

MANUAL DE ANÁLISE SANITÁRIA DE

SEMENTES



Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Brasília
2009

MANUAL DE ANÁLISE SANITÁRIA DE

SEMENTES

Anexo do Capítulo 9
(Teste de Sanidade de Sementes)
das Regras para Análise
de Sementes.



**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA**

Manual de Análise Sanitária de Sementes

**Missão
Mapa**

*Promover o desenvolvimento sustentável e
a competitividade do agronegócio
em benefício da sociedade brasileira.*

© 2009 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Todos os direitos reservados. Permitida a reprodução desde que citada a fonte.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é do autor.

Título: Manual de Análise Sanitária de Sementes, Anexo do Capítulo 9 (Teste de Sanidade de Sementes) das Regras Para Análise de Sementes

1ª edição. Ano 2009

Tiragem: 500 exemplares

Anexo do Capítulo 9 (Teste de Sanidade de Sementes) das Regras para Análise de Sementes

Elaboração, distribuição, informações:

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA

Coordenação Geral de Apoio Laboratorial - CGAL

Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo B, 4º andar, sala 430

CEP: 70043-900, Brasília - DF

Tel.: (61) 3225-5098

Fax.: (61) 3218-2697

www.agricultura.gov.br

e-mail: cgal@agricultura.gov.br

Central de Relacionamento: 0800 704 1995

Coordenação Editorial: Assessoria de Comunicação Social

Impresso no Brasil / Printed in Brazil

Catálogo na Fonte
Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI

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, 2009.
200 p.

ISBN 978-85-99851-64-7

1. Semente. 2. Inspeção Sanitária. 3. Defesa Vegetal.
4. Análise de Risco. I. Secretaria Defesa Agropecuária. II. Título.

AGRIS F03
CDU 631.53.03

AGRADECIMENTOS



Ao Professor Dr. José da Cruz Machado, pela Coordenação Geral deste Manual e pelas relevantes informações técnicas cedidas ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

À todos os colaboradores, incluindo estudantes de graduação e pós-graduação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

COORDENADORES E COLABORADORES

COORDENADORES TÉCNICOS

Nome	Instituição / Sigla	E-mail
José da Cruz Machado - Coordenador Geral e Coordenador do capítulo sobre Fungos	Universidade Federal de Lavras - UFLA	machado@ufla.br
José Mauricio Pereira - Revisor	Laboratório Oficial de Análise de Sementes/ Laboratório Nacional Agropecuário – LASO/ LANAGRO/MG	jose.m.pereira@agricultura.gov.br
Luiz Artur Costa do Valle	Laboratório Oficial de Análise de Sementes/ Laboratório Nacional Agropecuário – LASO/ LANAGRO/MG	luiz.valle@agricultura.gov.br
Myriam A. G. Leal Alvisi -Coordenadora do Grupo II – Portaria nº 62 de 10/03/2006	Laboratório Oficial de Análise de Sementes/ Laboratório Nacional Agropecuário – LASO/ LANAGRO/MG	myriam.alvisi@agricultura.gov.br

COLABORADORES

Nome	Instituição / Sigla	E-mail
Ademir Assis Henning	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Centro Nacional de Pesquisa de Soja – Embrapa/SOJA	henning@cnpso.embrapa.br
Andréa Bittencourt Moura	Universidade Federal de Pelotas - UFPEL	abmoura@ufpel.tche.br
Antônia dos Reis Figueira -Coordenadora do Capítulo sobre Vírus	Universidade Federal de Lavras - UFLA	antonia@ufla.br
Carlos Mitinori Utiamada	Tecnologia Agropecuária Ltda. TAGRO	carlos.utiamada@tagro.com.br
Débora Cristina Santiago Coordenadora do capítulo sobre Nematóides	Universidade Estadual de Londrina - UEL	santiago@uel.br
Ênia Mara de Carvalho	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ	eniacarvalho@yahoo.com.br
Luiz Carlos Bhering Nasser	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa/Mapa	luiz.nasser@agricultura.gov.br
Maria Heloisa Duarte de Moraes	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ / USP	mhdmorae@esalq.usp.br
Nicésio F. de Almeida Pinto	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/ Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo – Embrapa/CNPMS	nicesio@cnpms.embrapa.br
Ricardo Magela de Souza Coordenador do capítulo sobre Bactéria	Universidade Federal de Lavras - UFLA	rmagelas@ufla.br

