

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

**DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
BACTÉRIAS FITOPATOGENICAS ISOLADAS DE SEMENTES
DE TRIGO**

PAULA STEILMANN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para 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

**DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
BACTÉRIAS FITOPATOGENICAS ISOLADAS DE SEMENTES
DE TRIGO**

PAULA STEILMANN

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 UPF, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, abril de 2014

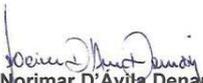
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

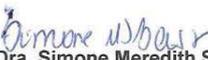
“Detecção, quantificação e identificação de bactérias fitopatogênicas
isoladas de sementes de trigo”

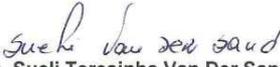
Elaborada por
Paula Steilmann

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

Aprovada em: 29/04/2014
Pela Comissão Examinadora


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


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


Dra. Sueli Teresinha Van Der Sand
UFRGS


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dra. Andréa Bittencurt Moura
UFPEL

CIP – Catalogação na Publicação

SS18d Steilmann, Paula
Detecção, quantificação e identificação de bactérias
fitopatogênicas isoladas de sementes de trigo. / Paula Steilmann.
– 2014.
xiv, 93 f.: il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo
Fundo, 2014.
Orientador: Prof^a. Dr^a. Norimar D'Ávila Denardin.

1. Trigo – Rio Grande do Sul. 2. Patologia de semente. 3.
Bactérias. I. Denardin, Norimar D'Ávila, orientador. II. Título.

CDU: 633.11

BIOGRAFIA DO AUTOR

Paula Steilmann nasceu em 25 de abril de 1990. Em 2012 concluiu o curso de graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Paranaense, Campus de Francisco Beltrão. Em 2012 ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia na área de concentração em Fitopatologia da Universidade de Passo Fundo – RS, realizando estudos de detecção e identificação de bactérias fitopatogênicas em sementes de trigo para a obtenção do título de Mestre em Agronomia área de concentração em Fitopatologia, orientada pela Professora Dr^a. Norimar D'Ávila Denardin.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de poder estar aqui, pela proteção constante durante este caminho e por ter colocado pessoas tão especiais e iluminadas em minha vida.

Aos meus pais, que não pouparam esforços para a minha formação, especialmente pelo carinho, apoio e incentivo constante.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. A Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, pela oportunidade de ter realizado o curso de Mestrado em Agronomia/Fitopatologia.

A professora orientadora, Dra. Norimar D'Ávila Denardin, pela amizade, carinho e apoio durante os trabalhos.

A todos os professores do PPGAgro que contribuíram para a minha formação, em especial professor Dr. Carlos Alberto Forcelini e professora Dra. Jurema Schons. À professora Dra. Simone M. Scheffer Basso pelo auxílio com a análise estatística. Agradeço à Dra. Suzete Lanza Destéfano do Instituto Biológico de Campinas, pelos ensinamentos e auxílio prestado.

Aos amigos que conquistei neste período Elaine Deuner, Adriana Favaretto, Simone Hollas, Bianca de Moura e Tânia Mattioni por todos os momentos compartilhados. Obrigada pela amizade e carinho

sempre. À colega Marisséia Raab, pela colaboração durante os trabalhos em laboratório.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 Transporte de bactérias por sementes	10
2.2 O gênero <i>Xanthomonas</i>	12
2.2.1 Estria bacteriana da folha	14
2.3 O gênero <i>Pseudomonas</i>	17
2.3.1 Queima da folha	18
2.3.2 Mancha da base da gluma	19
2.3.3 Mancha marrom da bainha	21
2.4 Prevenção e controle	22
2.5 Técnicas de detecção, quantificação e identificação	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Obtenções dos isolados	25
3.2 Cultivo de bactérias "Tipo"	26
3.3 Detecção e quantificação de bactérias em sementes de trigo	27
3.3.1 Detecção pela deposição direta das sementes sobre meio de cultura	27
3.3.2 Detecção pelo método da RAS	29
3.3.3 Detecção pelo método da RAS modificado	29
3.3.4 Detecção com diferentes quantidades de sementes	30
3.3.5 Detecção pelo método de centrifugação	31
3.3.6 Detecção pelo método de trituração	32
3.4 Quantificação das unidade formadoras de colônias	33
3.5 Caracterização e identificação dos isolados	34
3.5.1 Ecologia dos isolados	36
3.5.1.1 Teste de hipersensibilidade	36
3.5.1.2 Provas de patogenicidade	36
3.5.1.3 Patogenicidade em plantas não de hospedeiras	37
3.5.1.4 Produção de toxinas extracelulares	38
3.5.2 Testes Fisiológicos, nutricionais e bioquímicos	39
3.5.2.1 Sensibilidade dos isolados a diferentes antibióticos	43

3.5.2.2 Crescimento em diferentes meios de cultura	44
3.5.2.3 Utilização de fontes de carbono	44
3.5.3 Correlação filogenética	45
3.5.4 Preservação dos isolados	45
3.6 Germinações e vigor das sementes	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Detecção e quantificação de bactérias em sementes de trigo	46
4.2 Detecção e quantificação por diferentes métodos	48
4.3 Caracterização e identificação dos isolados	57
4.3.3 Ecologia dos isolados	61
4.3.3.1 Reação de hipersensibilidade	61
4.3.1.2 Provas de patogenicidade em trigo	62
4.3.1.3 Patogenicidade em plantas não hospedeiras	64
4.3.1.4 Produção de toxinas extracelulares	64
4.3.2 Testes fisiológicos, nutricionais e bioquímicos	65
4.3.2.1 Sensibilidade dos isolados a diferentes antibióticos	69
4.3.2.2 Crescimento em diferentes meios de cultura	70
4.3.2.3 Utilização de diferentes fontes de carbono	74
4.4 Correlação filogenética	76
4.5 Germinação e vigor das sementes	78
5 CONCLUSÕES	79

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Grupos de bactérias isoladas de sementes de três cultivares de trigo e suas principais características coloniais. UPF, Passo Fundo, RS	48
2	Quantificação dos isolados BRS-AG, MSF-AG e QTZ-AG em diferentes métodos de detecção. UPF, Passo Fundo, RS	52
3	Quantificação dos isolados BRS-AC, MRF-AC e QTZ - AC em diferentes métodos de detecção. UPF, Passo Fundo, RS	53
4	Quantificação do isolado BRS-AF em diferentes métodos de detecção. UPF, Passo Fundo, RS	54
5	Quantificação dos isolados MRF-VD e QTZ - VD em diferentes métodos de detecção. UPF, Passo Fundo, RS	55
6	Quantificação dos isolados MRF - ATR e QTZ - ATR em diferentes métodos de detecção. UPF, Passo Fundo, RS	56
7	Reação dos isolados do gênero <i>Pseudomonas</i> ao LOPAT. UPF, Passo Fundo, RS	59
8	Reação de patogenicidade dos isolados em diferentes hospedeiros. UPF, Passo Fundo, RS	65
9	Capacidade dos isolados de utilização de diferentes compostos. UPF, Passo Fundo, RS	68

Tabela		Página
10	Reação dos isolados frente a diferentes antibióticos. UPF, Passo Fundo, RS	70
11	Capacidade de crescimento dos isolados em diferentes temperaturas em 24 horas. UPF, Passo Fundo, RS	76
12	Reação dos isolados à inoculação de 24 horas nas placas Bactray I e II. UPF, Passo Fundo, RS	78

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura		Página
1	Sintoma de estria bacteriana em folhas de trigo. Foto: (A) DUVEILLER, E.; (B) DENARDIN, N. D.	14
2	Sintoma conhecido como queima da folha, causado por <i>Pseudomonas</i> spp. em trigo. Foto: FERNANDES, J. M. C.	15
3	Sintoma de mancha da base da gluma causada por <i>Pseudomonas syringae</i> . Foto: MAVRIDIS, A.	19

Resultados e discussão

Figura		Página
1	Teste de incidência em sementes, podendo ser observadas colônias do isolado QTZ-AG. UPF, Passo Fundo, RS.	49
2	Incidência dos isolados BRS - AG, MRF - AG e QTZ - AG em três cultivares de trigo. UPF, Passo Fundo, RS.	50
3	(A) Teste de levan positivo, (B) atividade pectolítica em batata negativo e (C) reação de hipersensibilidade positiva para o isolado MRF - ATR. (Foto: STEILMANN, P.)	60
4	Quantificação de bactérias isoladas de sementes (A), purificação (B) e hipersensibilidade em tabaco (C). (Foto: STEILMANN, P.)	61
5		

	(A) Reação de hipersensibilidade em tomateiro causada pelo isolado QTZ - AG, foto tirada com 72 horas após a inoculação. (B) Reação de hipersensibilidade em tabaco causada pelo isolado MRF - ATR, foto tirada com 48 horas	63
6	Sintoma em folha de trigo causada pelo isolado MRF - ATR. (Foto: STEILMANN, P.)	64
7	Reação de hipersensibilidade causada por: (A) Hipersensibilidade pelo método em meio NA fervido por 5 minutos à 98 °C e filtrado. (B) Hipersensibilidade por inoculação em meio NA filtrado. (C) Controle positivo/hipersensibilidade pelo método normal. (D) Controle negativo/água destilada. (Foto: STEILMANN, P.)	66
8	(A) Hidrólise da caseína, reação ocasionada pelo isolado QTZ - AG. (B) Hidrólise do amido, ocasionada pelo isolado QTZ - AC	68
9	(Crescimento do isolado QTZ-AG inibido pela presença do antibiótico Kanamicina. (Foto: STEILMANN, P.)	72
10	(A) Isolado BRS-AC em meio 523. (B) Isolado BRS-AG em meio de cultura YDC. (Foto: STEILMANN, P.)	73
11	(A) Isolado BRS - AF em meio XTS. (B) Isolado MRF-VD em meio B de King, fotografada em luz UV. (Foto: STEILMANN, P.)	74
12	Dendrograma de dissimilaridades entre 16 isolados de bactérias fitopatogênicas isoladas de sementes de trigo, obtido pelo método UPGMA, com base na	

matriz de dissimilaridade com dados multicategóricos. No eixo x encontram-se as distâncias relativas e no eixo y encontram-se os isolados. Passo Fundo, UPF, RS.	81
Gráfico mostrando os valores de germinação e vigor de sementes de trigo. UPF, Passo Fundo, RS.	82

**DETECÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
BACTÉRIAS FITOPATOGENICAS ISOLADAS DE
SEMENTES DE TRIGO**

PAULA STEILMANN¹

RESUMO – A qualidade sanitária das sementes merece atenção nos sistemas produtivos, considerando os reflexos negativos que a associação de patógenos em sementes pode gerar. Este estudo objetivou detectar, quantificar e identificar bactérias fitopatogênicas presentes em sementes de trigo. Dez diferentes métodos de detecção e quantificação de bactérias fitopatogênicas foram testados, utilizando-se 100, 500, 1000 e 3000 sementes com e sem incubação; 3000 sementes com centrifugação e 3000 sementes com trituração. Os resultados permitiram observar que o melhor método para quantificação de bactérias em sementes de trigo foi aquele que utilizou 3000 sementes com trituração. Para aquelas amostras contendo 100, 500 e 1000 sementes foi possível detectar as bactérias, nos diferentes métodos de detecção, porém com número de unidades formadoras de colônias por semente inferior aos demais métodos utilizados. Os resultados obtidos nesse ensaio permitem afirmar a importância do número de sementes na amostra para análise, bem como os períodos de incubação. A incidência de bactérias em sementes foi avaliada

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia.

utilizando-se os meios de cultura 523 e o meio WBC. Observou-se que no meio WBC a incidência foi de 92, 82 e 78 % respectivamente para os cultivares Quartzo, Marfín e BRS 331. Os isolados foram identificação através da morfologia colonial e de testes bioquímicos e fisiológicos. A partir dos testes realizados foi possível formar três grupos distintos de isolados devido as suas características em comum. Os testes permitiram concluir que as bactérias isoladas das sementes de trigo pertencem às espécies *Xanthomonas translucens* e *Pseudomonas fuscovagine*. Outras pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e *Xanthomonas* que foram possíveis de classificar pelos métodos bioquímicos.

Palavras chave: detecção de bactérias, identificação de bactérias, patologia de sementes, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*.

DETECTION, QUANTIFICATION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC BACTERIA ISOLATED OF WHEAT SEED

ABSTRACT - The seed sanitary quality deserves attention in the productive systems, recital the negative reflexes that the association of pathogens in seeds can generate. This study aimed to detect, quantify and identify plant pathogenic bacteria present in wheat seeds. Ten different detection methods and quantification of pathogenic bacteria were tested, if using 100, 500, 1000 and 3000 seeds with and without hatching; Centrifugation 3000 and 3000 seeds with seeds with milling. Results showed that the best method for quantification of bacteria in wheat seeds was the one who used 3000 with seed crushing. For those samples containing 100, 500 and 1000 seeds was possible to detect bacteria in different detection methods, but with the number of colony forming units per inferior to the other methods used seed. The results of this test show the importance of the number of seeds in the sample for analysis, as well as the incubation periods. The incidence of seed bacteria was evaluated using the culture media and the medium 523 WBC. It was found that the WBC means the incidence was 92, 82 and 78% respectively for the Quartzo, Marfim and BRS 331 cultivars. Isolates were identified by colony morphology and biochemical and physiological tests. From the tests it was possible to form three distinct groups of isolates due to their characteristics in common. The tests showed that the bacteria isolated from the seeds of wheat

belonging to the species *Pseudomonas fuscovagine* and *Xanthomonas translucens*. Others belonging to the genus *Pseudomonas* and *Xanthomonas* were possible to sort by biochemical methods .

Key words: bacterial identification, quantification of bacteria, seed pathology, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*.

1 INTRODUÇÃO

O trigo é a cultura mais importante em termos de quantidade para a nutrição humana e animal, sendo assim, não poderia ser diferente para a economia. O cereal tem se expandido mundialmente em áreas que antes eram consideradas marginais e com condições climáticas não adequadas ao cultivo, em virtude do melhoramento genético e da obtenção de novas variedades.

As doenças causadas por bactérias em lavouras de trigo têm provocado queda da produção, devido principalmente, as chuvas concentradas, alta umidade relativa combinadas com temperaturas amenas. Outro fator que contribui decisivamente para a frustração de safra é a disseminação de patógenos através de sementes com baixa qualidade fitossanitária. As sementes de modo geral podem abrigar e transportar micro-organismos de todos os grupos taxonômicos, causadores ou não de doenças (BRASIL, 2009a).

Dentre as bactérias fitopatogênicas a literatura aponta os gêneros *Clavibacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Pectobactérium* por terem capacidade de infectar e causar doenças em trigo (DUVEILLER et al., 1997). No Brasil apenas os gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* já foram relatados causando doenças à cultura (ROMEIRO, 2005).

A combinação de condições favoráveis e a presença do patógeno são condições decisivas para a ocorrência de epidemias. Sendo assim, dentre os aspectos epidemiológicos, a semente é sem

dúvida um dos principais mecanismos de sobrevivência e disseminação de bactérias a longa distância. Bactérias fitopatogênicas podem reduzir o rendimento das sementes em função de fatores ambientais prevaletentes no momento da infecção, na fase de crescimento da cultura hospedeira e da tolerância de cultivares, entre outros (BOTIN & LOPEZ, 2012).

A sanidade de sementes desenvolveu-se e atingiu maturidade como ciência no Brasil nos últimos 40 anos. Porém, no sistema brasileiro de produção de sementes, a análise sanitária ainda não é tratada como uma ciência que subsidiaria uma tomada de decisão no momento do plantio ou ainda na prevenção enquanto armazenada. Assim, verifica-se que, a análise sanitária da semente não tem o mesmo grau de importância que tem a análise de qualidade fisiológica, como pureza, germinação e vigor. Grande parte das sementes produzidas é comercializada sem as informações de sua qualidade sanitária, pois não há exigência legal na comercialização.

Um dos problemas relativos à veiculação de bactérias por sementes reside na fragilidade dos métodos de detecção e quantificação desses organismos. A concentração de bactérias fitopatogênicas nas sementes pode variar dependendo da cultivar, da severidade e com o estágio de desenvolvimento da planta. Esses aspectos são influenciados pelo ambiente pelo manejo no estágio de desenvolvimento da planta mãe, e pelas condições e período de armazenamento das sementes (NEERGAARD, 1977).

Há necessidade de desenvolver medidas preventivas visando o aprimoramento, avaliação ou desenvolvimento de procedimentos, métodos e técnicas padrão ou de referência para a detecção, identificação e quantificação de bactérias fitopatogênicas em sementes, de modo a subsidiar os padrões de qualidade a serem adotados em análises de rotina.

