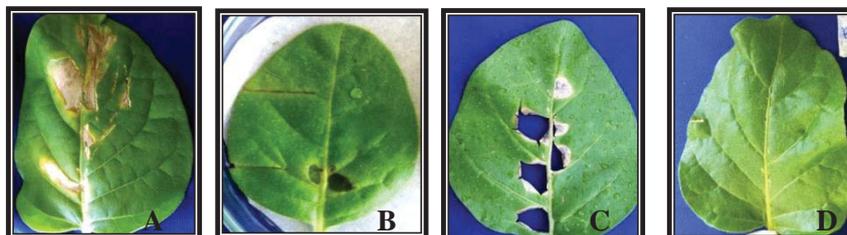


Figura 2 - Reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco positiva para o isolado do grupo 1 (A), isolado do grupo 2 (B) e isolado do grupo 3 (C) e controle negativo (D).

A reação de hipersensibilidade ocorre quando a bactéria entra em contato com o tecido do hospedeiro e as células ao redor do sítio de infecção entram em colapso e morrem rapidamente. Entretanto, quando há necrose e formação de lesões, chamadas de manchas aureoladas, as quais se apresentam sempre como áreas necróticas, e circundadas por um halo clorótico, o que é explicado pela produção de toxinas pela bactéria. Essas se difundem para a periferia da lesão, onde exercem atividade biológica deletéria aos mecanismos fotossintéticos da planta (destruição de clorofila, inibição de fotossíntese, danos aos cloroplastos, etc.) (ROMEIRO, 2005).

4.6 Patogenicidade dos isolados de *Pseudomonas* spp.

O teste de patogenicidade foi realizado em plantas de trigo no estágio fenológico de espigamento com resultado positivo. Para os isolados do grupo 1, os sintomas nas folhas iniciaram com manchas encharcadas evoluindo para manchas cloróticas após sete dias e necrose do tecido vegetal com coloração palha passando a castanho escuro, com bordos mais escuros e no entorno da lesão ocorreu a evolução dos sintomas, até a necrose total da folha; nas espigas também ocorreu descoloração ou manchas pardas tornando-se castanho escuro e afetando o seu desenvolvimento (Figura 3), diminuindo assim, a área foliar para realização de fotossíntese provocando estresse na planta e conseqüentemente a diminuição do desenvolvimento e produtividade das plantas de trigo, formando espigas menores.

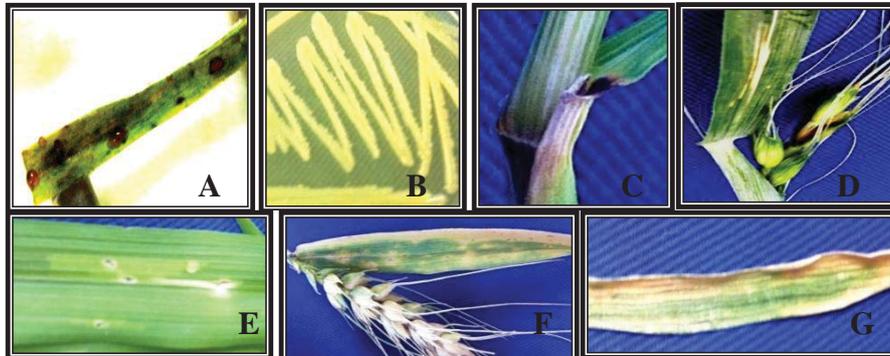


Figura 3 - Folha de trigo com exsudação bacteriana dos isolados do grupo 1 de *Pseudomonas* sp. (A), crescimento em meio de cultura da fitobactéria isolada da folha com exsudação (B), sintomas a partir de inoculação com palito, tanto na folha como na espiga (C, D, E, F e G).

Os sintomas a partir da inoculação dos isolados do grupo 2 em folhas de trigo iniciaram-se com pontos cloróticos e evoluíram para estrias, necrosando toda a área foliar (Figura 4). Confirmou-se a presença da bactéria com os Postulados de Kock.

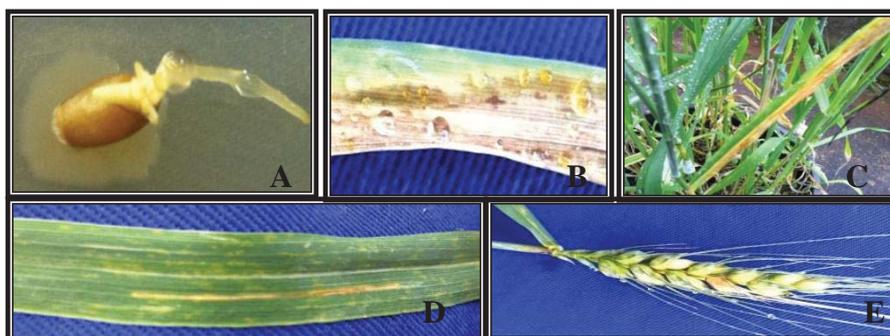


Figura 4 - Semente de trigo com exsudação bacteriana dos isolados do grupo 2 de *Pseudomonas* sp. (A), folha de trigo inoculada com um dos isolados do grupo 2 e presença de exsudação bacteriana (B), sintomas a partir da inoculação com palito (C, D e E).

Nos isolados do grupo 3 os sintomas observados iniciaram-se no ápice da folha e formam manchas cloróticas que vão tornando-se necrosadas (Figura 5).

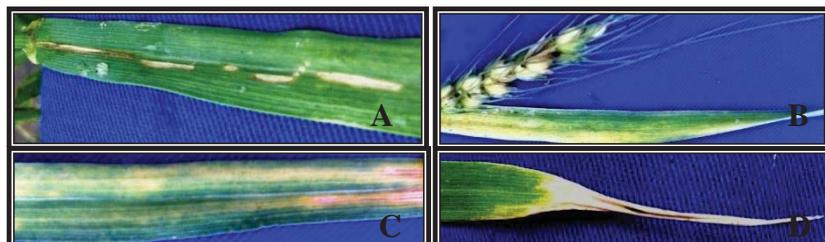


Figura 5 - Folhas e espiga de trigo inoculadas com isolados do grupo 3 de *Pseudomonas* sp. através da técnica do palito (A, B, C e D).

Além do teste de patogenicidade em plantas de trigo, foi realizado teste de patogenicidade em outras espécies de plantas cultivadas, sendo que obteve-se resposta positiva para o surgimento de sintomas a partir da inoculação dos isolados do grupo 1 nas folhas das seguintes plantas: canola - após dez dias ocorreu necrose e formação de clorose circundando a lesão; chicória - a partir do quarto dia ocorreu clorose e após manchas castanho-escuras; melão e soja - após quatro dias ocorreu necrose no ferimento e expansão da clorose circundando o ferimento; milho - os sintomas iniciaram com manchas cor palha no ferimento e expalharam-se pela folha tanto em forma de manchas como de estrias, circundadas por região clorótica, até a total necrose da folha; pimentão - após sete dias ocorreu a clorose do tecido foliar, evoluindo para necrose. O teste de patogenicidade foi negativo em folhas de cebola, lentilha, estévia e violeta. Entretanto, os isolados do grupo 2 e grupo 3 não apresentaram patogenicidade em plantas de: canola, chicória, lentilha, melão, milho, pimentão, soja e estévia. Mas

apresentaram patogenicidade em folhas de tomate - após sete dias ocorreu manchas cloróticas evoluindo para necrose; e violeta - isolados do grupo 2, a lesão expandiu e tornou-se preta e nos isolados do grupo 3 a lesão tornou-se marrom. Os isolados do grupo 2 causaram sintomas em cebola - após quatro dias observando-se encharcamento e após, clorose evoluindo para necrose do tecido foliar.