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 GRUPOS DE PATÓGENOS EM RELAÇÃO AO TESTE DE SANIDADE	11
3 FORMAS DE ASSOCIAÇÃO DE PATÓGENOS COM SEMENTES.....	19
4 MANUSEIO DE AMOSTRAS DE SEMENTES E TÉCNICAS AUXILIARES EM LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE SEMENTES	23
4.1 Manuseio das amostras na recepção.....	24
4.2 Destino de embalagens e outros materiais descartáveis.....	24
4.3 Cuidados com as amostras após a recepção.....	24
4.4 Manuseio de sementes tratadas com biocidas.....	25
4.5 Técnicas auxiliares	25
4.5.1 Limpeza e esterilização de material.....	25
4.5.2 Preparo de material para exame microscópico.....	26
5 TESTES DE SANIDADE	27
5.1 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE FUNGOS	28
5.1.1 Inspeção visual da amostra de sementes	28
5.1.2 Exame da suspensão de lavagem das sementes.....	31
5.1.3 Incubação em Substrato de Papel ou método do Papel de Filtro (“blotter test”).....	33
5.1.4 Plaqueamento em meio ágar sólido (BDA ou MEA)	34
5.1.5 Métodos específicos	35
5.1.5.1 Incubação em Rolo de Papel	36
5.1.5.2 Incubação em Meio Agar-Bromofenol NEON	38
5.1.5.3 Fluorescência sob luz negra	40
5.1.5.4 Incubação em Meio Agar Salino	41
5.1.5.5 Exame de embrião para detecção de <i>Ustilago</i> sp em sementes de cereais	43
5.1.5.6 Exame de marcadores moleculares	44
CARACTERÍSTICAS DOS FUNGOS EXIBIDAS EM SEMENTES PELO MÉTODO DE ‘INCUBAÇÃO EM SUBSTRATO DE PAPEL’	45
5.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE BACTÉRIAS	102
5.2.1 Plantio de Sementes em Substrato Esterilizado.....	102
5.2.2 Inoculação em plantas susceptíveis.....	102
5.2.3 Plaqueamento em meio seletivo e semi-seletivo	103
5.2.4 Registro de resultados	103
5.2.5 Métodos específicos para cada espécie.....	104
5.2.5.1 Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em <i>Brassica</i> spp. (ISTA).....	104
5.2.5.2 Detecção de <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i> em <i>Daucus carota</i> (ISTA)	106
5.2.5.3 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> em algodão (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	109
5.2.5.4 Detecção de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> em tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) – Workshop 1999.....	112
5.2.5.5 Detecção de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> em tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) ...	114

SUMÁRIO

5.2.5.6 Detecção de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> em tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) - ISHI-Veg	117
5.2.5.7 Detecção de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> em sementes de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	119
5.2.5.8 Detecção de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) – Workshop 1999; Kobayasti, 2002.	122
5.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE VÍRUS	144
5.3.1. Testes biológicos	144
5.3.2. Teste sorológico DAS-ELISA (Figuras 87-91)	144
5.3.2.1. Extração do vírus	145
5.3.2.2. Cobertura inicial das placas.....	145
5.3.2.3. Adição da amostra.....	145
5.3.2.4. Adição do Conjugado.....	145
5.3.2.5. Adição do substrato e leitura dos resultados	145
5.3.3. Diagnose de vírus através de PCR	145
5.3.3.1. Extração do RNA total das sementes ou plântulas	146
5.3.3.2. Transcrição reversa e PCR.....	146
5.3.4 MÉTODOS ESPECÍFICOS POR ESPÉCIE.....	152
5.3.4.1 <i>Capsicum</i> spp.	152
5.3.4.2 <i>Cucumis melo/ Cucurbita</i> sp	161
5.3.4.3 <i>Lactuca sativa</i>	166
5.3.4.4 <i>Lycopersicon esculentum</i>	170
5.3.4.5 <i>Phaseolus vulgaris</i>	173
5.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE NEMATÓIDES	177
5.4.1 Detecção de <i>Heterodera glycines</i> em amostras de sementes de soja	178
5.4.2 Detecção de <i>Aphelenchoides besseyi</i> e <i>Ditylenchus dipsaci</i> em amostras de sementes de <i>Brachiaria</i>	180
5.4.3 Detecção de <i>Aphelenchoides besseyi</i> e <i>Ditylenchus dipsaci</i> em amostras de sementes de <i>Panicum</i>	181
5.4.4. Detecção de <i>Aphelenchoides besseyi</i> em sementes de arroz	182
5.4.5 Detecção de <i>Ditylenchus dipsaci</i> em sementes de cebola	183
5.4.6 TÉCNICAS MOLECULARES X NEMATÓIDES.....	184
5.4.7 TÉCNICA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS NEMATÓIDES.....	184
BIBLIOGRAFIA	187
ÍNDICE REMISSIVO	193

1

INTRODUÇÃO



O objetivo central deste manual é suprir o analista de laboratório com informações sobre os métodos mais comuns de detecção de fitopatógenos em sementes com protocolos simplificados e ilustrações fotográficas que visam facilitar as análises de rotina. Trata-se de uma publicação que complementa, na forma de anexo, o Capítulo 9, “Sanidade de Sementes”, das Regras para Análise de Sementes. A preocupação foi, portanto, disponibilizar ao sistema de controle de qualidade de sementes no país, um guia de consulta referencial, por ocasião das análises de rotina, procurando-se desta forma, cumprir os princípios de homogeneização e harmonização de informações neste tipo de atividade.

Por meio deste manual, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), faz com que as regras e normas brasileiras para análises sanitárias de sementes sejam enquadradas o mais próximo possível nas regras internacionais prescritas pela ISTA (International Seed Testing Association), sendo adicionados alguns patossistemas de interesse no Brasil e que não são contemplados nas regras da referida Associação. A decisão de incluir métodos ainda não submetidos a testes comparativos de validação, conforme é a atual postura do Comitê de Sanidade de Sementes da ISTA em seu Manual de Sanidade, teve como base o fato de que a demanda pelo teste de sanidade de sementes para alguns patossistemas tem crescido rapidamente no Brasil e a eficácia desses métodos já têm sido comprovada de alguma forma.

O trabalho foi desenvolvido por um grupo de profissionais envolvidos com sanidade de sementes no Brasil, representando entidades públicas e privadas, pertencentes na sua maioria ao Comitê de Patologia de Sementes da ABRATES e sob a responsabilidade da CGAL/ Mapa.