A detecção de bactérias em sementes é um passo primordial para o controle de doenças (NEERGAARD, 1977). Embora existam várias técnicas para detecção e quantificação de bactérias fitopatogênicas em sementes, algumas são onerosas e exigem equipamentos sofisticados, ou então, técnicos especificamente treinados, como é o caso do uso de imunofluorescência, de sorologia ou de sondas de DNA (MOURA & ROMEIRO, 1993). Por outro lado, os métodos microbiológicos que utilizam meios de cultura são capazes de proporcionar crescimento e quantificação da bactéria alvo, requerendo confirmação da identidade pelo teste de patogenicidade (SCHAAD, 1982).

Em fitobacteriologia os meios semi-seletivos são considerados uma ferramenta de relevante importância para o diagnóstico de doenças, para o isolamento de bactérias fitopatogênicas em tecidos vegetais ou sementes, subsidiando estudos epidemiológicos (KRUPPA, 1993).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, aprimorar ou desenvolver procedimentos, métodos e técnicas padrão ou de

referência, para detectar, quantificar e identificar bactérias fitopatogênicas em sementes de trigo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O trigo (*Triticum aestivum* L.) pertence à família *Poaceae*, originalmente de clima frio. Este gênero apresenta um grande número de espécies, contudo as que possuem maior importância do ponto de vista agrícola são o *Triticum durum* e *Triticum aestivum*.

O *Triticum aestivum* L. é originário do sudoeste asiático e foi introduzido na China, Europa e Índia onde há relatos de cultivo à cerca de 5000 a. C. (OSÓRIO, 1982). Atualmente com o auxílio do melhoramento genético encontra-se difundido por todo o mundo, desde o Equador até regiões próximas aos pólos. É uma planta de ciclo anual, cultivada durante o inverno e a primavera, é considerado um cereal básico para a civilização e, seu cultivo segue paralelamente à história da humanidade. É um dos grãos mais consumidos no mundo e de alguma forma sempre está presente na alimentação humana e de animais criados pelo homem, contudo, deve-se ressaltar também sua importância na economia.

No Brasil, a cultura do trigo desenvolveu-se com a vinda dos colonizadores europeus à região sul onde encontraram as melhores condições ambientais para o cultivo. Hoje a produção concentra-se basicamente nos estados do Paraná com 56,4% e Rio Grande do Sul

com 33,6% da produção nacional. A produção nos outros estados brasileiros ainda é pequena. O cereal vem sendo introduzido na região do Cerrado, apresentando excelente potencial de expansão, porém sua contribuição na produção do país ainda é mínima, não passando de 10% (KOBAYASTI & PIRES, 2011).

O trigo é o segundo cereal mais cultivado em volume, sendo produzidos 648,21 milhões de toneladas desse cereal no mundo (USDA, 2011), é a segunda maior cultura em expressão na safra 2011/2012, liderada pela União Européia, com 283.290,0 mil toneladas (CONAB, 2013).

De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013) no ano agrícola de 2011/2012 a produtividade média brasileira de grãos foi de 2.672 kg ha⁻¹ totalizando a produção de 5,78 milhões de toneladas de trigo. Sua participação é de extrema importância para a sustentabilidade de pequenas e grandes propriedades da região Sul do Brasil (VALÉRIO et al., 2009). O auge da triticultura no Brasil foi alcançado no ano de 1987, quando foram semeados mais de 3,7 milhões de hectares, com a produção atingindo 6,2 milhões de toneladas (PICININI & FERNANDES, 2003).

A produção nacional atende apenas 50% do consumo interno do país, os produtores de trigo encontram dificuldades em relação ao aumento da produção (VALÉRIO et al., 2009). Dentre os problemas encontrados estão os elevados custos para produção, a

comercialização das safras e a incidência de um grande número de doenças (BRUM & HECK, 2005).

Segundo estimativas, em 2020 serão consumidas no mundo um bilhão de toneladas de trigo. Assim, para atender esta demanda, a produção precisará passar de um rendimento de 2,5 toneladas por hectare para 4,5 toneladas por hectare. Por tanto, será necessário aumentar 2,5% o rendimento de grão ao ano (BACALTCHUK & SILVA, 2001). A produção anual é variável, em função de condições adversas que limitam a produtividade, como condições climáticas que favorecem o surgimento de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus.

Destacam-se dentre as doenças, as bacterioses como a queima da folha incitada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e a estria bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* (MOHAN & MEHTA, 1985; PIRES et al., 2011). Segundo Romeiro (2005), acrescentam-se a estas a queima da bainha causada por *Pseudomonas fuscovaginae* e *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* descritas no Brasil.

2.1 Transporte de bactérias por sementes

As bactérias podem sobreviver nas sementes de forma latente, em baixas concentrações, sem se multiplicar. A semente infectada pode ou não apresentar sintomas da doença, os quais, na

maioria das vezes não são percebidos, reduzindo o rendimento de sementes em função de fatores ambientais prevalecentes no momento da infecção, no desenvolvimento da cultura hospedeira, suscetibilidade da cultivar, entre outros (BOTÍN et al., 2011). Algumas variáveis climáticas como a temperatura, umidade relativa e a chuva são condições primordiais para o progresso da doença no espaço e no tempo. Bactérias fitopatogênicas possuem capacidade de sobreviver em condições de grande oscilação, tanto em relação a sua população, quanto às variáveis ambientais.

Fica evidente quando se analisa os aspectos epidemiológicos, a influencia de sementes infectadas como um dos principais mecanismos de sobrevivência e disseminação de patógenos a longa distância.

Alguns aspectos intrínsecos, de alguns grupos de bactérias, em aumentar sua pré-disponibilidade em provocar doença são conhecidos e, entre esses aquelas que fazem a nucleação do gelo. Esses microorganismos vivem nas superfícies das folhas das plantas ou no seu interior e, sob condições adequadas, produzem uma proteína que desencadeia a formação de cristais de gelo. Dentre essas, citam-se algumas espécies de *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Pectocanterium*. O gênero *Xanthomonas* é conhecido por causar a estria bacteriana e por terem a capacidade de fazer a nucleação de gelo, causando injúrias no tecido vegetal em baixas temperaturas, intensificando os danos de geada na cultura do trigo (EMBRAPA, 2010).

Gent et al. (2005) verificaram que bactérias do gênero *Xanthomonas* apresentam baixa efetividade quando expostas ao solo e permanecem presentes nos resíduos vegetais enquanto estes não forem decompostos. Trabalhos mostram que esse gênero, bem como outras espécies e outros gêneros podem ser transmitidos pelas sementes, sendo que, algumas dessas bactérias podem sobreviver em sementes por mais de 63 meses (FOSTER & SCHAAD, 1987).

Estudos sobre populações bacterianas em sementes mostram que estas são fortemente afetadas pela temperatura de armazenamento. Uma população de mesma ordem de grandeza pode sobreviver à temperaturas de 5 até -18 °C com médias de 10³ UFC/semente, porém, quando armazenadas a temperatura ambiente foi observada uma queda acentuada para 10 UFC/semente (MARQUES et al., 2005). Resultado semelhante foi observado para *X. translucens* pv. *cerealis*, cuja população foi reduzida nos primeiros dois anos, quando as sementes contaminadas foram mantidas à temperatura ambiente (MALAVOLTA et al., 2000).

O gênero *Pseudomonas* já foi relatado incitando diferentes sintomas em trigo. A queima da folha do trigo induzida por *P. syringae* pv. *syringae* e a mancha da base da gluma causada por *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Ambas as espécies bacterianas podem estar presentes em sementes, solo, restos culturais e sobrevivendo como epifíticas nos próprios hospedeiros.

2.2 Gênero *Xanthomonas*

Bactérias do gênero *Xanthomonas* constituem um dos mais importantes grupos de bactérias fitopatogênicas. Este grupo de bactérias incita principalmente doenças de parte aérea em diversas espécies de plantas. Este gênero é composto por bactérias Gram-negativas, com aproximadamente 0,4-0,7 x 0,7-1,6 µm, móveis com um flagelo polar, aeróbicas extritas, não produzem endósporos, catalase positiva e oxidase negativa (VAUTERIN et al., 1992; BRADBURY,1986), ocorrem isoladamente ou em pares. Outras características a serem consideradas por esse gênero de bactérias é a produção de xanthomonadina, não são fluorescentes, reagem alcalinamente com leite litmus, crescem a 40°C (SHAAD et al., 1980),contudo sua temperatura ótima de crescimento está entre 25-30°C, Em meio YDC formam colônias amarelas e mucóides devido a produção de exopolissacarideo (HOLT et al., 1994).

Dowson (1939) propôs a criação do gênero *Xanthomonas*, que inicialmente compreendia 19 espécies. Posteriormente Young et al. (1978) sugeriram que as espécies bacterianas deveriam ser agrupadas em nível infraespecífico de acordo com a sua patogenicidade no hospedeiro específicos, estabelecendo assim o termo patovar.

Estirpes de *Xanthomonas* patogênicas à família Poaceae e cereais anteriormente pertencentes à espécie *X. campestris* foram reclassificadas com base em estudos de hibridização DNA-DNA e

utilização de fontes de carbono (BIOLOG®) como *X. translucens* dividida em dez patovares (VAUTERIN et al., 1995; DYE et al.; 1980). Dentre os dez patovares de *X. translucens*, cinco são patogênicas à cereais. Entre essas, tem-se a *X. t. pv. cerealis* que tem como hospedeiros naturais o trigo, cevada (*Hordeum vulgare*), plantas forrageiras do gênero *Bromus* spp. e centeio (*Secale cereale*), quando inoculadas causam sintomas em aveia (*Avena sativa*) e *Agropyron repens* (BRADBURY, 1986).

A *X. t. pv. secalis*, tem como hospedeiro natural o centeio, contudo, segundo Bradbury (1986) após inocular plantas de trigo e cevada estas apresentaram sintomas da doença.

Outra bactéria de importância econômica de grande impacto epidemiológico é a *X. t. pv. translucens* que diferencia-se por ter como hospedeiros naturais a cevada, o trigo e o arroz (BRADBURY, 1986). Essa bactéria na Europa e no mediterrâneo é considerada como praga quarentenária A2 pela *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO).

Ainda, dentre as *X. translucens* encontrara-se o patovar *undulosa* a qual é a mais investigada da espécie *X. translucens*, esta incita doença em trigo, aveia, centeio e cevada (BRADBURY, 1986).

Outro patovar de importância é a *X. t. pv. hordei* que causa doença em cevada. As características morfológicas colônias desta bactéria é igual a outras espécies de *X. translucens* em meio de cultura YDC.

2.2.1 Estria bacteriana da folha

A estria bacteriana da folha, causada pelos patovares de *X. translucens* (BRAGARD et al., 1997), destaca-se por causar doença do trigo em todas as áreas produtoras de trigo no mundo. A doença foi relatada pela primeira vez em 1919 (SMITH et al., 1919). Os primeiros sintomas da doença nas folhas são caracterizados por estrias translúcidas com aspecto encharcado (CUNFER, 1987), tem como característica causar exsudação bacteriana nas folhas. Esta espécie de bactéria está associada a temperaturas mais altas, preferencialmente acima de 26°C (EMBRAPA, 2010).

A ocorrência da estria bacteriana do trigo é comum em regiões quentes como o oeste e norte do Paraná e sul de São Paulo. Manifesta-se com maior frequência nas lavouras em que o trigo é cultivado em monocultura e plantio direto e/ou em lavouras com sementes infectadas. A doença pode ocorrer em condições muito diferentes, tais como alta umidade relativa, climas subtropicais, ambientes muito quentes com noites frescas ou ainda com mudanças climáticas frequentes e variações bruscas de temperatura (BOTÍN et al., 2011).

Os sintomas da doença podem ser encontrados em todas as fases de crescimento do trigo, mas são frequentemente observados após a floração. Nas folhas, os sintomas de estria bacteriana iniciam

como pequenas lesões longitudinais com aspecto de encharcamento, onde na maioria das vezes, as lesões iniciam nas bordas das folhas. Em condições de alta umidade pode ser observada a exsudação bacteriana de cor amarela.

Em hospedeiros muito suscetíveis, as estrias são alongadas paralelas as nervuras, e se tornam marrom-escuras translúcidas quando expostas à luz, em cultivares menos suscetíveis, ou em condições de seca, manchas individuais tendem a permanecer pequenas tornando-se cloróticas ou necróticas. As bactérias *Xanthomonas translucens* sp. são parasitas necrotróficos e sobrevive em sementes e em restos culturais e opcionalmente parasitando plantas de trigo voluntárias presentes em lavouras (BOOSALIS, 1952; WIESE, 1998).



Figura 1 – Sintoma de estria bacteriana em folha de trigo (Foto: (A) DUVEILLER, E. B.; (B e C) DENARDIN, N. D.)

No entanto, dependendo das condições ambientais e da suscetibilidade da cultivar, grande parte das manchas podem coalescer, causando consideráveis danos na produção. As perdas de rendimento são geralmente de 10% ou menos (FORSTER et al., 1987). Contudo, em casos graves de severidade as perdas podem chegar a até 40 % (SCHAAD & FORSTER, 1985; CUNFER, 1988). Duveiller & Maraitte (1992) relataram uma perda de rendimento médio de 20% para o trigo com 50% de área foliar lesionada. Na Europa e na Ásia as perdas de rendimento atingiram até 50% por danos causados pela mesma bactéria (VON KIETZELL et al., 1994).

2.3 O gênero *Pseudomonas* spp.

O gênero *Pseudomonas* compreende um taxon muito versátil metabolicamente, estão distribuídos no solo e água, sendo importantes como patógenos de plantas, animais e humanos, com algumas estirpes relacionadas à promoção de crescimento de plantas e biocontrole de fitopatógenos (ZAGO et al., 2000).

A espécie *P. syringae* tem sido relatado na maioria das regiões de clima temperado e subtropical do mundo, onde o trigo é cultivado. O aparecimento da doença é favorecido em temperaturas amenas (15 a 25° C) e alta umidade relativa (VON KIETZEL & RUDOLPH, 1997).

Este gênero, além de englobar bactérias fitopatogênicas, contém espécies epífitas e saprófitas, cujos habitats são a rizosfera, o solo, a superfície de plantas, os restos de cultura e água. São agentes causais de numerosas doenças com sintomas de manchas foliares, queimas, murchas vasculares, podridões moles, cancrios e galhas. Espécies do gênero *Pseudomonas* são bacilos retos ou raramente curvos, Gram-negativos, aeróbios e móveis com um ou mais flagelos polares (lofotríquia) quando cultivadas em meio de cultura apresentam colônias brancas, creme ou cinza-claro.

Como patógeno de planta pode infectar uma variedade de espécies, com mais de cinquenta patovares diferentes.

Dentre o gênero *Pseudomonas* que incitam doenças na cultura do trigo estão os patovares *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas fuscovaginae*.

A incidência de *Pseudomonas syringae* em trigo é geralmente esporádica, embora as perdas de rendimento possam ser devastadoras quando as condições ambientais são favoráveis ao desenvolvimento de epidemias (DUVEILLER & MARAITE, 1993). Estudos mais recentes no México identificaram a presença da bactéria *P. syringae* colonizando sementes de trigo e afetando a produtividade, assim como em fases epifíticas, onde populações deste grupo de bactérias encontram-se colonizando a superfície foliar de trigo e outras espécies de plantas (BOTÍN & LOPEZ, 2012). Estas bactérias têm sido

relatadas na maioria das regiões de clima temperado e subtemperado do mundo, onde o trigo é cultivado.

A transmissão de *P. syringae* por sementes foi comprovada por Mancera et al. (2007). Sementes infestadas e, ou infectadas são importantes fatores na epidemiologia da doença (BOTÍN et al., 2007).

Em relação aos rendimentos de grãos e as perdas na produtividade causadas por *P. syringae* são dependente de fatores como, a incidência do patógeno, a gravidade da doença, a agressividade do agente patogênico, condições ambientais (especialmente temperatura e umidade), bem como, a resistência ou susceptibilidade e do estágio fenológico do hospedeiro em que a infecção ocorre (BOTÍN & LOPEZ, 2012).

2.3.1 Queima da folha

O sintoma conhecido como queima das folhas é causado por *P. s. pv. syringae* (BOTÍN et al., 2011; BOTÍN & LOPEZ, 2012). Os primeiros sintomas da queima da folha aparecem nas folhas superiores, próximo ao estágio de espigamento. A infecção por *P. syringae* nas folhas inicia-se com a presença de uma mancha aquosa, com diâmetro em torno de 1 mm, que evolui num período de 2 a 3 dias para uma coloração branco-amarelada com áreas cloróticas, as quais podem coalescer formando áreas com aspecto desidratado (MARAITE et al., 2007). Pequenas gotículas viscosas (exsudato)

podem desenvolver junto às lesões nas folhas, sob condições ambientais extremamente úmidas.



Figura 2 - Sintomas conhecido como queima da folha, causado por *Pseudomonas* spp. em trigo. (Foto: FERNANDES, J. M. C.)