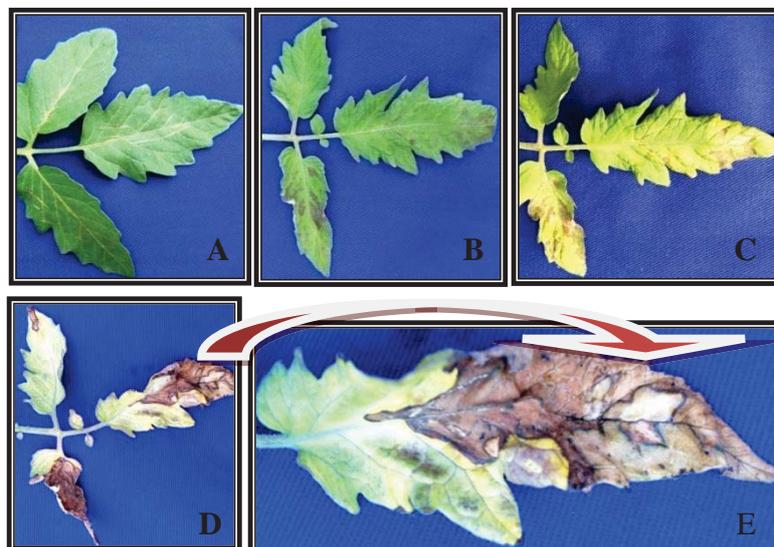


Figura 6 - Folhas de tomateiro controle negativo (A), folhas inoculadas com isolado do grupo 1 de *Pseudomonas* sp., sintomas após um, três e 23 dias respectivamente (B, C, D e E), mancha cor palha a castanho escuro com bordas roxo/preto (E).

Nas folhas de plantas de tomate inoculadas com isolados do grupo 1 de *Pseudomonas* sp. os sintomas foram observados em 24 horas pela formação de manchas de aspecto encharcado tornando-se de coloração pardo a castanho, evoluindo para cor marrom no entorno da

inoculação com bordas roxo/preto em 23 dias (Figura 6). Para os isolados do grupo 2 e grupo 3 não houve reação.

4.7 Características culturais

As colônias bacterianas dos isolados do grupo 1 de *Pseudomonas* sp. em meio 523 crescem em 24 horas, colônias grandes e apresentando-se de coloração esbranquiçada a creme, com formato convexo e com bordos mais claros e planos.



Figura 7 - Colônias do isolado do grupo 1 de *Pseudomonas* sp. 48 horas (A), 72 horas (B) e 60 dias (C).

Observando as colônias no verso da placa, notou-se os bordos claros e transparentes, em seguida a cor creme e pontuações. Após 48 horas as colônias tornam-se creme-esverdeadas e o meio 523 também se tornou amarelo-esverdeado e com o passar do tempo (60 dias), em preservação tanto as colônias como o meio 523 tornaram-se de coloração castanho e consistência viscosa (Figura 7).

O desenvolvimento das colônias dos isolados do grupo 1 de *Pseudomonas* sp. em meio NA ocorreu em 24 horas, apresentando coloração esbranquiçada, mas quando observada contra a luz tornava-se brilhante e translúcida, não ocorreu pigmentação das colônias e não houve difusibilidade no meio de cultura. No entanto, quando estas

foram repicadas em meio 523 ou meio B de King, ocorreu a pigmentação e difusibilidade do pigmento.

As colônias dos isolados do grupo 2 crescem lentamente em meio 523, de tamanho pequeno (Figura 8), possuem coloração creme (observadas contra a luz ficam translúcidas, brilhosas e laterais levemente onduladas/serrilhadas) e após três dias tornando-se de cor salmão. O odor é *sui generis*. No meio NA as colônias apresentam-se menores do que no meio 523 e ficam transparentes.

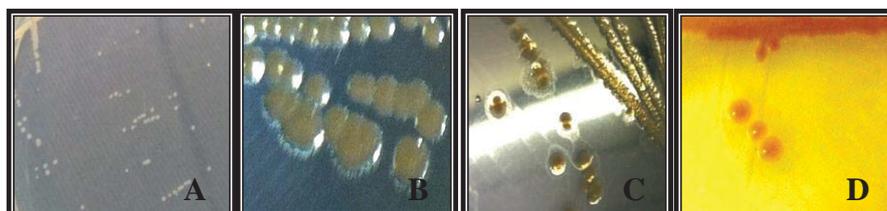


Figura 8 - Isolado 2 em meio 523 colônias pequenas de cor creme (A), Isolado 3 em meio 523, colônias de coloração creme e serrilhadas (B), após cinco dias colônias cremes translúcidas e bordos transparente (C), após 15 dias de incubação (D).

As colônias dos isolados do grupo 3 cresceram em 24 horas em meio 523, com coloração creme e colônia de tamanho médio, são redondas e com pequena elevação no centro da colônia (forma um bico), brilhosas, serrilhadas, nas laterais forma uma nuvenzinha esbranquiçada (transparente) e após cinco dias tornam-se cremes translúcidas. Depois de 15 dias, de incubação, as colônias começaram a se tornar amareladas a marrom e com odor forte (semelhante a sal amoníaco). No meio NA formou-se uma pequena elevação no centro da colônia (forma um bico), a coloração é creme opaca e o entorno da colônia não é transparente (Figura 8).

4.8 Características fisiológicas, nutricionais, bioquímicas e tintoriais

Os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 apresentaram-se Gram-negativos, células em formato de bastonete. No teste de oxidação/fermentação apresentaram-se estritamente aeróbias. No teste LOPAT os resultados foram positivos para reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco e dihidrólise de arginina, e, negativos para atividade pectolítica; para produção de levana e oxidase alguns isolados foram positivos e outros negativos. Testes com temperaturas mostram que os isolados apresentaram diferenças no crescimento quando foram expostos a diferentes temperaturas. O crescimento das colônias ocorreu a 4 °C e até 30 °C, entretanto não ocorreu a 37 °C e 40 °C para os isolados do grupo 1 e grupo 2. Porém, para os isolados do grupo 3, ocorreu o crescimento das colônias a 4 °C, 30°C, 37 °C e 40 °C (Tabela 3).

Algumas espécies de *Pseudomonas* fitopatogênicas crescem a 37 °C, como *P. savastanoi*, *P. corrugata*, outras a 41 °C como *P. aeruginosa* considerada saprofítica (SCHAAD et al., 2001), entretanto, estas bactérias não condizem com as demais características apresentadas pelos isolados do grupo 3.

Os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 apresentaram solubilização em hidróxido de potássio, catalase positiva e hidrolisaram amido. Contudo, a hidrólise da gelatina só ocorreu nos isolados do grupo 1.