As ilustrações e descrições de métodos foram fornecidos por profissionais que trabalham já por algum tempo no campo de controle de qualidade sanitária de sementes no país, e estes materiais permanecem sob o controle legal de propriedade de seus respectivos autores, o que faz com que a sua utilização para quaisquer outras finalidades, seja permitido somente mediante autorização expressa dos mesmos. Toda ilustração fotográfica contém uma indicação de autoria correspondente.

Embora esforços tenham sido feitos para tornar esta publicação a mais ampla possível, alguns patossistemas de importância para o Brasil, não foram incluídos nesta edição pela inexistência de informações e indisponibilidade de ilustrações adequadas dos mesmos. Na medida em que estas informações e material ilustrativo sejam disponibilizados, eles serão incorporados nas próximas Edições deste Manual.

Nesta primeira edição, foram considerados, portanto, somente os patossistemas que são de maior interesse e importância atual no Brasil.

2

GRUPOS DE PATÓGENOS EM
RELAÇÃO AO TESTE
DE SANIDADE



As sementes de modo geral podem abrigar e transportar microrganismos ou agentes patogênicos de todos os grupos taxonômicos, causadores e não causadores de doenças. Do ponto de vista ecológico, esses agentes podem ser agrupados em organismos de campo, onde predominam espécies fitopatogênicas, e organismos de armazenamento, com pequeno número de espécies que deterioram as sementes nesta fase.

Os fungos englobam o maior número de espécies associadas às sementes, seguidos pelas bactérias, com um número expressivo de representantes e os vírus e nematóides, em menor número. Dentre os fungos fitopatogênicos, a maioria pode ser transmitida pelas sementes de seus hospedeiros.

2.1 Grupos de fungos associados às sementes

O agrupamento dos fungos, para efeito de entendimento e seleção de métodos de detecção em sementes pode ser realizado de forma simplificada tomando-se como base a natureza de parasitismo destes organismos, biotróficos e necrotróficos. A classificação taxonômica clássica e moderna torna-se também de grande valor, posto que os métodos de detecção dos fungos mantêm uma certa correlação com os grupos distinguidos pelas características que os marcam nestas classificações. Os agrupamentos com base em características morfológicas, como tipo de frutificação, tamanho, forma e cor de esporos e outras propriedades são importantes para a identificação desses organismos por ocasião de uma análise sanitária. A Divisão informal dos fungos nos dois grandes grupos, tendo-se como referencial a natureza do parasitismo (Tabela 1), é importante, pelo fato de que os fungos biotróficos não completam seu ciclo biológico em condições artificiais, e isto faz com que estruturas típicas que os caracterizam não sejam formadas em testes de sanidade que empregam métodos artificiais que induzem a formação destas estruturas. Por sua vez, as espécies necrotróficas, que englobam a maioria das espécies associadas às sementes, podem ser mais facilmente reconhecidas nessas condições, posto que podem completar seu ciclo biológico parcial ou completo, formando estruturas típicas que podem ser reconhecidas com auxílio de microscópios. Para algumas espécies necrotróficas, de crescimento lento ou em casos de espécies que dificilmente produzem frutificações na maior parte de seu ciclo biológico, é necessário que métodos específicos ou especiais sejam desenvolvidos.

A classificação dos fungos com base em: (1) caráter de evolução, (2) características morfológicas e, (3) processos de divisão celular, mitospórico e meióspórico tornam-se também, de certa forma, de grande valor para o analista dando-lhe segurança no exame das sementes. O conhecimento das estruturas dos fungos em seu ciclo biológico é, portanto, um requisito indispensável por parte dos analistas. Conceituação e descrições detalhadas de estruturas fúngicas como, acérvulos, picnídios, esporodóquios, sinêmios, clamidósporos, escleródios ou esclerócios, peritécios, além dos diferentes tipos de esporos/conídios, podem ser encontrados em livros textos especializados, devendo ser consultados constantemente pelos analistas e demais profissionais ligados a análise sanitária de sementes, em casos de dúvidas.

Marcadores fisiológicos, bioquímicos e moleculares, constituem modernamente a base do desenvolvimento de alguns métodos de detecção de fungos, facilitando e conferindo segurança aos testes de sanidade para inúmeras espécies.

Tabela 1 – Classificação genérica dos fungos mais comumente associados às sementes de espécies hospedeiras de importância agrícola

FUNGOS BIOTRÓFICOS		FUNGOS NECROTÓFICOS			
Inferiores	Superiores	Inferiores	Superiores		
Oomycota	Basidiomycotina		Ascomycotina*/mitospóricos		Basidiomycotina
<i>Peronospora</i>	<i>Ustilago</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Cochliobolus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>
					<i>Ascochyta</i>
<i>Plasmopara</i>	<i>Tilletia</i>		<i>Dydimella</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Gerlachia</i>
					<i>Botryodiplodia</i>
<i>Sclerospora</i>			<i>Giberella</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Colletotrichum</i>
					<i>Macrophomina</i>
			<i>Glomerella</i>	<i>Verticillium</i>	<i>Sclerotinia</i>
					<i>Phoma</i>
			<i>Nectria</i>		<i>Phomopsis</i>
					<i>Pyricularia</i>
			<i>Mycosphaerella</i>		<i>Stromocarpella</i>
					<i>Cercospora</i>
			<i>Sclerotinia</i>		<i>Stagonospora</i>
					<i>Alternaria</i>
					<i>Drechslera</i>
					<i>Thanatephorus</i>
					<i>(Rhizoctonia)</i>