2.3.2 Mancha da base da gluma

A mancha basal da gluma é causada por *P. s. pv. atrofaciens* a qual é favorecida por períodos extraordinariamente úmidos e temperaturas entre 15 e 20 °C (VON KIETZEL & RUDOLPH, 1997).

Os sintomas da mancha basal da gluma caracterizam-se pela necrose, de coloração marrom escura, dos tecidos do terço inferior da gluma, e pode espalhar-se pelo ráquis atingindo o grão (ANZAI et al., 2000). Os sintomas da mancha basal da gluma são geralmente confundidos com sintomas de outras doenças causadas por fungos como *Leptosphaeria nodorum* e *Cochliobolus sativus* e também, por fatores abióticos como melanismo causando diagnóstico errado da doença (VON KIETZEL & RUDOLPH, 1997). A mancha basal da gluma resulta em grãos mal formados e leves. Trabalho desenvolvido na Alemanha nos anos de 1992 e 1993 demonstraram que a *P. syringae* pv. *atrofaciens* ocorre com frequência em sementes e plantas

de trigo sem no entanto causar sintomas da doença (DUVEILLER et al., 1989).



Figura 3 - Sintomas conhecido como mancha da base da gluma, causado por *Pseudomonas syringae* em trigo. (Foto: FERNANDES, J. M. C.)

2.3.3 Mancha marrom da bainha

Pseudomonas fuscovaginae é uma bactéria capaz de difundir pigmento fluorescente em meio de cultura, Gram-negativa, oxidase positiva, primeiramente identificada e avaliada como agente causal de doenças em arroz (*Oryza sativa*), no Japão, em 1976 (TANII et al., 1976; ANZAI et al., 2000; HOFTE & DE VOS, 2006). Em plantas de arroz os sintomas são o aparecimento de manchas com aspecto encharcado de coloração escura (marrom, preta) do lado adaxial da bainha da folha bandeira. Foram observados descoloração de grãos e

esterilidade em casos graves (ZEIGLER & ALVAREZ, 1987). Atualmente a bactéria *P. fuscovaginae* é conhecida como o patógeno que causa a doença denominada podridão parda da bainha em vários outros cereais, incluindo o milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) (DUVEILLER et al., 1989) e trigo (DUVEILLER, 1990). É uma das 18 espécies do gênero *Pseudomonas* descritas como espécie fitopatogênica do grupo das bactérias oxidase positiva (ANZAI et al., 2000; HOFTE & DE VOS, 2006).

Estudos sobre as doenças bacterianas de trigo são escassos, como por exemplo, em relação à perda de rendimento e epidemiologia da doença especialmente sob condições de campo. Doenças causadas por *P. syringae* pv. *syringae*, embora classificado como de baixa importância (VON KIETZELL & RUDOLPH, 1997), diminuíram os rendimentos de mais de 50 % na Alemanha (TOBEN et al., 1991). Dano máximo é geralmente associado a condições de alta umidade e baixa temperatura (VON KIETZELL & RUDOLPH, 1997). A bactéria infecta primeiro as glumas e em seguida, invade e se multiplica nos espaços intercelulares dos tecidos de sementes (FUKUDA et al., 1990).

2.4 Prevenção e controle

As bacterioses em trigo são de difícil controle, não há nenhum produto químico registrado pelo Ministério da Agricultura capaz de combater essas doenças. Entretanto, visando à prevenção e sabendo da importância de sementes infectadas na epidemiologia destas bacterioses, o uso de sementes livres destes patógenos é a principal forma de prevenção do aparecimento destas doenças, assim como o uso de cultivares resistente.

Onde estas bacterioses estão estabelecidas, nenhum método é capaz de proporcionar o controle completo. Não existem medidas de controle conhecidos para a doença no campo, contudo, testes em nível experimental com acetato cúprico acidificado e calor seco são os mais adequados para pequenos lotes de sementes. Nenhum dos tratamentos foi 100% eficazes para a erradicação do patógeno ou a prevenção da transmissão de plantas (DUVEILLER, 1990). Vários tratamentos foram aplicados em lotes de sementes para eliminar as bactérias, especialmente acetato de cobre (SCHAAD et al., 1981), formalina (DUVEILLER, 1989) e guazatina (MOHAN & MEHTA, 1985), mas estes tratamentos apresentaram efeitos fitotóxicos.

A termoterapia é um dos métodos mais citados para erradicação de fitobactérias localizadas interna ou externamente nas sementes (KIMURA, 1991; ZAMBOLIM et al., 1997). Por outro lado, pode muitas vezes causar danos à qualidade fisiológica das sementes como, retardamento ou redução da germinação e do vigor (MENTEN, 1995). Além disso, a sua eficiência depende, em grande parte, do tipo

e localização do patógeno alvo, do vigor da semente e da sensibilidade da semente a temperaturas elevadas (MENTEN, 1995). A termoterapia não seria indicada para sementes de grandes culturas como, por exemplo, sementes de trigo.

Produção de sementes, em ambientes secos, utilizando irrigação por sulco reduziu a estria bacteriana e nível de transmissão de *X. translucens* pelas sementes (FORSTER & SCHAAD, 1988). Sementes produzidas sob tais condições, provavelmente, teria um baixo risco de iniciar uma epidemia.

2.5 Técnicas de detecção, quantificação e identificação

A patologia de sementes pode ser considerada como medida preventiva, sendo a semente o meio de transporte para vários patógenos de modo a favorecer a disseminação da doença para locais livres. Além da inexistência de informações concisas no Brasil, o comércio internacional de sementes tem sido afetado significativamente pelas mudanças das regulamentações fitossanitárias (MUNKVOLD, 2009).

Técnicas ou procedimentos que permitem a detecção ou quantificação de bactérias fitopatogênicas constituem-se em ferramentas de grande utilidade em estudos epidemiológicos, certificação de sementes e rotinas quarentenárias, assim como para o controle do patógeno.

Mohan & Mehta (1985) desenvolveram um método de detecção onde injetaram uma suspensão proveniente de uma suspensão de sementes contaminadas com *X. t. pv. undulosa* em plantas, e posterior observação de sintomas, os autores concluíram que o método é eficiente para fins de quarentena, embora seja demorado.

A biologia molecular tem causado mudanças significativas nas formas e técnicas para caracterização e identificação de fitopatógenos. Ferramentas moleculares para a detecção, baseadas em PCR, utilizam *primers* específicos que flanqueiam a região a ser amplificada, sendo responsáveis pela sensibilidade da reação (MOURA et al., 2005).

A Bio-PCR, descrita por Schaad et al. (1995), consiste numa amplificação biológica do DNA alvo seguida de uma amplificação enzimática por PCR, que permite aumentar o nível de detecção relativamente ao PCR clássico e, dada a sua especificidade, dispensa as etapas de caracterização bioquímica após o isolamento clássico. Esta técnica apresenta ainda, relativamente ao PCR tradicional, uma maior sensibilidade de detecção, bem como a eliminação de diversos inibidores de PCR, e a detecção unicamente de células cultiváveis.

Outras técnicas podem ser utilizadas, como por exemplo, a citometria de fluxo, que associada com a microscopia é altamente precisa e rápida (CHITARRA et al., 2000). Há ainda, os kits bioquímicos, os quais são excelentes ferramentas usadas na identificação de patógenos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, no período de março de 2012 a janeiro de 2014.

3.1 Obtenções dos isolados

Os isolados foram obtidos de sementes de trigo a partir de diferentes métodos de extração, bem como a quantificação destes em diferentes técnicas de detecção. Para tanto, as sementes de trigo usadas para a detecção foram produzidas na safra de 2012. As cultivares usadas no presente trabalho foram a BRS 331, proveniente da Embrapa Trigo e, as cultivares Quartzo e Marfim originadas do campo experimental da UPF, Passo Fundo, RS.

3.2 Obtenção dos isolados e cultivo de bactérias "Tipo"

A caracterização para a identificação dos isolados oriundos das detecções foi realizada mediante comparação com bactérias "Tipo". Dentre elas a *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* (580 - ICMP 1409), *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* (581 - ICMP 5752), *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (579 - ICMP 5755),

Pseudomonas syringae pv. *syringae* van Hall 1902 (1022) e *Pseudomonas fuscovaginae* Miyajima, Tanii e Akita 1983 (743) provenientes da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico- IBSBF do laboratório de Bacteriologia Vegetal do Centro Experimental de Campinas.

As bactérias preservadas por liofilização foram ressuscitadas em água peptonada esterilizada e incubadas por uma hora à 28 °C no em estufa bacteriológica. A suspensão bacteriana foi semeada em meio 523 (KADO & HESKETT, 1970) e incubada em estufa bacteriológica à 28 °C ± 2. Foram realizados testes de coloração de Gram, e avaliações quanto à morfologia celular e colonial, fisiologia e testes bioquímicos de acordo com Schaad et al. (2001). Os testes de patogenicidade em plantas de trigo e reação de hipersensibilidade em plantas de tabaco e tomateiro para confirmação da identidade e pureza do material.

3.3 Detecção e quantificação de bactérias fitopatogênicas em sementes de trigo

3.3.1 Detecção pela deposição direta das sementes sobre meio de cultura

Para esse estudo utilizou-se as cultivares BRS 331, Quartzo e Marfim sendo 500 sementes de cada cultivar com duas repetições, num total de 1000 sementes para cada cultivar. As sementes foram previamente desinfestadas em álcool 70% e Hipoclorito 1% para a eliminação de micro-organismos saprófitos que poderiam intervir na avaliação dos resultados. Em seguida, 25 sementes foram distribuídas equidistantes em caixas de acrílico do tipo gerbox contendo meio de cultura 523 (KADO & HESKETT, 1970), e no meio WBC (DUVEILLER, 1990), descrito como sendo semi-seletivo para a bactéria *X.t. pv. undulosa*. Cada gerbox foi considerada como uma repetição. As sementes foram incubadas em estufa bacteriológica a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 48 a 72 horas.

Após o período de incubação, cada caixa gerbox foi avaliada individualmente, de acordo com a presença ou não de bactérias crescidas junto às sementes. A contagem do número de sementes que continham bactérias foi realizada de forma a avaliar a incidência destas na amostra. Colônias com morfologia e aspectos semelhantes à *Xanthomonas* spp. e de *Pseudomonas* spp., junto as sementes, nos diferentes meios de cultura foram contadas. Essa avaliação foi realizada juntamente com as bactérias “Tipo” como referência crescidas nas mesmas condições.

A incidência de bactérias fitopatogênicas em cada cultivar foi calculada a partir do cálculo: número de sementes que apresentaram o crescimento da bactéria característica/número total de sementes no

gerbox X 100. Após avaliação da incidência selecionou-se, aleatoriamente, 5 a 10 colônias de cada cultivar para cada repetição com aspectos colônias de *Xanthomonas* spp. e de *Pseudomonas* spp. as quais foram semeadas em meio 523 (KADO & HESKETT, 1970), e no meio B de King (KING et al., 1954) pelo método de plaqueamento por esgotamento em estrias, de forma a obter colônias isoladas e puras. As placas foram incubadas durante 24 e 48 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o aparecimento da colônias. Após foram preservadas para os estudos subsequentes.

3.3.4 Detecção de bactérias fitopatogênicas com diferentes quantidades de sementes

Neste método procedeu-se a quantificação a partir de amostras de diferentes quantidades de sementes das cultivares BRS 331, Marfim e Quartzo, utilizando 100, 500, 1000 e 3000 sementes. Para este teste, seguiu-se o procedimento dos métodos anteriores, utilizando quantidades de solução salina (0,85% NaCl) esterilizada proporcional ao número de sementes. De cada uma das cultivares foram preparadas três amostras para cada variável (número de sementes) sendo uma com incubação e outra sem incubação. Portanto, seis amostras sementes, sendo três para quantificação sem incubação e três para incubação por 12 horas.

A técnica de diluição e plaqueamento para quantificação seguiu o método descrito nos itens anteriores. Neste ensaio também foi realizada a seleção aleatória de colônias com aspectos morfológicos do gênero *Xanthomonas* spp. e de *Pseudomonas* spp. Essas foram semeadas em meio de cultura 523 (KADO & HESKETT, 1970), em meio WBC (DUVEILLER, 1990), em meio B de King (KING et al., 1954) e meio YDC (SHAAD, 2001) pela técnica de esgotamento em estrias para obtenção de colônias isoladas e puras. A seguir as placas foram colocadas em estufa bacteriológica a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas até o aparecimento das colônias. Após procedeu-se a preservação dos isolados para os estudos subsequentes.

3.3.5 Detecção de bactérias fitopatogênicas pelo método de centrifugação

Para esse método, utilizaram-se amostras de 3000 sementes de cada uma das cultivares (BRS 331, Marfim e Quartzo), com três repetições. Para o preparo das suspensões contendo as sementes, utilizou-se solução salina (0,85% NaCl) esterilizada e gelada (2 a 5 $^{\circ}\text{C}$) adicionado de uma gota de Tween 20, tomando como base o utilizado para 3000 sementes (125 mL). A porção líquida da suspensão foi vertida para tubos de Falcon os quais foram centrifugados a 15000 RCF por 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi resuspenso em 2 mL

de solução salina (0,85% NaCl) esteril. Essa suspensão foi homogeneizada e a seguir procederam-se as diluições seriadas seguidas de plaqueamento em meio de cultura e posterior incubação como nos itens anteriores.

3.3.6 Detecção pelo método de trituração das sementes

A detecção para o método a seguir foi realizada a partir de três amostras de 3000 sementes de cada uma das cultivares BRS 331, Marfim e Quartzo. As amostras foram trituradas em liquidificador convencional por 30 segundos, apenas para quebrar as sementes em pedaços menores com as sementes secas sem a realização de desinfestação. Para cada amostra o jarro do liquidificador foi lavado com água e sabão e, seguida de lavagem com hipoclorito de sódio a 5% e álcool. Após foram realizadas várias lavagens com água corrente e finalizada com água destilada esterilizada. O preparo das suspensões contendo as sementes trituradas seguiu os métodos anteriores. Após a homogeneização realizou-se a diluição seriada, plaqueamento e incubação dos isolados como descrito nos itens anteriores.

3.4 Quantificação das unidades formadoras de colônias

Em todos os métodos de detecção realizados quantificaram-se as UFC, as quais foram calculadas a partir da fórmula: fator de diluição x

volume (mL/semente) x número de UFC (colônias típicas) crescidas no meio de cultura.

O delineamento experimental empregado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), contendo 10 métodos de detecção, sendo cada um composto por três repetições de amostras de sementes de cada cultivar. Para as diluições sucessivas foram realizadas uma series de diluição e plaqueadas três placas de cada uma das diluições, totalizando ao final nove repetições para cada fator de diluição. Os dados originais foram transformados para $\log x$, uma vez que não apresentaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias do erro experimental, indicados pelo teste da razão máxima (teste F máximo) de HARTLEY (1953). Após a transformação dos dados, realizou-se análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Considerou-se como melhor método de extração o que proporcionou aparecimento do maior número de colônias típicas em meio de cultura no menor tempo e simplicidade de preparo.

3.5 Caracterização e identificação dos isolados

Para caracterizar a população de isolados selecionados nos métodos de detecção, promoveu-se o crescimento destes nos meios de cultura 523 (KADO & HESKETT, 1970), meio B de King (KING et al., 1954) e YDC (SHAAD, 2001) de modo que estes evidenciassem

as características morfológicas distintas de cada colônia do microorganismo de interesse, com o intuito de promover o agrupamento dos mesmos. Dessa forma, o crescimento dos isolados foi realizado pelo método do esgotamento por estria, de maneira a obterem-se colônias isoladas e puras facilitando a observação das colônias. As placas foram incubadas a temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ juntamente com as bactérias “Tipo”. Após 24 a 48 horas de incubação avaliaram-se a produção de expolissacarídeo, cor (amarela, creme e/ou marrom), brilho, consistência, bordas, forma, elevação, aparência (translúcidas e/ou opacidade), pigmentos fluorescentes sob luz ultravioleta e, ou ainda aquelas que produziram pigmentos difusíveis, produção de xantomonadina, pigmento característico do gênero *Xanthomonas* spp. (SCHAAD, 2001).

A morfologia celular foi realizada utilizando-se microscópio óptico e pela coloração diferencial de Gram (STANIER et al., 1986) e teste de solubilidade em KOH (RYU, 1940).

A motilidade foi observada através do aspecto do meio de cultura próprio para esse teste após período de incubação. Para tanto, utilizou-se o meio semi-sólido nutriente ágar. A avaliação da motilidade foi considerada como positiva quando o meio de cultura se tornou turvo, enquanto que motilidade negativa o crescimento foi observado apenas na zona onde foi realizada a inoculação no meio.