Tabela 3 - Caracterização dos 72 isolados de colônias crescidas junto às sementes de nove amostras de trigo

Amostra	Isolados	Reação de Gram	O/F (Anaerobiose)	Crescimento em temperatura				Levan	Oxidase	Atividade pectolítica	Dihidrólise da arginina	HR
				4 °C	30 °C	37 °C	40 °C					
Marfim a.1	1,2,3	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Marfim a.1	4,5,6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Marfim a.1	7,8,9	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Mirante a.1	10,11,12	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Mirante a.1	13,14,15	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Mirante a.1	16,17,18	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Mirante a.2	19,20,21	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Mirante a.2	22,23,24	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Mirante a.2	25,26,27	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Quartzo a.2	28,29,30	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Quartzo a.2	31,32,33	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
BRS331 a.1	34,35,36	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
BRS331 a.1	37,38,39	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Mirante a.3	40,41,42	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Mirante a.3	43,44,45	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Mirante a.3	46,47,48	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Quartzo a.1	49,50,51	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Quartzo a.1	52,53,54	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Quartzo a.1	55,56,57	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
BRSGuamirim a.1	58,59,60	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
BRSGuamirim a.1	61,62,63	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
BRS327 a.1	64,65,66	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
BRS327 a.1	67,68,69	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
BRS327 a.1	70,71,72	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+

Os isolados do grupo 2 apresentam hidrólise negativa para gelatina e amido. Os isolados do grupo 1 e grupo 3 são oxidase positiva, utilizam L-arabinose. Os isolados do grupo 2 são oxidase negativa, não utilizam L-arabinose e trealose, mas utiliza manitol (Tabela 4).

Os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 são negativos para utilização de sacarose, inositol, sorbitol, adonitol, crescimento em pH 4 e concentração de cloreto de sódio a 6%, mas são positivos para crescimento em pH 5 e concentração de cloreto de sódio a 4%. Os isolados do grupo 1 e grupo 2 utilizam manitol, já os isolados do grupo 3 não utilizam (Tabela 4).

Os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 são negativos digestão da caseína do leite. Os isolados do grupo 1 não hidrolizaram esculina e arbutina, não houve redução de nitrato a nitrito. Os isolados do grupo 1 e grupo 3 utilizam asparagina e os isolados do grupo 2, o teste ficou indefinido.

Os isolados do grupo 1 também diferem de *P. fluorecens* biótipo G em relação a utilização de arabinose, 2-ketogluconato, inositol, sorbitol e adonitol e reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco.

Tabela 4 - Comparação das características resultantes dos isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 de *Pseudomonas* spp. isoladas de sementes de trigo, com as espécie de *P.fuscovaginae*, *P.cichorii*, *P. fluorecens* (estirpes A, B, C, F e G), *P.putida*, *P. marginalis* e *P.syringae*, adaptado de Schaad et al. (2001), Duveiller et al. (1997), Lelliot & Stead (1987) e Krieg & Holtz (1984).

Características	Grupo	Grupo	Grupo	P.	P.	P. fluorecens			P.	P.	P.
	1	2	3	fusco- vaginae	Cichorii	A	B	C	putida	marginalis	syringae
Denitrificação	-	n	n	-	-	-	+	+	-	+	+
Pigmento fluorescente	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Pigmento difusível	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Levan, formação a partir de sacarose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Levan, formação a partir de glicose	+	-	-	+	N	n	n	n	n	n	N
B-glucosidade	-	-	-	-	N	-	-	-	-	+	N
Hidrólise da gelatina	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	N
Hidrólise do amido	+	-	+	+	-	-	-	-		n	-
Dihidrolise de arginina	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Utilização de:											
L-arabinose	+	-	+	+	+	+	+	-	d	+	+
Trealose	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
Sacarose	-	-	-	-	-	+	+	n	+	+	+
2-ketogluconato	-	n	n	-	-	+	+	+	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	+	+	d	-	+	+
Adonitol	-	-	-	-		+	d	+	-	-	-
Manitol	+	+	-	n	+	n	n	n	n	+	N
Crescimento em 24 horas	+	-	+								
Crescimento a 37°C	-	-	+	-	-	n	n	n	n	-	+
Crescimento pH4	-	-	-								
Crescimento pH5	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	N
NaCl 4%	+	+	+	+	+	n	n	n	n	n	N
NaCl 6%	-	-	-	-	+	n	n	n	n	n	N
Atividade pectolítica	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
RH em tabaco	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+

+, >90% das estirpes positivas; -, 40% de estirpes positivas; d, 10 a 90% de estirpes positivas; n, não determinado

a) Atividade pectolítica

Constatou-se que não ocorreu a maceração em batata (*Solanum tuberosum* L.) e nem em pimentão demonstrando que os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 não possuem atividade pectolítica. Porém, nos isolados do grupo 1, constatou-se a presença do pigmento amarelo esverdeado na batata e também no pimentão (Figura 9).



Figura 9 - Atividade pectolítica negativa para pimentão (A) e para discos de batata (B) dos isolados do grupo 1 de *Pseudomonas* sp.

b) Produção de Levana

A produção de levana foi observada nos isolados do grupo 1. Após 72 horas as colônias apresentaram elevação no centro (Figura 10). Porém para os isolados do grupo 2 e isolados do grupo 3 não houve a formação de levana.

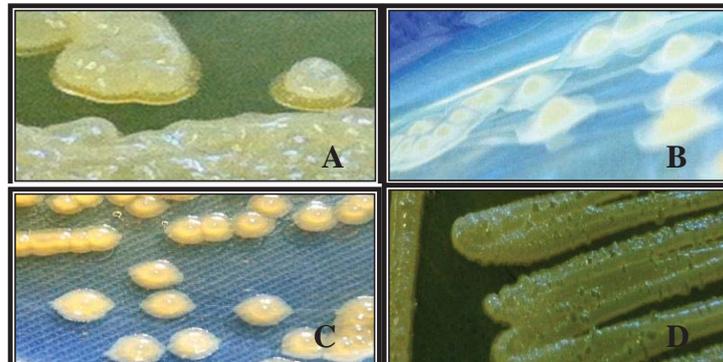


Figura 10 – Elevação das colônias bacterianas em meio Levan pela produção de levana e também ocorre formação de bolhas de ar (A, B, C e D).

c) Pigmento fluorescente e difusibilidade em meio B de King

Os isolados do grupo 1 de *Pseudomonas* sp. apresentaram pigmento fluorescente difusível (fluoresceína) primeiro dia de incubação, em quantidade visível em meio B de King (Figura 11). O odor das colônias era adocicado, mas após sete dias o odor forte era de amônia.

Os isolados do grupo 3 de *Pseudomonas* sp. em meio B de King apresentaram odor forte (amoniacal), a coloração nesse meio foi modificando-se do creme ao marrom conforme o desenvolvimento da bactéria (Figura 12). Esta pigmentação pode estar relacionada com o pigmento piomelanina (marrom) que se desenvolve lentamente e é detectável somente após a incubação por uma a duas semanas, em bactérias do gênero *Pseudomonas* (BRADBURY, 1986; ZEIGLER & ALVAREZ, 1990; KING et al., 1954).

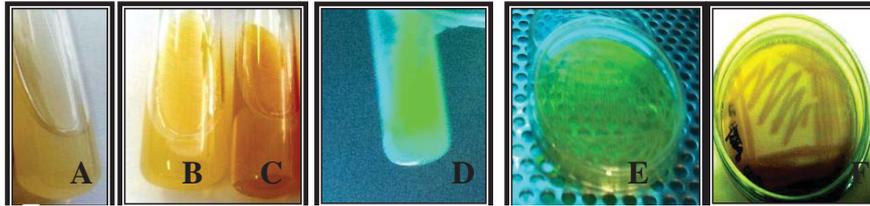


Figura 11 - Testemunha, meio B de King sem bactéria (A), meio B de King contendo isolado do grupo 1 de *Pseudomonas* sp. e formação de pigmentação castanho-claro a partir de 4 dias (B), castanho-escuro com 11 dias após incubação (C), meio de King B com 24 horas de incubação, sob luz UV apresentando pigmento fluorescente difusível amarelo-esverdeado (D e E), meio B de King com 48 horas de incubação apresentando pigmentação difusível amarelo-esverdeado (F).