2.2 Grupos de bactérias associados às sementes

A maioria das bactérias fitopatogênicas é do tipo bastonete e não forma esporos ou quaisquer outras estruturas de resistência ou de repouso. O tamanho da célula bacteriana é variável, apresentando em média 1,0–5,0 x 0,5–1,0mm. A reprodução das bactérias fitopatogênicas ocorre por fissão binária ou divisão simples a uma taxa espantosamente rápida. Sob condições favoráveis, o período de geração, isto é, o tempo que uma bactéria leva para originar duas células filhas, varia de 20 a 50 minutos. Após a divisão as células são independentes, não formam tecidos e apresentam forte afinidade por água. Quando uma única célula bacteriana é depositada sobre a superfície de um meio de cultura sólido ela pode se multiplicar, dando origem a uma massa de células visíveis chamada de colônia. Colônias de diferentes espécies podem variar no diâmetro, desde frações de milímetro (*Xylella*) até alguns centímetros (*Erwinia*) e na forma, circulares, ovais ou irregulares. Suas bordas podem ser lisas, onduladas ou irregulares. Colônias de muitas espécies são esbranquiçadas ou cinzas (ex: *Pseudomonas*), enquanto outras são amarelas (*Xanthomonas* e *Clavibacter*). Algumas produzem pigmentos fluorescentes sob luz ultravioleta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), ou marrom (isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) difusíveis no meio agar. Essas características permitem o desenvolvimento de métodos de detecção baseados na extração da bactéria pela imersão das sementes em tampão fosfato salina e posterior plaqueamento, ou mesmo o semeio direto da semente, em meio de cultura seletivo.

As bactérias podem sobreviver nas sementes, como latente, em baixas populações tendo sua multiplicação paralisada. A semente infectada pode ou não apresentar sintomas, na maioria das vezes não apresenta. Neste caso, se as sementes forem postas para germinar em substrato esterilizado (areia, vermiculita, solo e outros) de forma individualizada e mantidas em casa de vegetação ou câmara de crescimento, a partir da emergência das plântulas, poderá se observar a ocorrência de sintomas característicos da infecção pelo patógeno alvo. Então, é realizado o isolamento da bactéria e sua posterior identificação. Este também pode ser um método de detecção de bactérias em sementes, com a vantagem de permitir a determinação da porcentagem de transmissão do patógeno; entretanto, não permite a detecção de bactérias em sementes não germinadas.

As principais bactérias fitopatogênicas transmitidas por sementes pertencem aos gêneros: *Acidovorax*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, cuja classificação se encontra na Tabela 2. Para a diferenciação destes gêneros são adotadas características microbiológicas morfológicas, bioquímicas, de crescimento e moleculares.

Tabela 2. Classificação de bactérias fitopatogênicas transmitidas por sementes no Reino Prokariota

Reino	Divisão	Classe	Atributo	Bactérias fitopatogênicas	
				Família	Gênero
Procaryotae	Graciculites	Proteobacteria	Não fotossintética	Enterobacteriaceae	<i>Erwinia</i>
				Pseudomonodaceae	<i>Acidovorax</i>
					<i>Pseudomonas</i>
	Firmiculites	Thallobacteria	Gram positiva	Rhizobiaceae	<i>Xanthomonas</i>
					<i>Agrobacterium</i>
					<i>Streptomyces</i>
				<i>Clavibacter</i>	
				<i>Curtobacterium</i>	

2.3 Grupos de vírus associados às sementes

Apesar de os vírus possuírem algumas propriedades de ser vivo, como ter um genoma e ser capaz de se adaptar às mudanças ambientais, eles não podem capturar e estocar energia livre e não são funcionalmente ativos fora das células vivas. Portanto, mesmo sendo patógenos, eles não são considerados como microrganismos genuínos. Mesmo não tendo a possibilidade de ocorrer cruzamento entre as espécies, o que teoricamente limitaria a sua variabilidade, eles possuem uma população dinâmica, constituída por milhares de mutantes que se encontram presentes em um único clone viral. Essa população, que está sujeita ao processo natural de seleção, é chamada de “quase-espécie” viral.

Decidir como fazer um esquema distinto e facilmente reconhecível, para identificar as diferentes espécies virais tem sido um problema de difícil solução, devido à variabilidade dos vírus. Embora o reconhecimento dessas espécies seja de fundamental importância, os fitovirologistas levaram um bom tempo para chegar a um consenso sobre a classificação e taxonomia de vírus. As características empregadas para separar os vírus em diferentes agrupamentos levam em conta o seguinte: características do genoma, sequência do genoma, características das proteínas codificadas pelo genoma viral, os mecanismos de transmissão, o efeito do vírus na planta e o seu ciclo de hospedeiras.

A classificação e taxonomia de fitovírus realmente avançaram no período de 1980 a 1990, quando o desenvolvimento nas técnicas de sequenciamento do genoma viral deu um salto fundamental. Isso fez com que elas se tornassem bastante dinâmicas na última década, mudado tanto com esses novos conhecimentos gerados pela biologia molecular, que tem propiciado análises genômicas cada vez mais precisas e eficientes, como com o aparecimento de novos isolados virais. O órgão responsável pela classificação e taxonomia dos vírus é denominado “International Committee on Taxonomy of Viruses” (ICTV) que é formado por um grupo internacional de cientistas, encarregados de receber e discutir as informações e proposições de novas espécies/gêneros de vírus, que infectam plantas, animais vertebrados, invertebrados, bactérias, algas, fungos, leveduras e protozoários. O ICTV mantém disponível na internet, site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>, uma base de dados que é frequentemente atualizada, com os dados de todos os vírus já descritos em todo o mundo. Através de uma consulta rápida e fácil, pode-se localizar, nesse site, todos os dados referentes à classificação, taxonomia, características bioquímicas, moleculares, gama de hospedeiras, sintomas e demais informações que já foram publicadas a respeito de uma dada espécie viral.