3.5.1 Ecologia dos isolados

3.5.1.1 Teste de hipersensibilidade

Os testes de hipersensibilidade foram utilizados para classificar os isolados em patogênicos ou não. Dessa forma foram tomadas culturas puras das bactérias isoladas das sementes com 48 horas de crescimento. Para o teste preparou-se uma suspensão $DO_{600} = 0,1$ com aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹ de cada isolado. A inoculação foi realizada na epiderme da parte abaxial, fazendo com que a suspensão bacteriana penetra-se nos espaços intracelulares das folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). O mesmo foi realizado em folhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) (KLEMENT, 1964). A infiltração foi realizada com auxílio de seringas hipodérmicas e, como controle negativo realizou-se o mesmo processo inoculando apenas solução fisiológica a 0,85% esterilizada. Cada isolado foi inoculado em quatro folhas, sendo utilizada cada uma como uma repetição. Essa avaliação também foi realizada com as bactérias “Tipo”. Após 24 horas observou-se a presença ou não de necrose seca nas folhas constatando-se desta forma como resultados positivos (KLEMENT et al., 1964).

3.5.1.2 Provas de patogenicidade

Utilizaram-se como referência os “Postulados de Koch”, requisitos básicos para provar a associação das bactérias isoladas das

sementes como capacidade de causar doença. Todos os isolados provenientes das sementes de trigo e que mostraram reação de hipersensibilidade positiva, foram purificadas e após a obtenção de culturas puras, preparou-se suspensões bacterianas as quais foram ajustada para $DO_{600nm} = 0,1$, correspondendo aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹. Essa suspensão assim ajustada foi inoculada em quatro plantas de trigo, cevada, aveia e arroz. Para isso utilizou-se o método tesoura (esterilizada previamente) a qual era mergulhada na suspensão contendo a bactéria e em seguida provocando os ferimentos. Foram inoculadas quatro plantas de trigo, cevada, aveia e arroz, sendo que para cada planta realizou-se cortes em várias folhas e principalmente na folha bandeira. Esse procedimento foi realizado em quatro repetições para cada isolado e como controle negativo utilizou-se solução fisiológica a 0,85% esterilizada. Essa avaliação também foi realizada com as bactérias “Tipo”. Antes das inoculações as plantas permaneceram em câmara úmida por 24 horas e após a inoculação continuaram em câmara úmida por mais 24 horas. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação e após o surgimento dos sintomas o patógeno foi reisolado. Os tecidos com o sintomas da doença foram submetidos a observações microscópicas para verificar a presença ou não de exsudação de células bacterianas. Após procedeu-se o reisolamento cumprindo-se os Postulados de Koch (KLEMENT, 1964).

3.5.1.3 Produção de toxinas extracelulares

A produção de toxinas extracelulares foi avaliada pela reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco. Para tanto colônias puras de cada uma dos isolados foram cultivadas em meio nutriente líquido por 24 horas. Três métodos foram testados para verificação de produção de toxinas. Método 1) Após 24 horas de crescimento da bactérias filtrou-se em filtros para seringa de 0,20 μm um volume suficiente para ser infiltrados nas folhas de tabaco; método 2) a bactéria crescida em meio nutriente líquido por 24 horas foi fervida por 5 minutos a 97 $^{\circ}\text{C}$ em Banho-Maria e, em seguida, essa suspensão foi filtrada em filtro para seringa de 0,20 μm . Após a filtração, a suspensão foi infiltrada em folhas de tabaco; método 3) foi composto pelo meio nutriente líquido contendo a bactéria crescida em 24 horas, levado para centrifugação de 5,25 x g por 5 minutos, onde o sobrenadante foi filtrado e inoculado em folhas de tabaco. Foi utilizada como controle positivo uma suspensão da bactéria, sem filtração e como controle negativo solução fisiológica a 0,85% esterilizada e meio nutriente puro e estéril.

3.5.2 Testes fisiológicos, nutricionais e bioquímicos

Após a realização dos testes de caracterização morfológica das colônias, reação de hipersensibilidade e de patogenicidade,

selecionaram-se dentro da população grupos/classes de bactérias com semelhanças para serem testados através de testes fisiológicos, bioquímicos pelo Sistema de identificação Biolog GEN III Micro-Plate™ e pelo Kit Bactry.

Para definir os grupos dentro da população de isolados e identificar os isolados foi realizado além dos testes acima o teste LOPAT, que incluem produção de levana em meio com sacarose (FAHY & HAYWARD, 1983), reação de oxidase, atividade pectinolítica em discos de batata, atividade de arginina dihidrolase, e reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco (LELLIOT & STEAD, 1987).

Os isolados primeiramente foram testados quanto a capacidade de uso do oxigênio livre com o objetivo de avaliar se os isolados possuem comportamento aeróbio ou anaeróbio. Para tanto, utilizou-se o meio de cultura O/F de Hugh & Leifson (1953). Para a verificação de reação de oxidase utilizou-se tiras teste de oxidase da marca Microbiologia Bactident® Oxidase (SHAAD, 1988; SHAAD, 2001).

A avaliação da produção da enzima catalase foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Klement et al. (1990).

A temperatura ótima, máxima e mínima de crescimento de cada isolado foi determinada utilizando o meio 523 (KADO & HESKETT, 1970) em placas de Petri, onde os isolados foram semeados sobre o meio de cultura utilizando uma alça de platina pela técnica de esgotamento, buscando a obtenção de colônias isoladas. As

placas contendo as bactérias foram incubadas a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C, utilizando três repetições para cada temperatura. O crescimento foi avaliado em 24 horas para as bactérias do gênero *Pseudomonas* e em 48 horas para *Xanthomonas*.

Todos os isolados foram testados para a redução do leite Litmus, com o objetivo de determinar a acidificação e capacidade de coagulação do leite pelos isolados bacterianos (MARIANO & SILVEIRA, 2005).

A ação nucleadora do gelo pelos isolados foi determinada através da metodologia descrita por Kim et al. (1987).

Quanto a capacidade nutricional dos isolados em utilizar diferentes fontes de carbono e aminoácidos foi utilizando para esse teste o meio de Ayers pH 7,2 (1 g.L⁻¹ de NH₄H₂PO₄; 0,2 g.L⁻¹ de KCl; 0,2 de MgSO₄.7H₂O e 6 g.L⁻¹ de agar), acrescido de 1 ml.L⁻¹ de azul de bromotimol 1,6%. Os testes foram realizados para celobiose, L-asparagina, triptona, L-arabinose, D-manose, D-frutose, D-galactose, sorbitol, manitol, D-trehalose, maltose, L-tirosina em uma concentração final de 1%. Os ensaios foram realizados utilizando em placas de ELISA, com 96 pocinhos por placa. Foram utilizadas oito repetições por isolado. Poços contendo apenas o meio de cultura com o corante foram deixados como controle negativo. Uma suspensão bacteriana foi preparada com culturas de 24 horas de crescimento em meio 523 (KADO & HESKETT, 1970) a 28 °C ± 2 °C em solução fisiológica a 0,85%, esterilizada. Desta suspensão alíquotas de 100 μL

os quais foram depositados em cada pocinho da placa. A seguir, placas foram incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após sete dias a capacidade dos isolados em oxidar ou a fonte de carbono ou o aminoácido foi considerada positiva quando a cor do meio mudou de verde para amarela (SCHAAD, 1988).

O amido é um polissacarídeo de elevado peso molecular. Sua hidrólise foi avaliada utilizando-se culturas puras de todos os isolados em ágar amido (FAHY & HAYWARD, 1983).

O teste da hidrólise da gelatina determina a habilidade do micro-organismo de produzir enzimas proteolíticas (gelatinases) que liquefazem/hidrolisam a gelatina. Com o objetivo de verificar a capacidade de hidrolisar a gelatina pelos isolados, utilizou-se a metodologia descrita por Fahy & Hayward (1983).

Avaliou-se a capacidade dos isolados em produzir enzimas capazes de hidrolisar a caseína, proteína presente no leite, para tanto, utilizou-se o método descrito por Romeiro (2001).

3.5.2 Sensibilidade dos isolados a diferentes antibióticos

O propósito desta metodologia foi testar a resistência dos isolados a antibióticos. Para isto foram preparadas suspensões bacterianas utilizando colônias puras de cada isolado de aproximadamente 10^5 UFC.mL^{-1} e desta suspensão $100\text{ }\mu\text{L}$ foram depositados em placas de Petri contendo meio de cultura 523 (KADO

& HESKETT, 1970) espalhado-se com auxílio de uma alça de Drigalski. Após esse procedimento foram adicionados os discos contendo os antibióticos sobre o meio de cultura. Foram testados novobiocina, kanamicina, oxacilina, eritromicina, clorofenicol, gentamicina e estreptomicina nas concentrações de 10, 30, 01, 15, 30, 10 e 10 µg respectivamente para cada disco de antibiótico.

3.5.3 Crescimento em diferentes meios de cultura

Objetivando selecionar meios de cultivo que proporcione o melhor desenvolvimento das colônias bacterianas de cada isolado, mostrando as características culturais e que facilitem a identificação, foram NA, 523 (KADO & HESKETT, 1970), B de King (KING et al., 1954), YDC (SCHAAD, 2001), WBC (DUVEILLER, 1990) e o meio XTS (SCHAAD, 1995). Para a realização do teste suspensões bacterianas foram obtidas culturas puras de 24 horas as quais foram suspendidas em solução salina a 0,85 % de NaCl. Em cada meio de cultura a ser testado foram adicionados 100 µL de uma suspensão bacteriana de 10^{-4} UFC.mL⁻¹ e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski, em seguida as placas foram incubadas a 28 °C. O crescimento das colônias foi avaliado em 24, 48 e 72 horas considerando aparência das colônias e tempo de crescimento.

3.5.4 Utilização de Kits bioquímicos

Os isolados foram testados quanto a capacidade de uso de fontes de carbono. Para tanto foram utilizado os kit bioquímicos Bactrey e o Sistema de Identificação Biolog® GEN III Micro-Plate™, seguindo as orientações dos fabricantes. Como controle foram utilizado as bactérias “Tipo” de *P. fuscovaginae*, *P. s. pv. syringae*, *X. t. pv. undulosa*, *X. t. pv. cerealis* e *X. t. pv. translucens*.

3.5.5 Correlação filogenética

A análise multivariada tem sido largamente aplicada, permitindo verificar a dissimilaridade e representar a relação entre as amostras por dendrogramas (SCHEFFER-BASSO et al., 2012).

Para a análise dos dados obtidos na identificação, foi utilizado o programa estatístico GENES (CRUZ, 2006). Foi utilizada análise multivariada para variáveis multicategóricas, mediante a geração de uma matriz de dissimilaridade obtida pelo coeficiente (c) de similaridade. Posteriormente foi gerado um dendrograma pelo método de ligação média entre grupos (UPGMA).

3.5.6 Preservação dos isolados

Todas as bactérias isoladas que obtiveram resultados positivos para a hipersensibilidade em tabaco e em tomateiroiro e para o teste de

patogenicidade em trigo foram preservadas. Os isolados foram preservados de três métodos diferentes: preservação dos isolados em meio de cultura com óleo mineral (ROMEIRO, 2001), preservação dos isolados em goma xantana e PVP (DENARDIN & TUMELERO, 2007) e preservação dos isolados em meio de cultura. Para este terceiro método utilizou-se tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura 523 (KADO & HASKET, 1970) esterilizado. Após a solidificação do meio os isolados foram transferidos para os tubos e incubados à 28 °C por 48 horas, em seguida os tubos foram fechados e vedados com filme de PVC e deixados em geladeira à 4 °C.

3.6 Germinações e vigor das sementes

O teste de germinação foi realizado conforme as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009a).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de bactérias em sementes de trigo pela deposição direta das sementes sobre o meio de cultura

No método de semeadura direta das sementes dispostas sobre o meio de cultura 523 (KADO & HESKET, 1970) não foi possível analisar com precisão a quantidade e tão pouco saber que bactéria poderia estar presente junto as sementes. Isto é devido provavelmente

às características de exigências nutricionais das bactérias de interesse e também devido à composição do meio de não ser um meio semi-seletivo para cada gênero dentro do grupo investigado. Assim, devido ao grande número de contaminantes a leitura foi imprecisa na avaliação da incidência. Porém, quando foi realizada a semeadura direta das sementes sobre o meio de cultura semi-seletivo WBC (DUVEILLER, 1990) foi possível calcular a incidência dos grupos de isolados com características morfológicas coloniais de *Xanthomonas*. Os resultados apontam que a cultivar Quartzo apresentou a maior incidência com 92% de sementes infectadas, a cultivar Marfim apresentou 84% de incidência desta mesma bactéria em sementes e a cultivar BRS 331 apresentou o menor índice de incidência tendo 78% das sementes infectadas. Vale ressaltar que apesar deste meio ser eficiente para o crescimento desta bactéria, a avaliação só pode ser realizada apenas após 72 horas.

Há trabalhos onde avaliaram a bactéria *X. t. pv. undulosa* sendo isoladas de folhas e sementes em meio de WBC (DUVEILLER, 1990) e estes mostram a eficiência do meio de cultura na detecção e identificação da bactéria em amostras de sementes com suspeitas de contaminação por esta fitobactéria (DUVEILLER, 1989; SANDS & FOUREST, 1989).

O meio de cultura semi-seletivo XTS é utilizado para a identificação de *X. t. pv. translucens* (SCHAAD & FORSTER, 1985) favoreceu o crescimento da bactéria em 72 horas, sendo possível

calcular a incidência da bactéria com características de *Xanthomonas* isolado de sementes de trigo. Dentre as cultivares utilizadas neste estudo apenas a cultivar BRS 331 apresentou o crescimento da bactéria pela deposição direta das sementes em meio de cultura, obtendo 68% de incidência.

Segundo Romeiro (2001), devido à grande diversidade de micro-organismos que constituem a microbiota associada a sementes, o uso de meios semi-seletivos só é eficiente quando este apresentar efetiva seletividade, alta supressão para micro-organismos saprofitos e baixo índice de repressão para a bactéria fitopatogênica. Além disso, para a avaliação criteriosa de um método para a detecção do agente patogênico, deve ser levada em consideração características básicas como a praticidade, rapidez na obtenção de resultados, custo, facilidade para análise, identificação (DENARDIN et al., 2004).



Figura 1 - (B) Teste de incidência em sementes, em meio 523. (A) Teste de incidência em sementes, podendo ser observadas colônias bacterianas do gênero *Xanthomonas* em meio WBC. (Foto: STEILMANN, P.)

Iqbal et al. (2013) obtiveram em seus estudos no Paquistão, incidências variando de 20 a 80 % em folhas de plantas de trigo da bactéria *X. t. pv. undulosa*, tendo sido isolada esta bactéria a partir de folhas com a presença de sintomas da estria bacteriana. Trabalhos epidemiológicos realizados no Canadá por Sutton & Wallen (1970) demonstraram que 0,5% de sementes infectadas por *X. p. var. fuscans* seria o suficiente para desencadear uma epidemia e causar dano a campo.

4.2 Quantificação de bactérias presentes em sementes de trigo por diferentes métodos de detecção

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

A partir dos testes de detecção, foi realizada a quantificação de 11 grupos de isolados bacterianos, os quais foram separados pelas características morfológicas das colônias e foram agrupados pelas semelhanças (Tabela 1).

Tabela 1 - Grupos de bactérias isoladas de sementes de três cultivares de trigo e suas principais características coloniais. UPF, Passo Fundo, RS.

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

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

Na Tabela 2, observa-se a diferença estatística entre os métodos e entre as amostras comparando-se as médias de UFC/sementes para o grupo de isolados BRS - AG, grupo MRF - AG e para o grupo o QTZ - AG.

Assim podemos afirmar que, os métodos, o que proporcionaram o maior número de UFC, crescidas em meio de cultura foram os métodos que utilizaram 3000 sementes. Entre as cultivares a que apresentou maior quantidade de UFC/semente para

este grupo de isolados foi a cultivar Quartzo, o que confirma o teste de incidência em sementes.