Os isolados do grupo 2 foram negativos para fluorescência e difusibilidade em meio B de King.

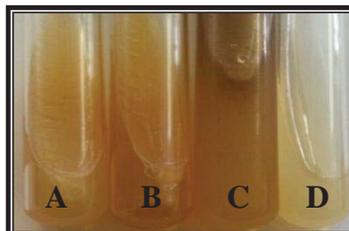


Figura 12 - O isolado do grupo 3 em meio B de King, sete dias após a incubação (A), 14 dias após a incubação (B), após seis meses o meio tornou-se marrom (C), meio B de King sem inóculo (D).

d) Nucleação do gelo

Normalmente a água permanece líquida até $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Entretanto existem vários tipos de partículas no ambiente, entre as quais, as bactérias que possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana servindo de núcleo de orientação das moléculas de água e proporcionando o seu alinhamento em cristais de

gelo sob temperaturas não tão baixas. O efeito nocivo provocado pelos cristais de gelo, formado pelo congelamento da água presente nos espaços internos e externos das células das plantas, se deve ao rompimento que essas estruturas provocam em membranas celulares, causando a perda do conteúdo interno e morte das células.

Nos testes para verificação de atividade nucleadora de gelo os isolados do grupo 1 e grupo 2 de *Pseudomonas* spp. suspensos em solução fisiológica demonstraram habilidade para a nucleação de gelo quando submetidos a temperatura a partir de $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, fato que não ocorreu quando a solução fisiológica pura foi submetida a mesma temperatura (Figura 13). Já para os isolados do grupo 3 o congelamento ocorreu a partir de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

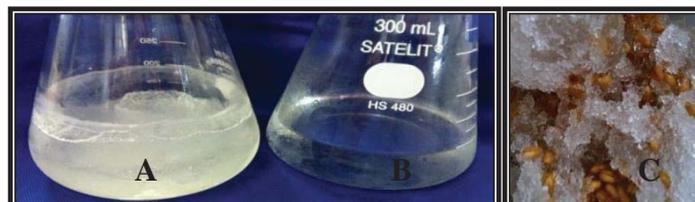


Figura 13 - Nucleação do gelo realizado por isolados do grupo 1 de *Pseudomonas* sp. a $-2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A), solução fisiológica pura não ocorreu nucleação do gelo (B) e sementes de trigo formando blocos de gelo (C).

A densidade de células bacterianas presente no tecido vegetal vai determinar a ocorrência da maior sensibilidade das plantas de trigo à ação das geadas. Além disto, existe a possibilidade destas bactérias obterem acesso ao interior do tecido vegetal através dos ferimentos nas células vegetais causados pela formação de cristais de gelo (DUVEILLER et al., 1997).

e) Determinações realizadas com o Kit Bactrey

Os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 de *Pseudomonas* spp. testados com Bactray I apresentaram resultado semelhante. Para reação positiva da dihidrólise da arginina (ADH) e utilização de citrato (CIT) (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação das características entre os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 de *Pseudomonas* spp. isolados de amostras de sementes de trigo utilizando o Kit Bactray I e II

BACTRAY I	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
B-galactosidase – ONPG	-	-	nd
L. arginina- ADH	+	+	+
Lisina descarboxilase controle – LDC	+	-	+
Ornitina descarboxilase – ODC	+	-	+
Ácido sulfídrico - H ₂ S	-	-	-
Uréia – URE	-	-	-
Pró. Acetoína Voges-Proskauer – VP	-	+	+
Degradação de pectato – PD	-	-	-
Desaminação fenilalanina Indol – IND	-	-	-
Usa Citrato como única fonte de carbono - CIT	+	+	+
BACTRAY II			
Malonato – MAL	+	-	+
Rhamnose – RHA	-	-	-
Adonitol – ADO	-	-	-
Salicina – SAL	-	-	-
Arabinose – ARA	+	-	-
Formação de ácido a partir de fontes de carbono			
Inositol - INO	-	-	-
Sorbitol - SOR	-	-	-
Sacarose – SAC	-	-	-
Manitol – MAN	-	-	-
Rafinose – RAF	-	-	-

+, isolados positivos; -, isolados negativos; nd, não determinado.

Para a produção de ácido sulfídrico (H₂S), produção de amônia e CO₂ a partir da enzima urease (URE), degradação de pectato (PD) e desaminação da fenilalanina para produção de indol (IND), os isolados dos três grupos de *Pseudomonas* spp. apresentaram resultados negativos (Tabela 5).

O resultado do Bactray II para os isolados dos grupos de *Pseudomonas* spp. testados diferiram na reação com malonato (MAL) e utilização do carboidrato arabinose (ARA); e, os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 mostraram-se negativos para utilização dos carboidratos rhamnose (RHA), adonitol (ADO), salicina (SAL), inositol (INO), sorbitol (SOR), sacarose (SAC), manitol (MAN), rafinose (RAF) (Tabela 5).

f) Testes bioquímicos utilizando-se o Biolog GEN III Micro-Plate™

Os três grupos de isolados de *Pseudomonas* spp. apresentaram algumas características semelhantes (Tabela 5), sendo que o sistema Biolog GEN III Micro-Plate™ detectou um percentual de 90% de semelhança dos isolados do grupo 1 comparada ao modelo padrão do sistema para a espécie *P. fuscovaginae*, os demais, isolados do grupo 2 e isolados do grupo 3 foram identificados como sendo do gênero *Pseudomonas*.

Os isolados do grupo 1 de *Pseudomonas* sp. assemelham-se a outras *Pseudomonas*, as quais são positivas para dihidrolise de arginina e oxidase. Porém, existem diferenças consistentes entre os isolados do grupo 1 e de outras espécies de *Pseudomonas* spp. em

relação à hidrólise da gelatina e do amido, utilização de trealose, 2-ketogluconato e reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco.

Tabela 6 - Comparação das características entre os isolados do grupo 1, grupo 2 e grupo 3 de *Pseudomonas* spp. retirados das amostras de sementes de trigo e as fitobactérias *P. syringae* subsp. *syringae*, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, *P. cichorii*, *P. fuscovaginae*, *Burkholderia glume*, *Acidovorax avene* subsp. *avenae* (resultados do Biolog GEN III Micro-Plate™) e ICMP11283 (isolado de *P. fuscovaginae* na Austrália, Cother, 2009)

Biolog GEN III	<i>P. syringae</i> subsp. <i>syringae</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	<i>B. glume</i>	<i>A. avene</i> subsp. <i>avenae</i>	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	ICMP11283
A1 Controle Neg.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A2 Dextrina	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
A3 D-Maltose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
A4 D-Trealose	-	-	-	/	/	-	/	-	-	+
A5 D-Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	/	/	
A6 Gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-	/	/	
A7 Sacarose	/	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A8 D-Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A9 Estaquiase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
A10 Controle Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A11 pH 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A12 pH 5	/	/	/	+	+	/	+	-	-	
B1 D-Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B2 α -D-lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B3 D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B4 β -Metil-D-Glicosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B5 D-Salicina	-	-	-	-	-	-	-	/	/	
B6 N-acetil-D-Glucosamina	/	-	-	/	+	-	/	/	/	+
B7 N-acetil- β -D-Manaçúcar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B8 N-acetil-D-Galactosamina	-	-	-	-	-	-	-	/	/	
B9 N-Acetil Ácido neuramínico	/	-	/	-	-	-	-	-	-	
B10 1% de NaCl	+	/	+	+	+	+	+	+	+	
B11 4% de NaCl	/	-	/	/	/	/	/	/	/	
B12 8% de NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C1 α -D-Glucose	+	+	/	/	+	-	/	-	-	
C2 D-Manose	+	+	+	/	+	-	/	+	+	+
C3 D-Frutose	+	/	/	/	+	/	/	-	/	+

+, isolados positivos; -, isolados negativos e /, isolados indeterminados.