O sétimo relatório do ICTV, que foi disponibilizado em 2000, já foi mudado no oitavo relatório que foi publicado em 2005. A atual classificação e taxonomia dos fitovírus podem ser vistas na Tabela 3, onde constam também uma família e alguns gêneros que estão sendo propostos por pesquisadores e se encontram em fase de análise para decidir sobre sua aceitação ou não para inclusão na taxonomia atual.

Tabela 3. Classificação de vírus fitopatogênicos transmitidas por sementes

Ácido Nucléico	Famílias	Gêneros
ssRNA+	<i>Comoviridae</i>	<i>Fabavirus Nepovirus</i> e <i>Comovirus</i> , ao qual pertence a espécie <i>Squash mosaic virus</i> (SqMV), transmitido por sementes de <i>Cucumis melo</i> e <i>Cucurbita</i> sp
	<i>Potyviridae</i>	<i>Rymovirus</i> , <i>Macluravirus</i> , <i>Tritimovirus</i> , <i>Ipomovirus</i> , <i>Bymovirus</i> e <i>Potyvirus</i> onde se encontram as espécies <i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV) e <i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV), transmitidas por sementes de feijão e de alface, respectivamente.
	Não classificados	<i>Sobemovirus</i> , <i>Idaeovirus</i> , <i>Umbravirus</i> , <i>Ourmiavirus</i> , <i>Tobravirus</i> , <i>Hordeivirus</i> , <i>Furovirus Pomovirus</i> , <i>Pecluvirus</i> , <i>Benyvirus</i> e <i>Tobamovirus</i> , onde se encontram as espécies <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV), <i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV) e <i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMoV), transmitidas por sementes de espécies de <i>Capsicum</i> sp. TMV e ToMV são também transmitidas por sementes de tomate. Há ainda os gêneros propostos <i>Cheravirus</i> e <i>Sadwavirus</i>

M. A. Mayo & A. A. Brunt – 2005
<http://www.danforthcenter.org/iltab/ictvnet/posters%5C04.1.Plant%202005A4.pdf>

2.4 Grupos de nematóides associados às sementes

Nematóides são organismos pertencentes ao reino Animal, sub-reino Metazoa e filo Nemata. Os principais gêneros de nematóides associados às sementes de plantas são classificados como:

<i>CLASSE</i>	<i>SECERNENTEA</i>		
<i>SUB-CLASSE</i>	<i>DIPLOGASTERIA</i>		
<i>ORDEM</i>	<i>TYLENCHIDA</i>		
<i>FAMILIAS</i>	<i>APHELENCHODIDAE</i>	<i>ANGUINIDAE</i>	<i>HETERODERIDADE</i>
<i>GÊNEROS</i>	<i>Aphelenchoides</i>	<i>Anguina</i> <i>Ditylenchus</i>	<i>Heterodera</i>

As principais espécies de importância agrícola que podem ser veiculadas por sementes encontram-se nos gêneros: *Anguina* (ex. *A. tritici* em trigo), *Aphelenchoides* (*A. besseyi* em arroz), *Ditylenchus* (*D. dipsaci* em cebola e brachiaria) e *Heterodera* (*H. glycine* em soja).

Comparados ao grupo dos fungos e das bactérias, os nematóides compõem o menor grupo de organismos fitopatogênicos, apresentando apenas algumas espécies de importância agrícola que podem associar-se às sementes.

Em geral, são organismos vermiformes, com variações morfológicas em algumas espécies e apresentando tamanho variável na faixa de 0,5 a 2,0mm de comprimento por 50 a 250mm de largura. Dependendo do tipo de associação, os nematóides parasitas de plantas podem ser sedentários ou migratórios, ectoparasitas ou endoparasitas. Pela sua natureza de parasitismo, são mais comumente encontrados no solo junto, ou no interior, das raízes das plantas parasitadas.

Nematóides fitoparasitas apresentam como característica morfológica principal a formação de estilete bucal, cuja função é perfurar os tecidos de seus hospedeiros e por meio do qual o alimento é ingerido.

Alguns nematóides, como as espécies de *Heterodera*, formam estruturas de sobrevivência no solo, conhecidas como cistos. Estes são estruturas que abrigam ovos dentro das fêmeas, revestidas por uma cutícula coriácea, resistente, que permite a sobrevivência destes ovos no solo.

3

FORMAS DE ASSOCIAÇÃO
DE PATÓGENOS COM
SEMENTES



3.1- FUNGOS

O conhecimento prévio das formas de interação do inóculo de patógenos com sementes é importante em patologia de sementes, dentre vários aspectos, para a escolha de métodos de detecção destes agentes.

De modo geral, o transporte de microrganismos por sementes em um dado lote pode se dar de três maneiras.

No primeiro caso, o microrganismo, separado ou não, encontra-se em mistura com as sementes, fazendo parte da fração impura do lote. Fazem parte desta fração: fragmentos vegetais, sementes de plantas invasoras e partículas do solo que podem, todos, ser portadoras de micélio dormente, corpos frutíferos e esporos de fungos, cistos ou galhas de nematóides, células bacterianas e partículas de vírus, escleródios ou estromas fúngicos (Figura 1 A).