Tabela 2 - Quantificação dos isolados BRS-AG, MRF-AG e QTZ-AG crescidos em meio 523 em diferentes métodos de detecção. UPF, Passo Fundo, RS

Métodos	Cultivar					
	BRS 331		Marfim		Quartzo	
3000 ST	5,3 X 10 ⁵	aC	1,7 X 10 ⁶	aB	8,8 X 10 ⁶	aA
3000 SCC	5,3 X 10 ⁵	aB	7,9 X 10 ⁵	aB	7,9 X 10 ⁶	aA
3000 SSI	6,6 X 10 ³	aB	4,5 X 10 ⁴	aA	1,7 X 10 ⁵	aA
3000 SCI	1,8 X 10 ⁶	bB	9,5 X 10 ⁵	bB	6,5 X 10 ⁶	bA
1000 SCI	1,9 X 10 ³	bA	2,5 X 10 ³	cA	3 X 10 ³	cA
1000 SSI	1,5 X 10 ³	bB	2,1 X 10 ³	cdA	2,2 X 10 ³	cdA
500 SCI	1,7 X 10 ²	bA	1,9 X 10 ³	cdA	2,2 X 10 ³	cdA
500 SSI	1,5 X 10 ³	bB	1,7 X 10 ³	cdAB	1,8 X 10 ³	dA
100 SCI	4,8 X 10 ²	bA	7,1 X 10 ²	cdAB	8,8 X 10 ²	eA
100 SSI	6,4 X 10 ²	bA	5 X 10 ²	dD	6,4 X 10 ²	eA
C.V. (%)	17,27		7,97		2,75	

(ST) sementes trituradas; (SC) sementes com centrifugação; (SCI) sementes com incubação; (SSI) sementes sem incubação. As médias dentro de cada coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Letras minúsculas indicam a diferença entre os métodos na coluna e letras maiúsculas diferença entre as amostras de semente na linha.

O grupo de isolados BRS-AC, MRF-AC e QTZ-AC (BRS 331 - amarela clara, Marfim - amarela clara, Quartzo - amarela clara) foi detectado em todas as amostras de sementes por todos os métodos testados. O método que utilizou 3000 sementes e trituração foi o mais eficiente para a detecção destes isolados, através dele obteve-se um número maior de UFC/semente em todas as amostras (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantificação dos isolados BRS-AC, MRF-AC e QTZ - AC crescidos em meio 523 em diferentes métodos de detecção. UPF, Passo Fundo, RS

Método	Cultivar					
	BRS 331		Marfim		Quartzo	
3000 ST	5,3 X 10	aA	4,6 X 10	aB	4,1X 10	aC
3000 SCC	4,3 X 10	abA	7,9 X 10	abB	2,7 X 10	abC
3000 SSI	3,4 X 10	bcA	3,4 X 10	abA	1,9 X 10	cB
3000 SCI	4,2 X 10	abA	3,8 X 10	abA	2,9 X 10	abB
1000 SCI	4,2 X 10	abA	2,9 X 10	cB	3,6 X 10	cAB
1000 SSI	1,6 X 10	deB	1,4 X 10	cB	2 X 10	cA
500 SCI	2,8 X 10	efA	3,4 X 10	cA	3,1 X 10	bcA
500 SSI	1,5 X 10	fA	1,7 X 10	bA	1,8 X 10	abA
100 SCI	4,5 X 10	cdA	3,1 X 10	abB	2,2 X 10	abC
100 SSI	2,2 X 10	abAB	1,5 X 10	bB	1,4 X 10	abcA
C.V. (%)	6,75		6,39		13,29	

(ST) sementes trituradas; (SC) sementes com centrifugação; (SCI) sementes com incubação; (SSI) sementes sem incubação. * As médias dentro de cada coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Letras minúsculas na coluna indicam a diferença entre os métodos na coluna e letras maiúsculas na linha a diferença entre as amostras de semente na linha.

Os isolados com característica cultural amarela forte foram detectadas apenas na cultivar BRS 331 em maior quantidade ao utilizar os métodos com 3000 sementes (Tabela 4).

Tabela 4 - Quantificação do isolado BRS-AF em diferentes métodos de detecção. UPF, Passo Fundo, RS

Método	Cultivar			
	BRS 331		Marfim	Quartzo
3000 ST	6,6 X 10	a	IND	IND
3000 SCC	4,2 X 10	abcd	IND	IND
3000 SSI	3,4 X 10	c	IND	IND
3000 SCI	4,2 X 10	b	IND	IND
1000 SCI	4 X 10	bc	IND	IND
1000 SSI	2,2 X 10	de	IND	IND
500 SCI	2,7 X 10	d	IND	IND
500 SSI	1,7 X 10	ef	IND	IND
100 SCI	2,1 X 10	de	IND	IND
100 SSI	1,4X 10	f	IND	IND
C.V. (%)	7,24			

(ST) sementes trituradas; (SC) sementes com centrifugação; (SCI) sementes com incubação; (SSI) sementes sem incubação. As médias dentro de cada coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. (IND) Isolado não detectado nesta cultivar.

Foram detectados e quantificados os isolados MRF-VD, QTZ - VD nas cultivares Marfim e Quartzo, em quantidades superiores de UFC/semente na cultivar Quartzo quando o método utilizado foi com 3000 sementes com trituração (Tabela 5).

Tabela 5 - Quantificação dos isolados MRF-VD e QTZ - VD em diferentes métodos de detecção. UPF, Passo Fundo, RS

Método	Cultivar				
	BRS 331	Marfim		Quartzo	
3000 ST	IND	1,3 X 10 ⁶	aA	7,8 X 10 ⁶	aA
3000 SCC	IND	7,9 X 10 ⁵	abA	7,5 X 10 ⁶	abA
3000 SSI	IND	8,8 X 10 ⁵	abcdA	5,6 X 10 ⁶	bcA
3000 SCI	IND	2,1 X 10 ⁵	abcA	4,6 X 10 ⁴	abB
1000 SCI	IND	2,3 X 10 ³	eA	2,6 X 10 ³	efA
1000 SSI	IND	2,2 X 10 ³	deA	4,6 X 10 ⁴	deB
500 SCI	IND	1,7 X 10 ³	eA	2,1 X 10 ³	fA
500 SSI	IND	1,6 X 10 ³	bcdB	1,7 X 10 ³	cdA
100 SCI	IND	5,7 X 10 ²	cdeA	7 X 10 ²	cdB
100 SSI	IND	1,5 X 10	cdeA	1,4 X 10	deA
C.V. (%)		24,20		22,47	

(ST) sementes trituradas; (SC) sementes com centrifugação; (SCI) sementes com incubação; (SSI) sementes sem incubação. (IND) Isolado não detectado nesta cultivar. As médias dentro de cada coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Letras minúsculas indicam a diferença entre os métodos na coluna e letras maiúsculas diferença entre as amostras de semente na linha.

Os isolados MRF-ATR e QTZ-ATR foram detectados nas cultivares Marfim e Quartzo. Para a cultivar Marfim o melhor método de detecção foi a utilização de 3000 sementes com trituração. Para a amostra de sementes da cultivar Quartzo os métodos de detecção com 3000 sementes e trituração, centrifugação e com período de 12 horas de incubação não se diferenciaram entre si, sendo os melhores para a detecção destes isolados nesta amostra.

Tabela 6 - Quantificação dos isolados MRF - ATR e QTZ - ATR em diferentes métodos de detecção. UPF, Passo Fundo, RS

Método	Cultivar				
	BRS 331	Marfim	Quartzo		
3000 ST	IND	5,2 X 10 ²	aB	5,8 X 10 ²	aA
3000 SCC	IND	1,8 X 10 ²	abB	1,7 X 10 ²	aA
3000 SSI	IND	1,5 X 10	bA	1,6 X 10 ²	aA
3000 SCI	IND	2 X 10	bA	2,8 X 10	bA
1000 SCI	IND	1,6 X 10	cA	1,4 X 10	cA
1000 SSI	IND	9,4 X 10	cdA	7,1 X 10	cA
500 SCI	IND	8,7 X 10	dA	1,2 X 10	cA
500 SSI	IND	9,5 X 10	cA	9,1 X 10	bA
100 SCI	IND	1,6 X 10 ¹	cdA	1 X 10 ¹	bA
100 SSI	IND	7 X 10	cdA	6,7 X 10	cA
C.V. (%)		10,36		8,96	

(ST) sementes trituradas; (SC) sementes com centrifugação; (SCI) sementes com incubação; (SSI) sementes sem incubação. (IND) Isolado não detectado nesta cultivar. As médias dentro de cada coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Letras minúsculas indicam a diferença entre os métodos na coluna e letras maiúsculas diferença entre as amostras de semente na linha.

Através da análise estatística observou-se que o método utilizando 3000 sementes com trituração se destacou em todas as amostras, sendo capaz de detectar os isolados bacterianos em maior número de UFC/semente.

A detecção das bactérias nos métodos com maiores quantidades de sementes e com períodos de incubação à temperatura de 4 °C foram mais eficientes, tendo apresentado maior número de UFC/semente. Neste contexto, vale ainda ressaltar a importância do tamanho da amostra na detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes. Valarini & Menten (1992), avaliaram técnicas de extração de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* de sementes de feijão, tendo

observado que os melhores métodos compreendem os que possuem período de incubação das sementes.

Não se pode apontar para o uso rotineiro, se o objetivo for quantificação de bactérias em sementes a utilização de amostras com 100 ou 500 sementes, pois, deste modo amostras com menor porcentagem de infecção poderão não ser detectados como contendo o patógeno, ou subestimar a quantidade da bactéria.

Bactérias associadas ao tegumento das sementes são facilmente detectadas no meio de cultura (LEBEN, 1981). Contudo, em trabalhos realizados por Valarini & Menten (1992) mostraram que fitobactérias que estão infectando a semente foram melhor detectadas quando utilizando sementes trituradas para a detecção, o que também foi observado neste trabalho. Para todos os isolados o método de detecção com trituração das sementes esteve entre os métodos que apresentaram maiores índices de UFC/semente.

Trabalhos mostram a capacidade de patógenos ficarem por longos períodos de tempo associados às sementes. As sementes utilizadas neste trabalho permaneceram armazenadas há aproximadamente seis meses, Schuster & Sayre (1967) encontraram *Xanthomonas phaseoli* e *X. phaseoli* var. *fuscans* em sementes de feijoeiro após 15 anos de armazenamento. Forster & Schaad (1987), estudando bactérias fitopatogênicas que podem ser transmitidas pelas sementes, observaram que destas bactérias alguns gêneros podem sobreviver em sementes de mais de 63 meses.

Mehta (1990) estudando técnica para detecção e identificação de *X. t. pv. undulosa* e *X. t. pv. hordei* desenvolveu uma metodologia que consistiu de uma suspensão a partir de sementes, a qual foi injetada em plantas de trigo, após 7-12 dias avaliou o aparecimento de sintomas de estria bacteriana e ao realizar a identificação constatou a eficiência do método.

Frommel & Pazos (1994), utilizaram meios semi-seletivos enriquecidos combinados com sorologia, estes apresentaram bons resultados na detecção de *X. translucens* em amostras de sementes contaminadas com estes patógenos.

Tendo em vista a falta de controle para doenças de origem bacteriana em trigo, a utilização de sementes livres destes patógenos e de cultivares resistentes, são as melhores formas de evitar a ocorrência de epidemias. Dentre dos aspectos epidemiológicos a semente é, sem dúvida, um dos principais mecanismos de sobrevivência e disseminação de bactérias a longa distância, já que as mesmas apresentam baixa efetividade quando expostas ao solo e permanecem presentes em resíduos vegetais enquanto não for decomposto (MARCUIZZO, 2009). Fatores como temperatura, umidade relativa, chuva e o vento fazem o deslocamento de bactérias que possam estar presentes na superfície de plantas hospedeiras, ou não hospedeiras, favorecendo o surgimento de uma epidemia.

4.3 Caracterização e identificação dos isolados

4.3.1 Ecologia dos isolados

4.3.1.1 Reação de hipersensibilidade

Observou-se que houve diferença na intensidade das reações de hipersensibilidade entre os isolados e entre tabaco e tomateiro. Os grupos BRS-AG, BRS-AC, BRS-AF, MRF-AG, MRF-AC, QTZ-AC e QTZ-AG apresentaram sintomas de hipersensibilidade mais intensos em tomateiro, já os grupos MRF-ATR, MRF-VD, QTZ-ATR e QTZ-VD reagiram positivamente em tabaco (Figura 2).



Figura 2 - (A) Reação de hipersensibilidade em tomateiro, foto tirada com 72 horas após a inoculação causada pelo grupo de isolado QTZ-AG. (B) Reação de hipersensibilidade em tabaco causada pelo isolado MRF-ATR, foto tirada com 48 horas. (Foto: STEILMANN, P.)

Espécies bacterianas de alguns gêneros fitopatogênicos deixam de incitar HR em hospedeiros incompatíveis sob condições normais de inoculação e incubação, neste contexto, Lelliott & Stead (1987) afirmam que muitas espécies ou patovares de *Xanthomonas* spp. não são capazes de incitar HR em folha de tabaco, sugerem então tomateiro e pimentão, utilizando as mesmas condições pré e pós-inoculação. Sendo assim, por serem capazes de incitar reação de hipersensibilidade em tomate confirma-se novamente que os isolados com característica amarela clara, amarela forte e amarela gomosa pertencem ao gênero *Xanthomonas*.

4.3.2.2 Provas de patogenicidade

Todos os isolados causaram patogenicidade em trigo (Figura 3). Ao realizar os testes, comprovaram-se os “Postulados de Kock”, e ao reisolar, constatou-se que se tratavam dos isolados que haviam sido inoculados.

Estes resultados foram observados mantendo as plantas inoculadas com os isolados em câmara úmida por 24 horas. Stromberg, Kinkel & Leonard (1999), obtiveram altos níveis de doença ocasionados pela bactéria *X. t. pv. translucens* mantidas em períodos de 6 horas de molhamento foliar. Vários estudos anteriores envolvendo bactérias fitopatogênicas indicaram a necessidade de cobrir as plantas com sacos de plástico para manter a umidade na

superfície foliar (TIMMER, MAROIS & ACHOR, 1987). Períodos de molhamento foliar após a inoculação proporcionaram o aparecimento dos sintomas de estria bacteriana causada por *X. c. pv. translucens* (AZAAD & SCHAAD, 1988). O molhamento foliar do ponto de vista epidemiológico é necessário para a ocorrência de infecções bacterianas (KINKEL & LINDOW, 1993).



Figura 3 - Sintoma em folha de trigo causada pelo isolado MRF-ATR (A) e MRF-AG (B). (Foto: STEILMANN, P.)

Tabela 8 - Reação de patogenicidade dos grupos de isolados e das bactérias “Tipo” em diferentes hospedeiros. UPF, Passo Fundo, RS.

Isolados	Hospedeiros			
	Trigo	Aveia	Arroz	Cevada
580	+	-	-	+
743	+	-	-	+
BRS-AC	+	-	-	+
MRF-AC	+	-	-	+
MRF-ATR	+	-	-	+
QTZ-AC	+	-	-	+
QTZ-ATR	+	-	-	+
579	+	+	-	+
BRS-AG	+	+	-	+
MRF-AG	+	+	-	+
QTZ-AG	+	+	-	+
581	+	-	+	+
BRS-AF	+	-	+	+
1022	+	+	+	+
MRF-VD	+	+	+	+
QTZ-VD	+	+	+	+

(580) *X. t. pv. cerealis*. (579) *X. t. pv. undulosa*. (581) *X. t. pv. translucens*. (1022) *P. s. pv. syringae*. (743) *P. fuscovagine*. (+) Reação positiva para patogenicidade. (-) Reação negativa para patogenicidade.

4.3.1.3 Produção de toxinas extracelulares

Todas as bactérias isoladas das sementes de trigo foram capazes de produzir toxinas extracelulares. Os resultados foram avaliados em 24 e 48 horas, porém, já após 24 horas pode-se perceber que todas as inoculações realizadas com as suspensões de todos os isolados, inclusive o controle positivo já apresentavam aspecto de encharcamento e após 48 horas observou-se a necrose nas folhas (Figura 4).

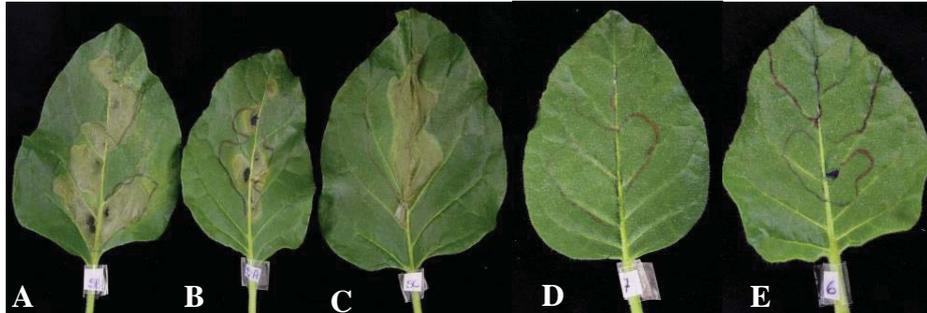


Figura 4 - Reação de hipersensibilidade causada por: A) Hipersensibilidade pelo método em Meio nutriente fervido por 5 minutos à 98°C e filtrado B) Hipersensibilidade pelo método em meio nutriente filtrado C) Controle positivo/hipersensibilidade pelo método normal; D) Controle negativo/NA; E) Controle negativo/água destilada. (Foto: STEILMANN, P., 2013)

Khezri et al . (2010) relataram a produção de siringomicina por cepas de *P. s. pv. syringae*, causando sintomas em cana de açúcar, pessegueiro, cereja doce, trigo, cevada e hibisco. Estas toxinas são metabolitos secundários de diversas estruturas químicas e são eficazes em concentrações muito baixas (MITCHELL, 1991) . Siringomicina tem sido utilizada como uma característica determinante na identificação de estirpes patogênicas de *P. s. pv. syringae* (SCHAAD et al., 1989; . YOUNG, 1991).