Cont. Tabela 6

Biolog GEN III	<i>P. syringae</i> subsp. <i>syringae</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	<i>B. glume</i>	<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	ICMP11283
C4 D-Galactose	+	+	/	/	+	+	/	-	-	+
C5 3-Metil Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6 D-Fucose	/	-	-	-	-	/	/	-	-	+
C7 L-Fucose	-	-	-	-	+	/	/	-	-	-
C8 L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9 Inosina	/	-	/	/	-	-	/	-	-	+
C10 D-Sódio a 1% Lactato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
C11 Ácido fusídico	/	-	/	+	-	/	+	-	-	-
C12 D-Serina	/	-	/	-	-	/	/	+	+	-
D1 D-Sorbitol	/	/	/	-	+	+	-	-	-	+
D2 D-Manitol	/	+	/	/	+	+	/	-	-	-
D3 D-Arabitol	/	/	/	/	+	+	/	-	-	+
D4 mio-Inositol	/	+	+	-	+	-	-	-	-	-
D5 Glicerina	+	/	+	/	+	+	/	-	-	-
D6 D-Glucose-6-PO4	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-
D7 D-frutose-6-PO4	-	-	-	-	/	-	/	/	/	-
D8 D-Ácido Aspártico	-	-	/	/	-	+	-	-	-	-
D9 D-Serina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D10 Troleandomicina	/	-	/	+	+	/	+	+	+	-
D11 A rifamicina SV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D12 Minociclina	-	-	/	+	-	-	+	-	-	-
E1 Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
E2 Glicil-L-prolina	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-
E3 L-Alanina	+	/	+	+	+	+	+	-	/	+
E4 L-Arginina	/	-	/	+	+	-	+	-	-	-
E5 Ácido L-aspártico	/	/	/	/	/	+	/	-	-	-
E6 Ácido L-glutâmico	+	/	+	+	+	+	+	-	-	-
E7 L-Histidina	/	-	+	+	/	/	+	-	-	-
E8 L-piroglutâmico Ácido	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
E9 L-Serina	/	+	/	/	/	+	/	-	/	+
E10 Lincomicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E11 Guanidina HCl	/	-	/	/	-	+	/	/	+	-
E12 Niaproof 4	+	+	+	+	/	-	+	/	+	-
F1 Pectina	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F2 Ácido D-Galacturônico	/	-	-	/	-	-	+	/	/	-
F3 ÁcidoL-Galactonico Lactona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F4 Ácido D-glucônico	/	+	/	/	/	+	/	-	-	-
F5 Ácido D-glucurônico	/	-	-	+	-	/	+	/	/	-
F6 Glucuronamida	/	-	-	/	-	-	+	/	/	+

+, isolados positivos; -, isolados negativos e /, isolados indeterminados.

Cont. Tabela 6

Biolog GEN III	<i>P. syringae</i> subsp. <i>syringae</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	<i>B. glume</i>	<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	ICMP11283
F7 Ácido múico	/	+	/	/	+	-	/	-	-	
F8 Ácido quínico	+	/	+	+	+	-	+	-	-	+
F9 Ácido D-sacárico	/	/	/	/	/	+	/	-	-	
F10 Vancomicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
F11 Tetrazólio Violeta	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
F12 Tetrazólio Azul	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
G1 p-hidroxi-FenilacéticoÁcido	-	-	-	/	-	-	-	-	-	
G2 Piruvato de metilo	-	-	/	-	-	/	-	-	-	
G3 Ácido D-lácticoMethyl Ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G4 D,L ácido láctico	+	/	+	/	/	+	/	/	/	+
G5 Ácido cítrico	/	/	+	+	/	/	+	+	+	+
G6 Ácido α -Keto-glutárico	/	/	+	+	-	+	/	-	-	+
G7 D-ácido málico	/	+	+	-	/	+	-	-	-	
G8 L-ácido málico	/	/	/	+	+	+	+	/	/	
G9 Ácido Bromo-succínico	-	-	-	-	-	/	-	-	-	+
G10 Nalidixic	/	/	/	+	-	/	+	-	-	
G11 Cloreto de lítio	/	-	/	-	-	/	-	/	/	
G12 Potássio telurito	+	+	+	+	-	/	+	-	-	
H1 Tween 40	/	-	/	-	/	/	-	/	/	
H2 Ácido γ -Amino-Butyric	+	/	+	+	+	/	+	-	-	+
H3 α -Hidroxi-Ácido butírico	/	-	/	-	-	/	-	-	-	
H4 β -Hidroxi-D, L-Ácido butírico	/	-	/	/	/	+	/	-	-	
H5 Ácido α -Keto-butírico	/	-	-	-	-	/	-	-	-	+
H6 Ácido acetoacético	/	-	-	-	-	-	-	/	/	
H7 Ácido propiónico	+	-	/	+	/	/	+	/	/	+
H8 Ácido acético	+	/	/	/	/	+	/	/	/	+
H9 Ácido fórmico	/	/	/	-	/	-	-	-	-	+
H10 Aztreonam	/	/	/	/	/	+	/	+	+	
H11 O butirato de sódio	/	/	/	-	-	/	-	-	-	
H12 Bromato de Sódio	/	/	/	-	-	/	-	-	-	

+, isolados positivos; -, isolados negativos e /, isolados indeterminados.

As características que distinguiram os isolados do grupo 1 de *Pseudomonas* sp. de outras bactérias foram: reação positiva para oxidase e dihidrolase de arginina, reação positiva para hipersensibilidade em plantas de tabaco e sua incapacidade de utilizar

2-ketogluconato e não produzindo ácido a partir de inositol, característica esta citada por Duveiller et al. (1988) como fundamental para distinguir *P. fuscovaginae* de outras *Pseudomonas*. Já os isolados do grupo 2 possuem reação de oxidase negativa, mas dihidrolase de arginina e reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco positivas. Os isolados do grupo 3 apresentam reação positiva para oxidase, dihidrolase de arginina e reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco.

4.9 Preservação dos isolados

Todos os isolados bacterianos foram mantidos em tubos de ensaio com tampa rosqueável contendo meio 523 inclinado e vertical sob óleo mineral sendo armazenados a 4 °C (SMITH & ONIONS, 1994; ROMEIRO, 2001). Esses isolados foram preservados também em micro tubos com uma formulação à base de polímeros contendo 1 g de goma xantana e 1,5 g de polivinilpirrolidona (PVP) armazenados a 4 °C (DENARDIN & FREIRE, 2000; TUMELEIRO & DENARDIN, 2008). Os isolados serão encaminhados para o Instituto Biológico em Campinas, SP, onde farão parte do acervo de coleção de Culturas de Fitobactérias - IBSBF.