Uma segunda maneira pela qual certos patógenos podem se associar e ser(em) transportados pelas sementes é por adesão passiva à superfície destas (Figura 1B).

A terceira forma de associação de microrganismos com sementes é a presença do inóculo nos tecidos das sementes, seja em estruturas superficiais (Figura 1C) ou mais interno no embrião (Figura 1D). Essa é a forma de interação e transporte mais comum entre os agentes transmitidos por sementes.

É preciso salientar que, apesar da distinção que se faz entre esses três tipos de interação de inóculo com as sementes, um mesmo patógeno pode estar presente em um lote, sob uma ou mais dessas formas de associação.

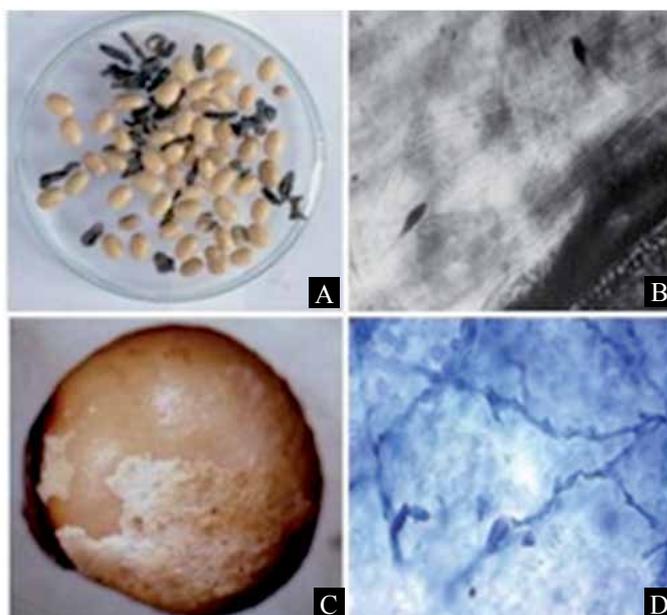


Figura 1 - (A) Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* junto de sementes de soja; B) Conídios de *Alternaria zinniae* aderidos à semente de zínia; C) Crosta de oósporos de *Peronospora manshurica* na superfície de sementes de soja; D) Embrião do trigo com hifas de *U. tritici*. [Fotos 1A, 1B e 1C de Prof. J.C. Machado (UFLA) e Foto 1D de Dr.S.B. Mathur (Dinamarca)].

3.2- BACTÉRIAS

As bactérias fitopatogênicas podem estar associadas às sementes tanto externamente quanto internamente. A contaminação pode ocorrer na cultura, no período de maturação da semente, quando o inóculo produzido sobre folhas ou outras partes da planta atinge a sua superfície, por meio de respingos de chuva, água de irrigação, vento, insetos, etc. ou durante as operações de colheita, transporte, beneficiamento e armazenamento. A polpa de frutos infectados ou contaminados também pode ser misturada com sementes durante o processo de extração. É importante lembrar que todo processo de manuseio da semente pode fazer com que uma baixa porcentagem de contaminação proveniente do campo aumente marcadamente. Estruturas anatômicas específicas das plantas influenciam a probabilidade de infecção da semente. Diversas bactérias fitopatogênicas alcançam a semente e algumas vezes o embrião via funículo. O funículo, todo ou em parte, sofre abscisão, deixando uma cicatriz, o hilo, que é geralmente a parte da semente mais permeável à água e juntamente com a micrópila proporcionam um meio de entrada para patógenos bacterianos. Rachaduras e outros ferimentos de origens diversas nas sementes constituem, também, vias importantes para a penetração e o estabelecimento interno de fitobactérias. A penetração ocorre ainda através das flores, da invasão pelo sistema vascular ou durante o desenvolvimento e maturação de frutos e vagens. Nas sementes, as bactérias se encontram na fase latente, em baixas populações tendo sua multiplicação paralisada. Muitas das bactérias fitopatogênicas permanecem viáveis pelo mesmo período de viabilidade das sementes. A semente infectada pode ou não apresentar sintomas, sendo que na maioria dos casos não apresenta.

3.3 VÍRUS

Apesar de infectar sistemicamente a planta, apenas uns 20% dos vírus conhecidos são transmitidos através das sementes verdadeiras. No caso dos vírus limitados ao floema, isso pode ser explicado pela falta de contato entre a planta mãe e o embrião. Por outro lado, os vírus que podem se translocar através dos plasmodesmas e vasos condutores têm sido encontrados em tecidos das sementes como tegumento, remanescentes nucelares e perisperma. Entretanto, com exceção de vírus altamente estáveis como o TMV (*Tobacco mosaic virus*) e o ToMV (*Tomato mosaic virus*), a maioria dos vírus não conseguem sobreviver à dessecação e maturação do envoltório da semente.

Assim sendo, existem dois tipos de mecanismos de transmissão dos vírus através das sementes: a) devido à contaminação da plântula por meios mecânicos, por partículas virais que ficam na parte externa e, raramente, no endosperma das sementes e em resíduos dessecados das polpas e dos frutos; b) devido à contaminação de tecidos do embrião.