4.3.2 Classificação dos isolados por gênero

Após a confirmação da patogenicidade, os isolados foram separados em grupos pelas semelhanças em características culturais e testes básicos em microbiologia, como coloração de Gram, presença de pigmento fluorescente em meio de cultura, motilidade, reação de oxidase, produção de xantomonadina e LOPAT.

Os testes LOPAT foram realizados apenas com os isolados que apresentaram características coloniais do gênero *Pseudomonas* (tabela 7).

Tabela 7 - Reação dos isolados do gênero *Pseudomonas* ao LOPAT. UPF, Passo Fundo, RS

Testes LOPAT	Isolados			
	MRF - VD	MRF - ATR	QTZ - VD	QTZ - ATR
Levan	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Atividade pectolítica em batata	-	-	-	-
Arginina dihidrolase	-	-	-	-
HR em tabaco	+	+	+	+

(+) Reação positiva dos isolados ao teste. (-) Reação negativa dos isolados ao teste. (HR) Reação de hipersensibilidade.

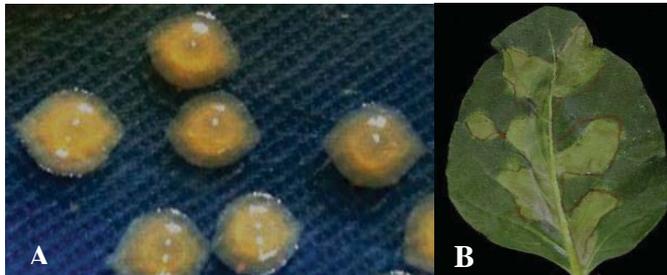


Figura 5 - (A) Teste de levana positivo e (B) reação de hipersensibilidade em tabaco positiva para o isolado MRF - ATR.

Schaad et al. (2001), relatam os testes bioquímicos e nutricionais para identificação das espécies fitopatogênicas do gênero *Pseudomonas*, sendo a identificação principalmente baseada no teste LOPAT, que incluem produção de levana em meio com sacarose, reação de oxidase, atividade pectinolítica, atividade de arginina dihidrolase, e reação de hipersensibilidade em folhas de tabaco. Ao realizar os testes LOPAT com os isolados, observou-se que houve reação igual para todos os testes, exceto para reação da oxidase a qual foi positiva para as bactérias com característica de colônia de cor creme e pigmento verde difusível. Entretanto, as bactérias com colônias amarelas translúcidas a luz reagiram negativamente para este teste.

A produção de xantomadina foi positiva para todos os isolados de coloração amarela e com consistência mucóide.

Os testes básicos de identificação permitiram a formação de dois grupos: um deles com características do gênero *Xanthomonas* spp., identificados neste gênero pela produção de xantomadina, por

terem célula em forma de bastonetes, individuais ou em pares, células móveis, aeróbicas, coloração da colônia amarela com superfície lisa, convexas e gomosa/mucóide, Gram negativas, oxidase negativa e apresentarem reação de hipersensibilidade em tomateiro. Outro gênero foi identificado como *Pseudomonas* spp. através dos testes LOPAT, com células em bastonete reto, móvel, coloração da colônia amarela translúcida a luz e creme, Gram negativas, produção de pigmento fluorescente, pigmento difusível no meio de cultura e por serem estritamente aeróbicas.

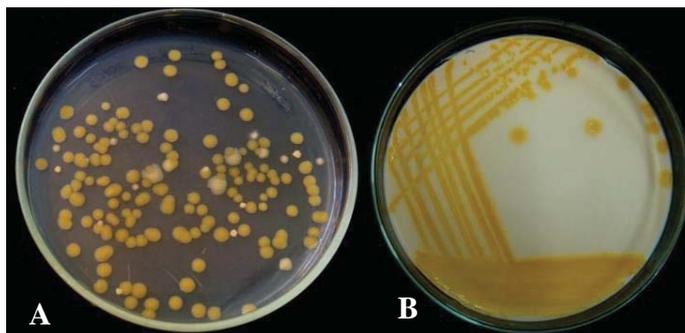


Figura 6 - Quantificação de bactérias isoladas de sementes (A), purificação do isolado em meio de cultura YDC (B) (Foto: STEILMANN, P.)

4.3.3 Testes fisiológicos, nutricionais e bioquímicos

O grupo de isolados do gênero *Xanthomonas* reagiu de forma alcalina ao leite litmus, enquanto que os isolados do gênero *Pseudomonas* obtiveram reação ácida.

Todas as bactérias isoladas das sementes de trigo neste estudo foram capazes de realizar nucleação do gelo. Várias espécies de bactérias são capazes de catalisar a formação de gelo em temperaturas que normalmente isso não ocorreria. Estes micro-organismos catalisam de forma eficiente a formação do gelo em temperaturas muito mais altas que muitas substâncias orgânicas ou inorgânicas (GURIAN-SHERMAN & LINDOW, 1993). Kim et al. (1987), testaram a capacidade nucleadora do gelo por isolados de *X. c. pv. translucens* e observaram resultado positivo.

A atividade de nucleação de gelo está fortemente correlacionada com a capacidade de estimular a ocorrência de doença por quedas de temperatura, sendo uma das propriedades necessárias para ocasionar danos às plantas (LINDOW et al., 1982). Os danos às plantas ocorrem devido à formação de gelo nos espaços intercelulares em temperaturas onde este fenômeno normalmente não ocorreria (LINDOW, 1987; EDWARDS et al., 1994). Moléculas de proteínas e materiais localizados na membrana externa de algumas espécies bacterianas foram consideradas por Kawahara (2002) como sendo as responsáveis pela nucleação de gelo. Substâncias nucleadoras de gelo podem estar relacionadas a fosfolipídios e a outros fatores ligados a proteínas (ROMEIRO, 2001).

A capacidade de utilização de açúcares e aminoácidos, assim como o resultado de testes bioquímicos pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9 – Capacidade dos grupos de isolados bacterianos e das bactérias “Tipo” na utilização de diferentes compostos e testes bioquímicos. UPF, Passo Fundo, RS.

Açúcares/ Aminoácidos/ Testes bioquímicos	Isolados										<i>Pseudomonas</i>					
	<i>Xanthomonas</i>										<i>Pseudomonas</i>					
	579	580	581	BRS-AG	MRF-AG	QTZ-AG	BRS-AC	MRF-AC	QTZ-AC	BRS-AF	1022	MRF-ATR	QTZ-ATR	743	MRF-VD	QTZ-VD
Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
L-Tirosina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-
D- Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D- Frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triptona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
L- Asparagina	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	nd	nd	nd
Hidrólise da caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hidrólise do amido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólise da gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

(580) *X. t. pv. cerealis*. (579) *X. t. pv. undulosa*. (581) *X. t. pv. translucens*. (1022) *P. s.e pv. syringae*. (743) *P. fuscovagine*. (-) resultado negativo para a reação; (+) resultado positivo para a reação. (nd) Resultado não definido.

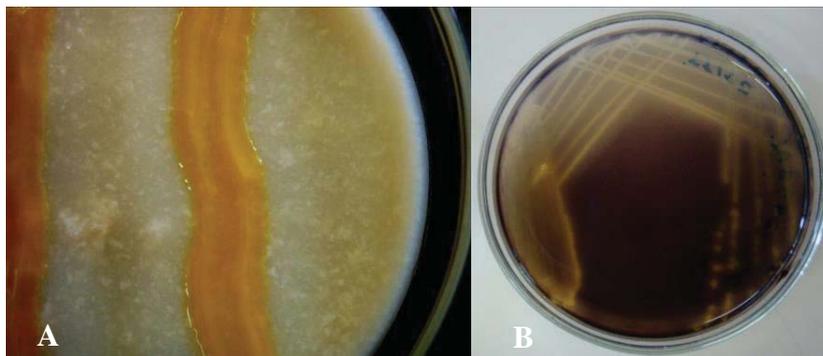


Figura 7 - A) Hidrólise da caseína, reação ocasionada pelo grupo de isolado QTZ-AG B) Hidrólise de amido, ocasionada pelo isolado QTZ-AC. (Foto: STEILMANN, P., 2012)

4.3.2.1 Reação dos isolados a diferentes antibióticos

Sensibilidade dos isolados para os diferentes antibióticos esta demonstrada na Tabela 10.

Antibióticos são substâncias orgânicas produzidas por micro-organismos, os quais tem potencial de inibir o crescimento ou a multiplicação de outros micro-organismos (WAKSMAN, 1959).

Tabela 10 - Reação do grupo de isolados e de bactérias "Tipo" frente a diferentes antibióticos. UPF, Passo Fundo, RS

Isolados	Antibióticos						
	Novobiocina	Kanamicina	Oxacilina	Eritromicina	Clorofenicol	Gentamicina	Estreptomicina
580	S	S	R	S	S	R	S
579	S	S	R	S	S	R	S
BRS-AG	S	S	R	S	S	R	S
MRF-AG	S	S	R	S	S	R	R
QTZ-AG	S	S	R	S	S	R	S
BRS-AC	S	S	R	S	S	R	S
MRF-AC	S	S	R	S	S	R	S
QTZ-AC	S	S	R	S	S	R	S
581	R	R	R	S	S	R	S
BRS-AF	R	R	R	S	S	R	S
1022	S	S	R	R	S	S	S
743	S	S	R	R	S	S	S
MRF-ATR	S	S	R	R	S	S	S
QTZ-ATR	S	S	R	R	S	S	S
MRF-VD	S	S	R	R	S	S	S
QTZ-VD	S	S	R	R	S	S	S

(580) *X. t. pv. cerealis*. (579) *X. t.pv. undulosa*. (581) *X. t.pv. translucens*. (1022) *P. s. pv. syringae*. (743) *P. fuscovagine*. (R) O isolado apresentou crescimento na presença do antibiótico. (S) O isolado teve o crescimento inibido pelo antibiótico.

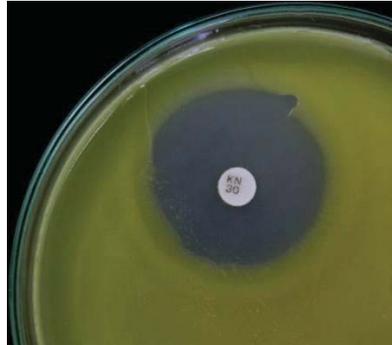


Figura 8 - Crescimento do isolado QTZ-AG inibido pela presença do antibiótico Kanamicina em concentração de 30 μg . (Foto: STEILMANN, P., 2013)

A interferência dos antibióticos no crescimento de fitobactérias já era esperada, como observado em inúmeros trabalhos utilizando diferentes espécies de *Xanthomonas* spp. e *Pseudomonas* spp. (SCHAAD & WHITE, 1974; LANNA FILHO & ROMEIRO, 2009).

Sahin & Miller (1996), realizaram estudos avaliando a resistência e suscetibilidade de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* à estreptomicina ($25 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) em Ohio, onde encontraram cerca de 30% de isolados resistentes.

4.3.2.2 Crescimento em diferentes meios de cultura

O crescimento em diferentes meios de cultura é um dos métodos básicos para a identificação de bactérias fitopatogênicas. Através deles pode-se favorecer as características de uma determinada espécie, como a difusão de fluorescência ou destaque da coloração da

colônia. Através do meio YDC (SHAAD, 1988) pode-se observar que os grupos BRS-AG, MRF-AG, QTZ-AG possuem colônias de cor amarela forte e brilhante, já os grupos BRS-AC, MRF-AC e QTZ-AC possuem colônias cor amarelo fraco (amarelo limão) e brilhantes, o grupo BRS-AF se diferenciou dos demais, não pela coloração que também é amarela, mas pela forma da colônia que é opaca (Figura 9).

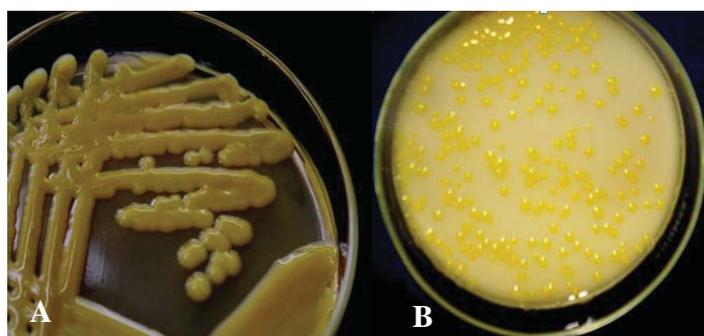


Figura 9 - (A) Isolado BRS-AC em meio 523. (B) Isolado BRS-AG em meio de cultura YDC. (Foto: STEILMANN, P.)

Todos os isolados obtiveram crescimento nos meio NA e 523, porém observou-se diferença na morfologia das colônias. Pela concentração de açúcar contida no meio NA, os grupos BRS-AG, BRS-AC, BRS-AF, MRF-AG, MRF-AC, QTZ-AC e QTZ-AG produziram maior quantidade de exopolissacarídeo, modificando a morfologia característica das colônias de *Xanthomonas* spp..

O meio B de King possibilitou visualizar o pigmento fluorescente liberado pelos grupos MRF-ATR, MRF-VD, QTZ-ATR e QTZ-VD sob luz ultravioleta, assim como crescimento em 24 horas

(Figura 10 (B)). A bactéria *Pseudomonas fuscovagine* sp. em meio King B produz pigmento fluorescente (ZEIGLER & ALVAREZ, 1987; ROTT et al., 1989).

O meio WBC, descrito como meio semi-seletivo para *X. t. pv. undulosa* (DUVEILLER, 1990), favoreceu apenas o crescimento dos grupos BRS-AG, MRF-AG e QTZ-AG apresentaram crescimento, porém com desenvolvimento lento em comparação ao crescimento dos mesmos grupos em outros meios de cultura, sendo observado somente após 48-72 horas. O meio de cultura semi-seletivo XTS é utilizado para a identificação de *X. t. pv. translucens* (SCHAAD & FORSTER, 1985), este meio favoreceu o crescimento do grupo de bactérias BRS-AF em 48-72 horas (Figura 10 (A)).

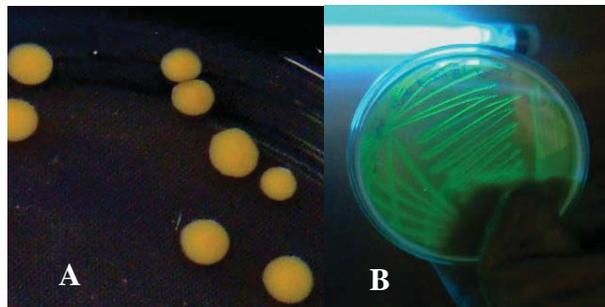


Figura 10 - (A) Isolado BRS - AF em meio XTS. (B) Isolado MRF-VD em meio B de King, fotografada em luz UV. (Foto: STEILMANN, P.)

Todos os isolados mostraram comportamento aeróbico em meio de cultura O/F.

Analisando o crescimento dos isolados em meio de cultura em diferentes temperaturas foi possível definir a temperatura mínima, máxima e ótima de crescimento de cada grupo de bactérias (Tabela 11). Os grupos BRS-AG, BRS-AC, BRS-AF, MRF-AG, MRF-AC, QTZ-AC e QTZ-AG apresentaram melhor crescimento em 25 a 30 °C, sendo isto avaliado pelo desenvolvimento da colônia em comparação às demais temperaturas. Estes mesmos grupos não se desenvolveram a 0 °C e nem a 40 °C, sendo as temperaturas máximas e mínima de crescimento 5 e 35 °C. Os grupos MRF-ATR e QTZ-ATR tiveram crescimento mínimo e máximo à 10 e 35 °C respectivamente, a temperatura ótima de crescimento para estas bactérias foi observada a 25 °C. As bactérias dos grupos MRF-VD e QTZ-VD apresentaram crescimento mínimo a 5 °C, máximo à 35 °C e ótima a 25 °C.

Tabela 11 - Capacidade de crescimento dos grupos de isolados e das bactérias “tipo” em diferentes temperaturas em 24 horas. UPF, Passo Fundo, RS.