A preservação dos isolados viabiliza a manutenção de culturas de organismos coletados, garantindo a preservação e a utilização em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos e testes de controle de qualidade de produtos e materiais, além da troca de informações entre centros de pesquisa e instituições de ensino.

5 CONCLUSÕES

Todas as amostras de cultivares de trigo analisadas apresentam fitobactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas*.

Os testes realizados com os isolados do grupo 1 de *Pseudomonas* sp. permitem afirmar que trata-se de *P. fuscovaginae*.

P. fuscovaginae estão presente em 67% das amostras de trigo, sendo as cultivares Marfim-a1, Mirante-a1, Mirante- a2, Mirante-a3, Quartzo-a1 e BRS 327-a1 e os isolados do grupo 2 e grupo 3 estão presentes em 100% das amostras.

Os testes realizados com os isolados do grupo 2 e os isolados do grupo 3 demonstram tratar-se do gênero *Pseudomonas*, porém, não foi possível verificar qual a espécie e/ou subespécie ou patovar, sendo necessário uma reavaliação e análise de caracterização molecular para determinar qual a espécie.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, G. L.; MENKISSOGLU, O.; LINDOW, S. E. Occurrence and properties of copper-tolerant strains of *Pseudomonas syringae* isolated from fruit trees in California. *Phytopathology*, [S.l.], v. 81, p. 648-656, 1991.

ANDERSEN, S. M.; JOHNSEN, K.; SORENSEN, J.; NIELSEN, P.; JACOBSEN, C. S. *Pseudomonas frederikssbergensis* sp. nov., isolated from soil at a coal gasification site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [S.l.], v. 50, p. 1957-1964, 2000.

ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J. Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonas* based on 16S rRNA sequence. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, [S.l.], v. 50, p. 1563-1589, 2000.

BAKER, K. F. Seed Pathology. In: KOZLOWSKI, T. (Ed.) *Seed Biology*. New York: Academic Press, 1972. p. 317-416.

BALLIO, A.; BARRA, D.; BOSSA, F.; COLLINA, A.; GRGURINA, I.; MARINO, G. Syringopeptins, new phytotoxic lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, Amsterdam, v. 291, n. 1, p. 109-112, 1991.

BALLIO, A.; BOSSA, F.; CAMONI, L.; DI GIORGIO, D.; FLAMAND, M. C.; MARAITE, H. Structure of fuscopeptins, phytotoxic metabolites of *Pseudomonas fuscovaginae*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, Amsterdam, v. 381, p. 213-216, 1996.

BANAT, I.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, n. 53, p. 495-508, 2000.

BATOKO, H.; D'EXAERDE, A.; KINET, J.M.; BOUHARMONT, J.; GAGE, R. A.; MARAITE, H.; BOUTRY, M. Modulation of plant plasma membrane H⁺-ATPase by phytotoxic lipodepsipeptides

produced by the plant pathogen *Pseudomonas fuscovaginae*. *Biochimica Biophysica Acta*. Amsterdam, v. 1372, p. 216-226, 1998.

BIANCHIN, V. *Ocorrência do Barley yellow dwarf virus e Cereal yellow dwarf virus, transmissibilidade do BYDV-PAV pelo pulgão Rhopalosiphum padi e reação de cultivares de trigo ao complexo vírus/vetor*. 2008. 111 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2008.

BOHATCHUK, D. A.; CASA, R. T.; BOGO, A.; JUNIOR, P. R. K.; REIS, E. M.; MOREIRA, E. N. Modelo de ponto crítico para estimar danos de doenças foliares do trigo em patossistema múltiplo. *Tropical Plant Pathology*, Viçosa, v. 33, p. 363-369, 2008.

BORÉM, A. Biotecnologia e sementes. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). *Sementes: qualidade fitossanitária*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2005. p. 1-34.

BOTÍN, A. J. V.; ONOFRE, L. E. M.; ROJAS, H. V. S.; TÉLLEZ, L. C.; VICTORIA, D. E.; MOCTEZUMA, E. V.; MIR, H. E. V. Indicadores de agresividad y métodos de inoculación con bacterias fitopatogénas en plántulas y semillas de trigo 'seri m82'. *Revista Fitotecnia Mexicana*, Chapingo, v. 30, p. 255-259, 2007.

BOTÍN, A. J. V.; ONOFRE, L. E. M.; ROJAS, H. V. S.; MOCTEZUMA, E. V.; TELLEZ, L. C.; MIR, H. E. V. Effect of *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* on yield and biomass distribution in wheat. *Spanish Journal of Agricultural Research*, Basingstoke, v. 9, p. 1287-1297, 2011.

BOTÍN, A. J. V.; LÓPEZ, M. E. C. A review of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. *International Journal of Agronomy*, New York, v. 2012, p. 5, 2012.

BRADBURY, J. F. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Kew: C.A.B Internacional, 1986. 332 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de análise sanitária de sementes*. Brasília: Mapa/ACS, 2009a. 200 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Brasília: Mapa/ACS, 2009b. 399 p.

BUNSTER, L.; FOKKEMA, H. J.; SCHIPPERS, B. Effect of surface activity of *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Applied and Environmental Microbiology*, [S.l.], p.1340-1345, 1989.

CAHYANIATI, A.; MORTENSEN, C. N. Bacterial sheath brown rot of rice *Pseudomonas fuscovaginae*. *Seed Health Testing in the Production of Quality Seed*. Indonésia, [s.n.], 1997, 195 p.

CARMO, M. G. F.; MACAGNAN, D.; CARVALHO, A. O. Progresso da mancha-bacteriana do pimentão a partir de diferentes níveis iniciais de inóculo e do emprego ou não do controle com oxiclreto de cobre. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 19, n. 3, p. 342-347, 2001.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Importância da semente. In: _____. *Sementes: ciências, tecnologia e produção*. Jaboticabal: Funep, 2000. p. 6-11.

COLEÇÃO de culturas de fitobactérias. São Paulo. Instituto Biológico - Sociedade Brasileira de Fitopatologia - IBSBF. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/bacterias.php>. Acesso em: 15 mar. 2013.

CONJUNTURA trigo. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2012. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Culturas_de_inverno/35RO/App_Conjuntura_Inverno.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2013.

CONOVER, R. A.; GERHOLD, N. R. Mixtures of copper and maneb or mancozeb for control of bacterial spot of tomato and their compatibility for control of fungus diseases. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, [S.l.], v. 94, p. 154-156, 1981.

CORTESI, P.; C. PIZZATTI. Effect of chemicals, nitrogen, time of sowing and panicle brown spot epidemics on rice grain discolouration in Italy. *Journal of Plant Pathology*, Milão, v. 90, n. 2, p. 197-209, 2008.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R., LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v. 49, p. 711-745, 2005.

COTHER, E. J.; STODART, B.; NOBLE, D. H.; REINKE, R.; VAN DE VEM, R. J. Polyphasic identification of *Pseudomonas fuscovaginae* causing sheath and glume lesions on rice in Australia. *Australasian Plant Pathology*, Auckland, v. 38, p. 247-261, 2009.

DELMOTTE, N.; KNIEFA, C.; CHAFFRON, S.; INNEREBNER, G.; ROSCHITZKIC, B.; SCHLAPBACH, R.; VON MERING, C.; VORHOLTA, J. A. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [S.l.], v. 106, n. 38, p.16428-16433, 2009.

DENARDIN, N. D.; FREIRE, J. R. J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v.16, n. 3, p. 215-217, 2000.