Para que os vírus sobrevivam na parte externa das sementes e contaminem a plântula durante a germinação ou transplante, eles devem ser altamente estáveis, de modo a não perder a viabilidade durante os processos de colheita, processamento e armazenamento. No Brasil, as únicas espécies de vírus que possuem essas características pertencem ao gênero *Tobamovirus* como o TMV, ToMV e o PMMoV (*Pepper mild mottle virus*). Esses três vírus se localizam na parte externa das sementes, sendo que o PMMoV, em alguns casos, já foi também encontrado no endosperma, onde as partículas virais podem permanecer viáveis por alguns anos. Não se conhece as causas que impedem esses vírus de alcançar os tecidos do embrião ou do pólen, mesmo sendo altamente estáveis e infecciosos e invadindo sistemicamente a planta.

A maioria das transmissões por meio das sementes ocorre por contaminação dos tecidos do embrião. Entretanto, para que as partículas virais cheguem até o embrião, a planta mãe deve ser infectada antes da produção dos gametas ou, pelo menos, antes da separação citoplasmática dos tecidos embrionários. Isso porque o embrião e o endosperma são formados dentro do saco embrionário, depois da fertilização, e não existe conexão vascular direta nem contato celular com a planta mãe através de plasmodesmas, de modo que os vírus não possuem vias de translocação para esses tecidos após a produção dos gametas. Portanto, quanto mais jovem a planta for infectada, maior a chance de o vírus alcançar os tecidos embrionários. A única exceção conhecida é a do BSMV (*Barley stripe mosaic virus*), cuja porcentagem de transmissão por sementes aumenta em infecções tardias, até o máximo de 10 dias antes do espigamento. Depois dessa fase do ciclo de vida da planta, a proporção de sementes infectadas com BSMV, que pode variar de 90 a 100%, começa a diminuir.

Além dos vírus chegarem ao embrião através dos tecidos maternos, eles podem também contaminar os gametas masculinos, ou grãos de pólen. Isso significa que, caso sejam alógamas, plantas saudáveis podem produzir sementes infectadas, se o grão de pólen for proveniente de plantas infectadas. Por outro lado, plantas autógamas, onde ambos os gametas têm a chance de estar infectados, devem ser mais eficientes na produção de sementes infectadas.

Alguns vírus induzem sintomas nas sementes, entretanto, os sintomas não são necessariamente correlacionados com a sua transmissão. Diferentemente do que acontece com a transmissão do BSMV via sementes, geralmente a porcentagem de transmissão é baixa e bastante variável pois diversos fatores podem influenciar na proporção de sementes infectadas. A proporção de sementes infectadas apresenta uma grande variabilidade de acordo com o vírus, com a estirpe de vírus e com a planta hospedeira. Alguns vírus têm uma ampla gama de hospedeiras e podem ser transmitidos pelas sementes de algumas espécies e não pelas de outras. Além disso, diferentes espécies podem transmitir o vírus pelas sementes em diferentes proporções. A fase do ciclo de vida em que a planta for infectada e a localização do vírus nas sementes também são fatores que podem interferir nessa transmissibilidade.

3.4 NEMATÓIDES

A disseminação pode ser efetivada de diferentes maneiras. Pode ocorrer pelos seus próprios meios (movimentos lentos); pelo homem, no transporte de material propagativo infectado (sementes, mudas, tubérculos, etc.); pelos implementos agrícolas contendo solo infestado; pelos animais domésticos e insetos; e pela água de irrigação e infiltração.

A possibilidade de disseminação de fitonematóides através de sementes, a curta e a longa distância, entre regiões, países e continentes em todo o mundo, tem aumentado através do intercâmbio de sementes entre agricultores, melhoristas de plantas e outros agentes. Esse movimento, previsível na agricultura moderna, é favorecido pela constante circulação de material vegetal e falta de conscientização durante os processos de produção, comercialização e produção de sementes.

Os nematóides podem ser transportados junto com as sementes de três diferentes modos: **a)** no interior das mesmas, na forma de juvenis abrigados entre a casca e o endosperma da semente; em pequenas cavidades das sementes de cereais e de gramíneas; na região do hilo (*Aphelenchoides* spp. e *Ditylenchus* spp.) e, em lesões presentes na semente (*Ditylenchus* spp.); **b)** associados à fragmentos vegetais da planta-mãe infectada junto às sementes (*Ditylenchus* spp.); **c)** como contaminação concomitante, a exemplo de algumas espécies do gênero *Anguina* spp., as quais transformam o ovário da flor da planta hospedeira em galhas, sendo assim disseminadas misturadas às sementes produzidas ou, ainda na forma de cistos (*Heterodera* spp.), contidos em torrões de solo ou aderidos às sementes de plantas hospedeiras.

De importância para identificação dos nematóides fitoparasitas, além da presença do estilete, é o conhecimento do seu ciclo biológico. Desde a fase de ovo até a fase adulta, os nematóides sofrem quatro ecdises ou trocas de cutícula, o que equivale a diferentes estádios juvenis até a fase adulta. Em geral, a identificação de nematóides é realizada pelo exame da fêmea adulta, que apresenta as estruturas de reprodução completa.

4

MANUSEIO DE AMOSTRAS
DE SEMENTES E TÉCNICAS
AUXILIARES EM
LABORATÓRIO DE ANÁLISE
DE SEMENTES



No ato da recepção em laboratório, as amostras devem ser avaliadas no que tange ao seu estado de conservação/integralidade de suas embalagens e o número ou quantidade de sementes nelas contidas. Caso alguma irregularidade seja constatada, dependendo do grau de gravidade, as amostras devem ser devolvidas ao remetente anexando-se um comunicado sobre as irregularidades registradas.