Isolados	Temperatura (°C)								
	0	5	10	15	20	25	30	35	40
579	-	+	+	+	+	+	+	+	-
580	-	+	+	+	+	+	+	+	-
581	-	+	+	+	+	+	+	+	-
1022	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BRS-AG	-	+	+	+	+	+	+	+	-
MRF-AG	-	+	+	+	+	+	+	+	-
QTZ-AG	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BRS-AC	-	+	+	+	+	+	+	+	-
MRF-AC	-	+	+	+	+	+	+	+	-
QTZ-AC	-	+	+	+	+	+	+	+	-
BRS-AF	-	+	+	+	+	+	+	+	-
MRF-VD	-	+	+	+	+	+	+	+	-
QTZ-VD	-	+	+	+	+	+	+	+	-
743	-	-	+	+	+	+	+	+	-
QTZ-MRF	-	-	+	+	+	+	+	+	-
QTZ-ATR	-	-	+	+	+	+	+	+	-

(580) *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis*. (579) *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*, (581) *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, (1022) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. (743) *Pseudomonas fuscovaginae*. (-) Reação negativa, indicando que não houve o crescimento da bactéria e (+) Reação positiva, indicando o crescimento da bactéria.

4.3.3 Utilização de Kits bioquímicos

Os grupos de bactérias MRF-ATR e QTZ-ATR apresentaram características semelhantes, sendo que o sistema Biolog® GEN III Micro-Plate™ detectou um percentual de 95% de semelhança comparada ao modelo padrão do sistema para a espécie *Pseudomonas fuscovaginae*.

O Sistema Biolog® GEN III Micro-Plate™ utilizado para a leitura das microplacas ainda não é capaz de identificar todas as espécies de bactérias fitopatogênicas. No presente estudo observou-se que Sistema Biolog® GEN III Micro-Plate™ não foi capaz de identificar algumas das bactérias isoladas das sementes de trigo e, que segundo a literatura e os testes bioquímicos e fisiológicos pertenceriam as espécies de *Xanthomonas translucens* sp. e *Pseudomonas* sp. Sendo assim todos os resultados obtidos com a leitura das microplacas foram comparados aos resultados de bactérias "tipo".

Os resultados obtidos no sistema de identificação Biolog® GEN III Micro-Plate™ foram comparados com as características das bactérias *P. s. pv. Syringae* (MUEDI et al., 2011; YOUNG, 1991), *P. s. pv. Atrofaciens* (MATVEEVA et al., 2003), *P. cichorii* (POELARENDS et al., 1998) e *P. fuscovaginae* (COTHER, 2009), assim como, a patogenicidade dos isolados que é um passo primordial para a identificação a nível de patovar.

Tabela 12 - Atividades metabólicas e ecológicas dos isolados em comparação com as bactérias tipo e as bactérias *P. s. pv. Syringae* (MUEDI et al., 2011; YOUNG, 1991), *P. s. pv. Atrofaciens* (MATVEEVA et al., 2003), *P. cichorii* (POELARENDS et al., 1998) e *P. fuscovaginae* (COTHER, 2009).

Testes		<i>P. s. pv. Syringae</i>	<i>P. s. pv. atrofaciens</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	Pss	ATR	Pf	VD	Xtc	AC	Xtu	AG	Xtt	AF	
Ecologia	Patogenicidade	Trigo	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Arroz	nd	nd	nd	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		Aveia	nd	nd	nd	nd	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
		Cevada	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	HR em 24 horas	Tabaco	nd	+	+	nd	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
		Tomateiro	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Designação																
Biolog® GEN III Micro-Plate™	A1	Controle Neg.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A2	Dextrina	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	A3	D-Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A4	D-trealose	-	-	-	/	-	/	-	+	+	+	+	+	+	
	A5	D-Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	A6	Gentiobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A7	Sacarose	/	-	-	-	/	-	/	+	+	+	+	+	+	
	A8	D-Turanose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	A9	Estaquiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	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	+	/	/	/	+	/	/	+	+	+	+	+	+		

Continuação Tabela 12

	Testes	<i>P.s. pv. Syringae</i>	<i>P.s. pv. atrofaciens</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	Pss	ATR	Pf	VD	Xtc	AC	Xtu	AG	Xtt	AF
C4	D-Galactose	+	+	/	/	+	/	/	+	+	+	+	+	+	+
C5	3-Metil Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/	/	/
C6	D-Fucose	/	-	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-	-	-
C7	L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
C8	L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/	/	/
C9	Inosina	/	-	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-
C10	De sódio a 1% Lactato	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
C11	Ácido fusídico	/	-	/	+	/	+	+	/	-	-	-	-	-	-
C12	D-Serina	/	-	/	-	/	-	-	/	-	-	-	-	-	-
D1	D-Sorbitol	/	/	/	-	/	-	-	/	-	-	-	-	-	-
D2	D-Manitol	/	+	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-
D3	D-Arabitól	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-
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	D-galacturônico Ácido	/	-	-	/	/	/	/	/	+	+	+	+	+	+
F3	L-Galactonic Ácido Lactona	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
F4	Ácido D-glucônico	/	+	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-
F5	Ácido D-glucurônico	/	-	-	+	/	+	+	/	+	+	+	+	+	+

Biolog® GEN III Micro-Plate™

Continuação Tabela 12

	Testes	Biolog® GEN III Micro-Plate™													
		<i>P. s. pv. Syringae</i>	<i>P. s. pv. atrofaciens</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	Pss	ATR	Pf	VD	Xtc	AC	Xtu	AG	Xtt	AF
F6	Glucuronamida	/	-	-	/	/	/	/	/	+	+	+	+	+	+
F7	Ácido múcico	/	+	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-
F8	Ácido quinico	+	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F8	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	Bbutirato de sódio	/	/	/	-	/	-	-	/	-	-	-	-	-	-
H12	Bromato de Sódio	/	/	/	-	/	-	-	/	-	-	-	-	-	-

(Xtc) *X. t. pv. cerealis*. (Xtu) *X. t. pv. undulosa*. (Xtt) *X. t. pv. translucens*. (Pss) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. (Pf) *Pseudomonas fuscovagine*. (nd) Não definido.

Os resultados obtidos pelos 11 grupos de bactérias no Bactray I e II estão esboçados na tabela 13.

Tabela 13 – Reação do grupo de isolados bacterianos e de bactérias "Tipo" à inoculação de 24 horas nas placas Bactray I e II. UPF, Passo Fundo, RS.

	Isolados											Isolados					
	<i>Xanthomonas</i>											<i>Pseudomonas</i>					
	579	580	581	BRS-AG	MRF-AG	QTZ-AG	BRS-AC	MRF-AC	QTZ-AC	BRS-AF	1022	743	MRF-ATR	QTZ-ATR	MRF-VD	QTZ-VD	
Bactray I	ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Bactray II	MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	+	+	+	nd	
	SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	
	MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
	RAF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	

(580) *X. t. pv. cerealis*. (579) *X. t. pv. undulosa*. (581) *X. t. pv. translucens*. (1022) *Pseudomonas syringae pv. syringae*. (743) *Pseudomonas fuscovaginae*. (ONPG) hidrólise da beta-galactosidase; (ADH) Arginina dehidrolase; (LDC) Lisina descarboxilase; (ODC) Ornitina descarboxilase; (H₂S) O sulfeto de hidrogênio é produzido pela hidrólise enzimática do tiosulfato; (URE) A urease hidrolisa enzimaticamente a uréia com produção de amônia e Co; (VP) produção de acetoína; (PD) desaminação da fenilalanina; (IND)-metabolização do triptofano; (CIT) utilização de citrato como única fonte de carbono; (MAL) Meio Malonato; (RHA) Meio Rhamnose; (ADO) Meio Adonitol; (SAL) Meio Salicina; (ARA) Meio Arabinose; (INO) Meio Inositol; (SOR) Meio Sorbitol; (SAC) Meio Sacarose, (MAN) Meio Manitol e (RAF) Meio Rafinose - Consistem na utilização dos carboidratos com a concomitante produção de ácidos.(-) resultado negativo; (+) resultado positivo. (nd) Não definido.

Os grupos BRS-AG, BRS-AC, BRS-AF, MRF-AG, MRF-AC, QTZ-AC e QTZ-AG pertencem à espécie *X. translucens* pelo grau de similaridade encontrado em comparações com as bactérias tipo como *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* 580 - ICMP 1409, *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* 581 - ICMP 5752 e *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* 579 - ICMP 5755.

Bragard & Verhoyen (1993) realizaram testes sorológicos e mostraram em estudos que os patovares de *X. translucens* são sorologicamente homogêneas, apesar de apresentar diferença na gama de hospedeiros.

O patógeno é transmitido através das sementes, de modo que o uso de sementes livres do patógeno podem prevenir infecções e disseminação. Como existem poucos estudos e nem um controle descrito como sendo eficiente para o controle da doença, a melhor maneira de evitar danos pela estria bacteriana da folha é evitar a semeadura de sementes infectadas (IQBAL et al., 2013).

Testes de incidência e quantificação de bactérias fitopatogênicas em sementes podem vir a ser úteis na seleção de cultivares resistentes e também no auxílio melhoramento genético.

4.4 Correlação filogenética

O dendrograma foi formado com o resultado de 59 análises bioquímicas, fisiológicas e ecológicas dos isolados. Assim pode-se

observar a formação de dois grupos pelo método de ligação média entre grupos (UPGMA) (Figura 12). A análise de agrupamento tem como finalidade separar os isolados em grupos com maior similaridade (NAKATANI et al., 2009).

O grupo I foi formado apenas pelos isolados do gênero *Pseudomonas* spp., assim como pelas bactérias "tipo" pertencentes à este gênero apresentando aproximadamente 20% de similaridade. O grupo do II foi composto por isolados do gênero *Xanthomonas* spp. e também pelas bactérias tipo 581, 579 e 580 com aproximadamente 15% de similaridade.

Dentro do grupo das *Pseudomonas*, ocorreu a formação de dois subgrupos, onde no subgrupo I encontram-se o grupo de isolados QTZ-VD, MRF-VD os quais agruparam-se à bactéria "tipo" *P. s. pv. syringae* (1022). Analisando o subgrupo II, observa-se a bactéria "tipo" *P. fuscovaginae* (743) e o grupo dos isolados QTZ-ATR, MRF-ATR.

O grupo do isolado BRS-AF e a bactéria "tipo" *X. t. pv. translucens* 581 mantiveram-se no subgrupo I do grupo II. No subgrupo II, por sua vez, foram alocados às bactérias pertencentes aos grupos MRF-AG, QTZ-AG, BRS-AG junto à bactéria "tipo" 579 (*X. t. pv. undulosa*). Os grupos BRS-AC, MRF-AC foram alocados ao subgrupo filogenético III. O subgrupo IV foi composto pelo isolado QTZ-AC e pela bactéria *X. t. pv. cerealis* (580).

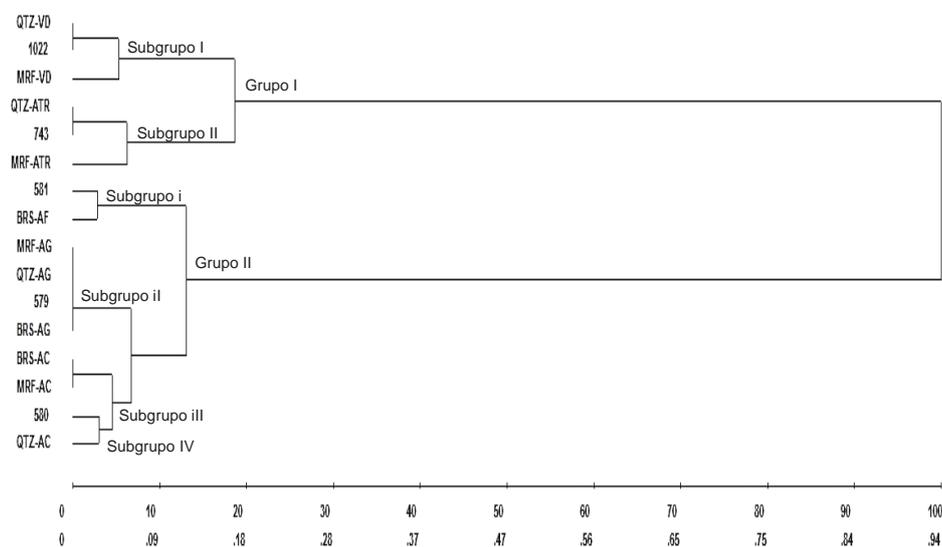


Figura 11 - Dendrograma de dissimilaridades entre 16 isolados de bactérias fitopatogênicas isoladas de sementes de trigo, obtido pelo método UPGMA, com base na matriz de dissimilaridade utilizando características multicategóricas. No eixo x encontram-se as distâncias relativas e no eixo y encontram-se os isolados. Passo Fundo, UPF, RS.

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

4.5 Germinação e vigor das sementes

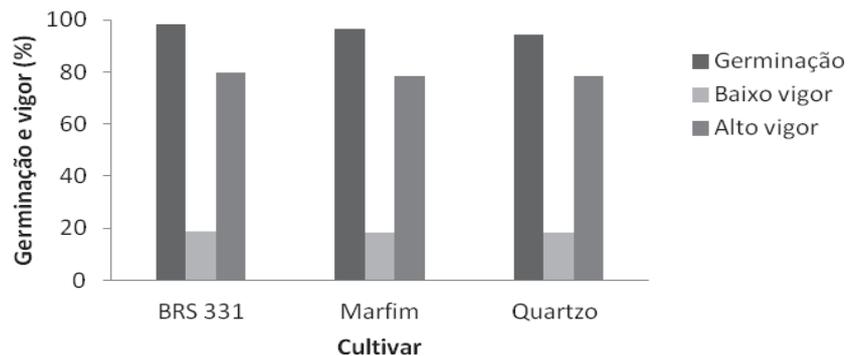


Figura 12 - Gráfico mostrando os valores de germinação e vigor de sementes de trigo. UPF, Passo Fundo, 2012 - 2013.

Os testes germinação de sementes correspondem à proporção do número de sementes que produziu plântulas classificadas como normais, dentre um lote de sementes. O potencial máximo de germinação de um lote de sementes, uma vez determinado pode ser usado para comparar a qualidade de diferentes lotes e também estimar o valor para semeadura em campo (BRASIL, 2009). Verifica-se nessa análise que a germinação dessas amostras não foram afetadas pela presença de bactérias.

5 CONCLUSÕES

Para a utilização de rotina de patologia de sementes, pode-se afirmar que o tamanho da amostra a ser analisada e período de incubação interferem no número de UFC/semente, assim como, utilizando sementes trituradas obtêm-se o maior número de UFC/semente. Meios semi-seletivos são mais eficientes para detectar bactérias fitopatogênicas em sementes de trigo, assim como, para calcular incidência destas.

Pode-se concluir que as bactérias isoladas das sementes de trigo pertencem às espécies *X. translucens*, *P. fuscovagine* e *Pseudomonas*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J. Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, Kanagawa, v. 50, n. 4, p. 1563–1589, 2000.

AZAAD, H.; SCHAAD, N. W. The relationship of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* to frost and the effect of frost on black chaff development in wheat. *Phytopathology*, St. Paul, v. 78, n. 3, p. 95-100, 1988.

BACALTCHUK, B.; SILVA, H. R. C. *Nasce uma nova era: o trigo recupera sua nobreza*. 1 ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 172 p.

BOOSALIS, M. G. The epidemiology of *Xanthomonas translucens* on cereals and grasses. *Phytopathology*, Illinois, v. 42, n. 3, p. 387-395, 1952.

BOTÍN, V. J. A.; LOPEZ, C. E. M. A review of the studies and interactions of *Pseudomonas syringae* pathovars on wheat. *International Journal of Agronomy*, Guadalajara, v. 5, n.3, p. 1 -5, 2012.

BOTÍN, V. J. A.; ONOFRE, M. L. E.; ROJAS, S. H. V. Indicadores de agresividad y métodos de inoculación con bacterias fitopatógenas en plántulas y semillas de trigo SeriM82. *Revista Fitotecnia Mexicana*, Montecillo, v. 30, n. 3, p. 255–259, 2007.

BOTÍN, V. J. A.; ONOFRE, M. L. E.; ROJAS, S. H. V.; MOCTEZUMA, L. V. E.; TELLEZ, C. L.; MIR, V. E. H. Effect of *Pseudomonas syringae* subsp. *Syringae* on yield and biomass distribution in wheat. *Spanish Journal of Agricultural Research*, Montecillo, v. 9, n. 4, p. 1287 – 1297, 2011.

BRADBURY, J. F. *Guide to planta pathogenic bactéria*. 1 ed. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureaux - Internacional Mycological Institute. 1986, 329p.

BRAGARD, C.; SINGER, E.; ALIZADEH, A.; VAUTERIN, L.; MARAITE, H.; SWINGS, J. *Xanthomonas translucens* from small grains: Diversity and phytopathological relevance. *Phytopathology*, St. Louis, v. 87, n. 3, p. 1111-1117, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de Análise Sanitária de Sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009b. 200 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regras para análise de sementes*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009a. 395p.