DUVEILLER, E.; SNACKEN, F.; MARAITE, H. First detection of *Pseudomonas fuscovaginae* on maize and sorghum in Burundi, *Plant Disease*, [S.l.], v. 73, p. 514-517, 1989.

DUVEILLER, E.; MARAITE, H. Bacterial sheath rot of wheat caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in the highlands of Mexico. *Plant Disease*, v. 74, p. 932-935, 1990.

DUVEILLER, E.; FUCIKOVSKY, L.; RUDOLPH, K. *The bacterial diseases of wheat: concepts and methods of disease management*. México: CIMMYT, 1997. 78 p.

EMBRAPA TRIGO. Equipe Fitopatologia da Embrapa Trigo. *Bacteriose nos campos de trigo no Rio Grande do Sul*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2010. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 16 mai. 2012.

FAHY, P.C.; HAYWARD, A.C. *Media and methods for isolation and diagnostic tests*. In: FAHY, P.C., PRESLEY, G.J. (Eds.) *Plant bacterial disease - a diagnostic guide*. Sidney: Academic Press, 1983. 393 p.

FLAMAND, M. C.; PELSSER, S.; EWBANK, E.; MARAITE, H. Production of syringotoxin and other bioactive peptides by *Pseudomonas fuscovaginae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, [S.l.], v. 48, p. 217-231, 1996.

HIRANO, S. S.; BAKER, L. S.; UPPER, C. D. Ice nucleation temperature of individual leaves in relation to population sizes of ice nucleation active bacteria and frost injury. *Plant Physiology*, [S.l.], v. 77, p. 259-265, 1985.

HOFTE, M.; DE VOS, P. Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed.) *Plant-Associated Bacteria*. Netherlands: Springer, 2006. p. 507-533.

HUGH R; LEIFSON E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, [S.l.], v. 66, n. 1, p. 24-26, 1953.

HUTCHISON, M. L.; GROSS, D. C. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. [S.l.], v. 10, p. 347-354, 1997.

INDICADORES agropecuários. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2013. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/> >. Acesso em: 02 set. 2013.

JAUNET, T.; LAGUERRE, G.; LEMANCEAU, P.; FRUTOS, R.; NOTTEGHEM J. L. Diversity of *Pseudomonas fuscovaginae* and other fluorescent pseudomonads isolated from diseased rice. *Phytopathology*. [S. l.], v. 85, p. 1534-1541, 1995.

JENKINS, C. L.; STARR, M. P. Formation of halogenated aryl-polyene (Xanthomonadin) pigments by the type and other yellow-pigmented strains of *Xanthomonas maltophilia*. *Microbiology Institut Pasteur*, Paris, v. 136, p. 257-264, 1985.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, [S.l.], v. 60, p. 969-976, 1970.

KIETZEL, J. VON; RUDOLPH, K. Wheat diseases caused by *Pseudomonas syringae* pathovars. In: DUVEILLER, E.; FUCIKOVSKY, L.; RUDOLPH, K. (Ed.). *The bacterial diseases of wheat: concepts and methods of disease management*. Mexico, DF: CIMMYT, 1997. p. 49-57.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, [S.l.], v. 44, n. 2, p. 301-307, 1954.

KIRALY, S.; EL-ZAHABY, H. M.; KLEMENT, Z. Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 145, p. 59-68, 1997.

KLEMENT, Z.; RUDOLOH, K.; SANDS, D.C. *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990. 568 p.

KUDELA, V.; NOVACKY, A.; FUCIKOVSKY, L. *Phytosanitary Bacteriology*. [S.l.]: Academia Praha, 2002. 347 p.

LELLIOTT, R. A.; BILLING, E.; HARWARD, A. C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *Journal of Applied Bacteriology*, [S.l.] v. 29, p. 470-489, 1966.

LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. *Methods for the diagnosis of bacterial plant disease*. Oxford: Blakwell Scientific Publications, 1987. 216 p.

LINDOW, S. E.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. Distribution of ice nucleation-active bacteria *Pseudomonas syringae* and *Erwinia*

herbicola on plants in nature Freezing injury. *Applied Environmental Microbiology*, [S.l.], v. 6, p. 831-838, 1978.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 69, p. 1875-1883, 2003.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. *Doenças bacterianas das hortaliças - diagnose e controle*. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1997. 70 p.

LPSN. *List of prokaryotic names with standing in nomenclature*. Approved List Bacterial Names. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/alintro.html>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

MACHADO, J. C. Introdução à patologia de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. V. S. (Ed.) *Patologia de sementes*. Campinas: Fundação Cargill, p. 3-17, 1987.

MALAVOLTA, J. R.; BERIAM, O. L. S.; ALMEIDA, I. M. G.; RODRIGUES NETO, J.; ROBBS, C. F. Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil. Uma atualização. *Summa Phytopathologica*, [S.l.], v. 34, p. 9-88, 2008.

MARAITE, H; BRAGARD, C.; DUVEILLER, E. The status of resistance to bacterial diseases of wheat. *Springer*. [S.l.], v. 12, p. 37-49, 2007.

MARIANO, R. L. R. et al. *Importância de Bactérias Promotoras de Crescimento e de Biocontrole de Doenças de Plantas para uma Agricultura Sustentável*. Recife: Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v. 1, p. 89, 2004.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. da. *Manual de práticas em fitobacteriologia*. 2 ed. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2005. 184 p.

MARQUES, A. S. A.; ROBBS, C. F. *Índice de bacterioses assinaladas no Brasil*. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1994, 65 p.

MENTEN, J. O. M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: *Semana de atualização em patologia de sementes*. Anais. Piracicaba: Esalq, p. 115-136, 1991.

MEZZALAMA, M. *Sanidad de semillas: reglas y normas para el desplazamiento seguro de germoplasma*. 2 ed. Mexico, DF: CIMMYT, 2010.

MIYAJIMA, K.; TANII, A.; AKITA, T. *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. [S.l.], v. 33, p. 656-657, 1983.

MOHAN, S. K.; MEHTA, Y. R. Estudos sobre *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* em trigo e triticales no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, São Paulo, v. 10, p. 447- 453, 1985.

MOORE, E. R. B.; TINDALL, B. J.; SANTOS, V. A. P. M. dos; PIEPER, D. H.; RAMOS, J. L.; PALLERONI, N. J. Nonmedical: *Pseudomonas*. 3 ed. In: DWORKIN M.; FALKOW S.; ROSENBERG E.; SCHLEIFER K. H.; STACKERBRANDT E. (Eds.). *The Prokaryotes*, New York: Springer, v. 6, p. 626-703, 2006.

MUNKVOLD, G. P. Seed Pathology Progress in Academia and Industry. *Annual Review Phytopathology*, Ames, v. 47, p. 285-311, 2009.

NAMETH, S. T. Priorities in seed pathology research. *Departament of Plant Pathology*, [S.l.], v. 55, p. 94-97, 1998.

OTTA, J. D. *Pseudomonas syringae* incites a leaf necrosis on spring and winter wheats in South Dakota. *Plant Disease Report*, [S.l.], v. 58, p. 1061-1064, 1974.

PAIVA, A. C. B.; SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; DESTÉFANO, S. A. L. Diferenciação de *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, praga quarentenária e agente causal da podridão basal das espigas do trigo, de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* por pcr-rflp do gene hrp K. *Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 53-80, 2010.

PALLERONI, N. J. *Introduction to the family Pseudomonadaceae*. In: BALOWS, A. H.; TRUPER, G.; DWORKIN, M.; HARDER W.; SCHLEIFER K. H. (Eds.). *The Prokaryotes*. 2 ed. New York: Springer, v. 160, p. 3071-3085, 1992.

PALMER, D. A.; BENDER, C. L. Ultrastructure of tomato leaf tissue treated with the pseudomonad phytotoxin coronatine and comparison with methyl jasmonate. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, [S.l.], v. 8, p. 683-692, 1995.

PATEL, H. K.; SILVA, D. P. da; DEVESCOVI, G.; MARAITE, H.; PASZKIEWICZ, K.; STUDHOLME, D. J.; VENTURIA, V. Draft Genome Sequence of *Pseudomonas fuscovaginae*, a Broad-Host-Range Pathogen of Plants. *Journal of Bacteriology*, [S.l.], p. 2765-2766, 2012.

PAULA JÚNIOR, T. J. de; JESUS JUNIOR, W. C. de; HAU, B.; VALE, F. X. R. do. Interações entre doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 11, p. 71-104, 2003.

PIRES, J. L. F.; VARGAS, L.; CUNHA, G. R. da. (Eds.). *Trigo no Brasil: bases para produção competitiva e sustentável*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2011. 488 p.

ROMEIRO, R. da S. *Métodos em bacteriologia de plantas*. Viçosa: UFV, 2001. 279 p.

_____. *Bactérias Fitopatogênicas*. 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 417 p.

ROMEIRO, R. da S.; GARCIA, F. A. de O. Bactérias fitopatogênicas e suas toxinas. São Paulo: *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, p. 13-15, 2007.

ROTT, P. *Brown rot Pseudomonas fuscovaginae of the leaf sheath of rice in Madagascar*. Institute de Recherches Agronomiques Tropicales et des Cultures Vivrieres, Montpellier, 1987. 22 p.

ROTT, P.; HONEGGER, J.; NOTTEGHEM, J. L. Isolation of *Pseudomonas fuscovaginae* with a semiselective medium (KBS). *International Rice Research News*, [S.l.], v. 14, p. 29, 1989.

ROTT, P.; HONEGGER, J.; NOTTEGHEM, J. L.; RANOMENJANAHARY, S. Identification of *Pseudomonas fuscovaginae* whit biochemical, serological, and pathogenicity tests. *Plant Disease*, [S.l.], v. 75, p. 843-846, 1991.

RUDOLPH K. W. E. *Pseudomonas syringae* pathovars. In: SINGH R. P.; KOHMOTO, K. (Eds.). *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases*. Oxford: Elsevier Science, v. 1, p. 47-138, 1995.

RUIZ, W. F. R. *Biogeografia de bactérias da filosfera de Maytenus robusta na Mata Atlântica*. 2010. 109 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RYU, E. A simple method for differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. *Kitazato Archives of Experimental Medicine*, [S.l.], v. 17, p. 58 - 63, 1940.

SCHAAD, N. W. Detection and identification of bacteria. In: SAETTLER, A. W., SCHAAD, N. W., ROTH, D. A. (Ed.). *Detection of bacteria in seed and other planting material*. Minneapolis: APS Press., 2001. 122 p.

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

SCHAAD, N. W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 2 ed. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 1988. 163 p.

SELLAM, M. A.; WILCOXSON, R. D. Development of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on resistant and susceptible barley cultivars. *Phytopathology*, [S.l.], v. 66, p. 667-668, 1976.

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactants. *Indian Journal of Microbiology*, [S.l.], n. 33, p. 163-184, 1995.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. *The preservation and maintenance of living fungi*. 2 ed. Wallingford: CAB International, 1994. 122 p.

STARR, M. P.; WEISS, J. E. Grow of phytopathogenic bacteria in a synthetic asparagun medium. *Phytopathology*, [S.l.], v. 334, p. 314-318, 1943.

STRANGE, R. N. Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. *Natural Product Reports*, [S.l.], v. 24, p. 127-144, 2007.

SUSLOW, T. V.; SCHROTH, M. N.; ISAKA, M. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, [S.l.], v. 72, p. 917-918, 1982.

TANII, A.; MIYAJIMA, K.; AKITA, T. The name was revived because it did not appear in the Approved Lists. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, [S.l.], v. 42, p. 540-548, 1976.

TUMELEIRO, A. I.; DENARDIN, N. D. Uso de polímeros em formulações para preservação de *Pectobacterium atrosepticum* e *Ralstonia solanacearum*. *Summa Phytopathologica*, [S.l.], v. 34, n.1, p. 58-61, 2008.

USDA. *Grain: World markets and trade*. Washigton, 2011. 54 p. (Foreign agricultural service circular FG 12-11). Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/grain/circular/201112-11/grainfull12-11.pdf>. Acesso em: 25 out. 2012.

VALE, F. X. R. do; JESUS JUNIOR, W. C.; ZAMBOLIM, L. *Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas*. Belo Horizonte: Editora Perfil, 2004. 531 p.

VALENCIA-BOTÍN, A. J.; Mendoza-Onofre, H. V. SILVA-ROJAS. Indicadores de agresivid y métodos de inoculacion com bacterias fitopatogenas em plântulas y semillas de trigo Serim82. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 30, nº 3, p. 255-259, 2007.

ZAVALETA-MANCERA, H. A., VALENCIA-BOTÍN, A. J. IN, MENDOZA-ONOFRE, L. E.; SILVA-ROJAS, H. V.; VALADEZ-MOCTEZUMA, E. Use of Green fluorescent protein to monitor the colonization of *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* on wheat seeds. *Microscopy and Microanalysis Journal*, vol. 13, nº 2, p. 298-299, 2007.

WETZEL, M. M. V. da S. Evolução do programa brasileiro de patologia de sementes. *Revista Brasileira de Sementes*, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 57-70, 1985.

WACKETT, L. P. The metabolic pathways of biodegradation. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT (Eds.). *The Prockaryotes: an evolving resource for the microbiological community*. 3 ed. New York: Springer, p. 3-6, 2001.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, [S.l.], v. 51, p. 221- 271, 1987.

YOUNG, J. M.; SADDLER, G. S.; TAKIKAWA, Y.; DE BOER, S. H.; VAUTERIN, L.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R.I.; STEAD, E.D. Names of plant pathogenic bacteria. *Review of Plant Pathology*, [S.l.], v. 75, p. 721-763, 1996.

YOUNG, J. M.; BULL, C. T; DE BOER, S. H.; FIRRAO, G; GARDAN, L.; SADDLER, G. E.; STEAD, D. E. Classification, nomenclature, and plant pathogenic bacteria - A clarification. *Phytopathology*, [S.l.], v. 91, p. 617-620, 2001.

ZADOKS, J. C.; SCHEIN, R. D. *Epidemiology and plant disease management*. New York: Oxford University Press, 1979.

ZAMBOLIM, L.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Doenças de plantas do sistema plantio direto. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). *Manejo integrado fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto*. Viçosa: [s.n.], 2001. p. 257-312.

ZEIGLER, R. S.; ALVAREZ, E. Bacterial sheath brown rot of rice by *Pseudomonas fuscovaginae* in Latin America. *Plant Disease*, [S.l.], v. 71, p. 592-597, 1987.

ZEIGLER, R. S.; ALVAREZ, E. Characteristics of *Pseudomonas* spp. causing grain discoloration and sheath rot of rice, and associated Pseudomonad epiphytes. *Plant Disease*, [S.l.], v. 74, p. 917-922, 1990.