BRUM, A.; HECK, C. A economia do trigo no Rio Grande do Sul: Breve histórico do cereal na economia do estado. *Análise*, Porto Alegre, v. 16, n. 1, p. 29 - 44, 2005.

CHITARRA, L. G.; LANGERAK, C. J.; BERGERVOET, H.W.; VAN DEN BULK, R. W. Detection of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in seed extracts of *Brassica* sp. applying fluorescent antibodies and flow cytometry. *Cytometry*, Wageningen, v. 47, n. 2, p. 118–126, 2002.

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.

CUNFER, B. M. Bacterial and fungal blights of foliage and heads of wheat. In: HEYNES, E. G. *Wheat and Wheat Improvement*. 2 ed. Madison: ASA WI, 1987. p. 528-541.

CUNFER, B. M.; SCOLARI, B. L. *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* on triticale and other small grains. *Phytopathology*, Illinois, v. 72, n. 3, p. 683-686, 1982.

CRUZ, C. D. Programa Genes - Análise multivariada e simulação. 1 Ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. 175 p.

DENARDIN, N. D.; MOURA, A. B.; MENTEN, J. O. M. Detecção e identificação de bactérias em sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 8, 2004, João Pessoa, Anais... João Pessoa: Abrates, 2004. p. 62-67.

DYE, D. W. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.*, St. Paul, v. 59, n. 3, p.153-168, 1980.

DOWSON, W. J. On the systematic position and generic names of the gram-negative bacterial plant pathogens. *Zentralb. Bakteriol Parasitenkt.*, v. 100, n.2, p.177-193, 1939.

DUVEILLER, E.; BRAGARD, C.; MARAITE, H. Bacterial leaf streak and Black chaff caused by *Xanthomonas translucens*. In: DUVEILLER, E.; FUCIKOVSKY, L.; RUDOLPH, K. *The bacterial diseases of wheat: Concepts and methods of disease management*. Mexico: CIMMYT, 1997. p.25-47.

DUVEILLER, E. Bacterial sheath rot of wheat caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in the highlands of Mexico. *Plant Disease*, Lisboa, v. 74, n.11, p.932-935, 1990.

_____. Research on *Xanthomonas translucens* of wheat and triticale at CIMMYT. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, Paderborn, v. 19, n. 1, p. 97-103, 1989.

DUVEILLER, E.; FUCIKOVSKY, L.; RUDOLPH, K. 1 ed. *The bacterial diseases of wheat: Concepts and methods of disease management*. Mexico: CIMMYT, 1997. 78 p.

DUVEILLER, E.; MARAITE, H. Study on yield loss due to *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in wheat under high rainfall temperate conditions. *Journal of Plant Disease and Protection*, Louvain, v. 100, n. 5, p. 453-459, 1993.

EDWARDS, A. R.; VAN DEN BUSSCHET, WICHMAN, H. A.; ORSER, C. S. Unusual Pattern of Bacterial Ice Nucleation Gene Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, v. 11, n. 9, p. 911-920, 1994.

EMBRAPA. *Bacteriose nos campos de trigo no Rio Grande do Sul*. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2010.

FERNANDEZ, J. M. C. Doenças de trigo causadas por *Pseudomonas syringae* patovars. Passo Fundo: EMBRAPA Trigo, 2008. (Comunicado Técnico, 234).

FERNANDEZ, M. R. *Manual para laboratório de fitopatologia*. 1 ed. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 1993. 128 p.

FORSTER, R. L.; SCHAAD, N.W. Tolerance levels of seed borne *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*, the causal agent of black chaff of wheat. In: CIVERELO, E. L.; COLLMER, A.; DAVIS, R. E.; GILLASPIE, A. G. *Plant Pathogenic Bacteria*. 6 ed. Maryland: *Martinus Nijhoff Publishers*, 1987. p. 974-975.

FUKUDA, T.; AZEGAMI, K.; TABEL, H. Histological studies on bacterial black node of barley and wheat caused by *Pseudomonas*

syringae pv. *japonica*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, v. 56, n. 2, p. 252–256, 1990.

GENT, D. H.; LANG, J. M.; BARTOLO, M. E. et al. Epiphytic Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on Leguminous Hosts and Onion. *Plant Disease*, Colorado, v. 89, n. 6, p. 558-564, 2005.

GURIAN-SHERMAN, D.; LINDOW, S. E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis. *The FASEB Journal*, Bethesda, v. 7, n. 2, p. 1338-1343, 1993.

HERNANDEZ, P. D. *Enfermedades de maiz (Zea mays L.), trigo (Triticum aestivum L.) y cebada (Hordeum vulgare L.) presentes en Mexico*. 1998. 134 f. Tesis de Licenciatura, Universidad Autonoma Chapingo, Chapingo, 1998.

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

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed. 1994. 787p.

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

IQBAL, M. A.; ULLAH, I.; SHAHBAZ, M. U.; KAMRAN, M.; SALEEM, K. Biochemical and molecular identification of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* causing bacterial leaf streak of wheat in Punjab, Pakistan. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, London, v. 12, n. 3, p. 37-41, 2013.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, Califórnia, v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.

KAWAHARA, H. The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Osaka, v. 94, n.8, p. 492-496, 2002.

KHEZRI, S.; RAHIMIAN, H.; AHANGARAN, A.; MOHAMMADI, M. Comparisons of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from various hosts with different methods. *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 12, n. 3, p.106-110, 2010.

KIM, H. K.; ORSER, C.; LINDOW, S. E.; SANDS, D. C. *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* strains active in ice reaction. *Plant Disease*, St. Paul, v. 71, n. 11, p. 994-997, 1987.

KIMURA, O. Controle de fitobactérias em hortaliças através do tratamento térmico de sementes. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 6, n. 3, p.8, 1991.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal Laboratory Clinical Medical*, London, v. 44, n. 3, p. 301-307, 1954.

KINKEL, L. L.; LINDOW, S. E. Invasion and exclusion among coexisting *Pseudomonas syringae* strains on leaves. *Appl. Environ. Microbiol.*, Amsterdam, v. 59, n. 4, p. 3447-3454, 1993.

KOBAYASTI, L.; PIRES, A. P. Levantamento de fungos em sementes de trigo. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 41, n. 4, p. 572-578, 2011.

KRUPPA, P. C. *Detecção de Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes e no interior de frutos de tomateiroiro pelo uso de meios

de culturas semi-seletivos. 1993. 120 p. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1993.

LANNA FILHO, R.; ROMEIRO, R. S. Sensibilidade de *Xanthomonas vesicatoria* a antibióticos para desenvolvimento de um meio semi-seletivo. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, Viçosa, v. 3, n. 1, p. 28, 2009.

LEACH, J. G.; LILLY, V. G.; WILSON, H. A.; PURVIS Jr., M. R. Bacterial polysaccharides: the nature and function of the exudate produced by *Xanthomonas phaseoli*. *Phytopatology*, Minnesota, v. 47, n. 3, p. 113-120, 1957.

LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. Methods for the Diagnosis of Bacterial. *Plant Disease*, St. Paul, v. 13, n. 2, p. 21- 26, 1987.

LINDOW, S. E.; ARNY, D. C.; UPPER, C. D. Bacterial Ice Nucleation: A Factor in Frost Injury to Plants. *Plant Physiology*, Washington, v. 70, n. 10, p. 1084-1089, 1982.

LINDOW, S. E. Competitive Exclusion of Epiphytic Bacteria by Ice-Pseudomonas syringae Mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 53, n. 8, p. 2520-2527, 1987.

MALAVOLTA, V. A. Jr.; OLIVEIRA, M. A. R. Identificação e sobrevivência de *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* em sementes e em restos culturais de trigo. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 26, n. 2, p. 20-23, 2000.

MANCERA, Z. H. A.; BOTÍM, V. A. J.; ONOFRE, M. L. E.; ROJAS, S.; MOCTEZUMA, V. E. Use of green fluorescent protein to monitor the colonization of *Pseudomonas syringae* subsp. *syringae* on wheat seeds. *Microscopy and Microanalysis Journal*, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 298–299, 2007.

MARAITE, H.; BRAGARD, C.; DUVEILLER, E. The status of resistance to bacterial disease of wheat. In: BUCK, H. T.; NISI, J. E.; SALOMÓN, N. *Wheat production in stressed environments*. 1 ed. Dordrecht: Springer, 2007. p. 37-49.

MARCUZZO, L. L. Aspectos epidemiológicos de sobrevivência e de ambiente do gênero *Xanthomonas*. *Ágora: R. Divulgação Científica*, Mafra, v. 16, n. 1, p. 13 - 19, 2009.

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., PARENTE, P. M. G., MACHADO, F. O. C. & SANTANA, C. R. Avaliação de métodos de inoculação na produção de sementes de feijão contaminadas por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* para fins experimentais. *Fitopatologia Brasileira*, Viçosa, v. 19, n. 4, p. 178-182, 1994.

MATVEEVA, I. E. V.; PEKHTEREVA, E. Sh.; POLITYKO, V. A.; IGNATOV, V. A.; NIKOLAEVA, E. V.; SCHAAD, N. W. Distribution and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, causal agent of basal glume rot, in Russia. In: IACOBELLIS, N. S.; COLLMER, A.; HUTCHESON, S. W.; MANSFIELD, J. W.; MORRIS, C. E.; MURILLO, J.; SCHAAD, N. W.; STEAD, D. E.; SURICO, G.; ULLRICH, M. S. *Pseudomonas syringae and related pathogens, biology and genetic*. Kluwer academic publishers: Netherlands. 2003, p. 97-105.

MELLANO, V.; COOKSEY, D. A. Development of host range mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Illinois, v. 54, n. 5, p. 884-889, 1988.

MENTEN, J. O. M. *Patógenos em sementes, detecção, danos e controle químico*. São Paulo: Ciba Agro, 1995. 123 p.

MITCHELL, R. E. The relevance of non-host toxins in the expression of virulence by pathogens. In: Contribution of mangotoxin to the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Annual Review of Phytopathology*, v. 22, n. 4, p. 215-245, 1991.

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, n. 2, p. 447- 453, 1985.

MOURA, A. B.; CHITARRA, L. G.; SOUZA, R. M. Métodos de detecção de bactérias em sementes. In: LUZ, V. C. *Revisão anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v.13, p. 297 – 319, 2005.

MOURA, A. B.; ROMEIRO, S. R. Detecção e quantificação de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em lotes de sementes de pepino. *Revista Brasileira de Sementes*, Lavras, v. 15, n. 2, p. 183-186, 1993.

MUEDI H.T.H.; FOURIE D.; MCLAREN N.W. Characterisation of bacterial brown spot pathogen from dry bean production areas of South Africa. *African Crop Science Journal*, v. 19, n. 4, pp. 357-367, 2011.

MUNKVOLD, G. P. Seed Pathology Progress in Academia and Industry. *Annual Review Phytopathology*, Iowa, v. 47, n. 3, p. 285 – 311, 2009.

NAKATANI, A. K.; LOPES, R.; CAMARGO, L. E. A. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. *Summa phytopathol.* Botucatu, v. 35, n. 2, p. 116-120, 2009.

NEERGAARD, P. *Seed pathology*. 1 ed. London: McMillan, 1977. 839 p.

OSÓRIO, E. A. *O trigo no Brasil*. São Paulo: Fundação Cargil, 1982, 287p.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. Efeito do tratamento de sementes com fungicida sobre o controle de doenças na parte aérea do trigo. *Fitopatologia Brasileira*, Botucatu, v. 28, n. 5, p. 515-520, 2003.

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

POELARENDS, G. J.; WILKENS, M.; LARKIN, M. J.; VAN ELSAS, J. D.; JANSSEN, D. B. Degradation of 1,3-Dichloropropene by *Pseudomonas cichorii* 170. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 64, n. 5, p. 2931–2936, 1998.

RYU, E. A. On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *Journal of the Japanese Society for Veterinary Science*, Tokyo, v. 7, n. 2, p. 111-120, 1938.

ROMEIRO, R. S. *Bactérias fitopatogênicas*. Viçosa: UFV. 2005. 417p.

_____. *Métodos em bacteriologia de plantas*. Editora UFV, 2001. 369 p.

ROTT, P.; NOTTEGHEN, J. L.; FROSSARD, P. Identification and characterization of *Pseudomonas fuscovagine*, the causal agent of bacterial sheath brown rot Rice, from Madagascar and other countries. *Plant Disease*, Montpellier, v. 73, n. 2, p. 133-137, 1989.

SAHIN, F.; MILLER, S. A. Characterization of Ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, St. Paul, v. 80, n. 7, p. 773-778, 1996.

SCHAAD, N.W.; AZAD, H.; PEET, R.C.; PANOPOULOS, N.J. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by a DNA hybridization probe. *Phytopathology*, St Paul. v. 79, n. 2, p. 903-907, 1989.

SCHAAD, N. W. CHEONG, S. S., TAMAKI, S., HATZILOUKAS, E., & PANOPOULOS, N.J. A combined biological amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology*, Illinois, v. 85, n. 2, p. 243–248. 1995.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3 Ed. St. Paul, Minnesota: APS Press. 376 p. 1980.

SCHAAD, N. W.; FOSTER, R. L. A semiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from wheat seeds. *Phytopathology*, St. Paul, v. 61, n. 3, p. 260–263, 1995.

_____. Semi-selective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* in infected crucifer seed. *Seed Science and Technology*, St. Louis, v. 8, n. 11, p. 383-391, 1982.

SCHAAD, N. W.; WHITE, W. C. A selective medium for soil isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 64, n. 2, p. 876-880, 1974.

SCHEFFER-BASSO, S. M.; ORSATO, J.; MORO, G. V. S.; ALBUQUERQUE, A. C. S. Divergência genética em germoplasma de aveias silvestres com base em caracteres multicategóricos e quantitativos. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 59, n. 5, p. 654-667, 2012.

SMITH, E. F.; JONES, L. R.; REDDY, C. S. The black chaff of wheat. *Science*, St. Louis, v. 50, n. 3, p. 48-52, 1919.

STROMBERG, K. D.; KINKEL, L. L.; LEONARD, K. J. Relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. *Phytopathology*, Minnesota, v. 89, n. 2, p. 131-135, 1999.

TANII, A.; MIYAJIMA, K.; AKITA, T. The sheath brown rot disease of rice and its causal bacterium *Pseudomonas fuscovaginae* sp. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, Tóquio, v. 42, n. 2, p. 540-548, 1976.

TIMMER, L. W.; MAROIS, J. J.; ACHOR, D. Growth and survival of xanthomonads under conditions non-conducive to disease development. *Phytopathology*, St. Paul, v. 77, n. 2, p. 1341-1345, 1987.

TOBEN, H.; MAVRIDIS, A.; RUDOLPH, K. W. E. On the occurrence of basal glume root wheat and barley caused by *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* in West Germany. *Journal of Plant Disease and Protection*, Colonia, v. 98, n. 3, p. 225-235, 1991.

USDA. *World Agricultural Supply and Demand Estimates (WASDE)*. Washington, 2011. 40p. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/grain/circular/201112-11/grainfull1211.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2012

VALERIO, I. P.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; BENIN, G.; MAIA, L. C.; SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. M.; SILVEIRA, G. Fatores relacionados à produção e desenvolvimento de afilhos em trigo. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 30, n. 4, p. 1207-1218, 2009.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSYERS, K.; SWING, J. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol*, v. 45, p. 472-489, 1995.

VAUTERIN, L.; YANG, P.; HOSTE, B.; POT, B.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Taxonomy of xanthomonads from cereals and grasses

based on SDS-PAGE of proteins, fatty acid analysis and DNA hybridization. *J. Gen. Microbiol*, Belgium, v. 138, n. 9, p. 1467-1477, 1992.

VON KIETZEL, J.; BAHARUDDIN, B.; TOBEN, H.; RUDOLPH, K. *Plant pathogenic bacteria*. 8 ed. Versailles, France: INRA Editions, 1994. p. 281-286.

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

WAKSMAN, S. A. Strain specificity and production of antibiotic substances. X-Characterization and classification of species within the *Streptomyces griseus* group. *Proceedings National Academy of Science*, v. 45, n. 3, p. 1043-1047, 1959.

WIESE, M. V. *Compendium of wheat diseases*. 2 ed. St. Paul: APS Press, 1998. 106 p.

YOUNG, J. M. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Annals of Applied Biology*, v. 118, n. 2, p. 283-298, 1991.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Auckland, v. 21, n. 1, p. 153-177, 1978.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudomonas spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 32p. (Documentos, 127).

ZAMBOLIM, L., VALE, F. X. R.; COSTA, H. *Controle integrado de doenças de hortaliças*. 1 ed. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda. 1997. 134 p.

ZEIGLER, R. S.; ALVAREZ, E. Bacterial sheath Brown Rot caused by *Pseudomonas fuscovagine* in Latin America. *Plant disease*, Cali, v. 71, n.7, p. 592-597, 1987.