Uma vez atendidas as exigências e realizado o registro de recepção, as amostras podem ser submetidas, sempre que necessário, à desinfestação inicial visando eliminar formas viáveis de ácaros e outros tipos de insetos. Este procedimento pode ser realizado por meio do congelamento, que consiste na manutenção das amostras, acondicionadas em sacos de polietileno limpos, em freezers (-20 °C) por 3-5 horas. Alternativamente, acaricidas químicos podem ser aplicados, respeitados os cuidados no seu manuseio.

4.1 Manuseio das amostras na recepção

Inicialmente as bancadas ou locais sobre as quais as sementes são manuseadas, devem ser limpos e desinfestados por meio de água quente com detergente e um desinfestante, a base de Lysoform, ou álcool 70% ou equivalente. A homogeneização e separação das sementes devem ser realizadas mediante uso de ferramentas e luvas limpas e desinfestadas. A cada intervalo entre o manuseio de uma para outra amostra, todo o local e instrumentos de manuseio devem ser devidamente desinfestados.

Cuidados devem ser tomados na identificação das amostras, evitando-se anotações cruzadas ou temporárias. Recomenda-se usar marcadores gráficos de composição permanente.

4.2 Destino de embalagens e outros materiais descartáveis

Materiais descartáveis utilizados no manuseio inicial das sementes, incluindo-se as embalagens, devem ser autoclavados antes de seguirem para o descarte final; os instrumentos e equipamentos não descartáveis, como espátulas, divisores mecânicos de amostras etc devem ser limpos ou desinfestados após o seu uso.

Findo o período de validade da análise sanitária, conforme indicado no Capítulo 9 das RAS, as amostras de sementes, portadoras de patógenos, devem ser autoclavadas ou devidamente acondicionadas para envio ao destino final de descarte.

O destino de materiais descartáveis utilizados na execução dos testes de sanidade deve ser procedido de autoclavagem após as avaliações.

4.3 Cuidados com as amostras após a recepção

Uma vez registradas, e após a retirada da fração de trabalho, as amostras devem ser imediatamente transferidas para as câmaras de armazenamento. Caso isto não seja possível no mesmo dia, evitar a exposição das mesmas a ambientes com atmosferas úmidas, temperaturas elevadas ou qualquer outra forma de atmosfera modificada com gases ou outros agentes que possam interferir nos microrganismos associados.

No local de armazenamento, evitar o acondicionamento de outros materiais vegetais com umidade superior ao das sementes, bem como evitar proximidade das amostras com produtos químicos de qualquer espécie, principalmente aqueles com propriedade de volatilização.

Em caso de uso de produtos químicos com efeito residual prolongado, como 2,4-D (Diclorofenoxiacetato de sódio) e outros, proceder a lavagem imediata de pipetas e demais recipientes nos quais estes produtos foram abrigados, evitando-se a dispersão de resíduos dos mesmos nos locais de manipulação de sementes.

4.4 Manuseio de sementes tratadas com defensivos agrícolas

Sementes tratadas com fungicidas e / ou outros defensivos agrícolas devem ser manipuladas de acordo com as normas existentes para este tipo de material, atentando-se para a segurança do operador e para cuidados específicos de prevenção à poluição do ambiente. As sementes devem ser manipuladas em ambientes apropriados como, câmaras de exaustão, devendo o material utilizado em seu manuseio ser lavado em separado. Vale lembrar que o uso de luvas e máscaras protetoras é um requisito indispensável nestas operações.

Para o armazenamento, as amostras devem ser acondicionadas em embalagens à prova de gases ou outra forma de escape de produtos, evitando-se colocá-las próximo ou no meio de amostras não tratadas. As embalagens devem ser distinguidas externamente por meio de inscrições ou sinais existentes para esta finalidade. Após o período de validade, as amostras com as respectivas embalagens devem ser descartadas seguindo-se normas existentes para esta finalidade no país. Instruções e normas estão disponibilizadas pela ANDEF (site: <http://www.andef.com.br>) e por Órgãos Oficiais que tratam desses aspectos.

4.5 Técnicas auxiliares em Laboratórios de rotina

A análise sanitária de sementes requer a aplicação de inúmeros procedimentos, que vão desde a etapa de preparação de materiais utilizados para a condução dos testes até a execução propriamente destes. Em se tratando de manuseio de sementes e de microrganismos, às vezes em separado, as técnicas são basicamente as mesmas utilizadas em laboratórios de microbiologia. Desta forma, o foco, neste capítulo, será dado apenas à algumas técnicas que podem auxiliar o analista em sua tarefa cotidiana, principalmente voltadas para manipulação de fungos e bactérias.

4.5.1 Limpeza e esterilização de material

Todo material utilizado em testes de sanidade de sementes, como ferramentas de manipulação (pinças, espátulas, estiletes, bisturis, tesouras, vidrarias, água, papel de filtro, papel germitest, placas de petri, gerboxes ou outros recipientes, peneiras, meios de cultura, etc) devem estar limpos e isentos de contaminações microbianas. Isto se faz necessário para evitar contaminações cruzadas, que podem comprometer a validade dos resultados dos testes de sanidade.

Para instrumentos, vidrarias e recipientes plásticos, a limpeza com detergente neutro deve ser feita inicialmente após o seu uso e antes de estocagem. Placas de Petri de vidro, demais vidrarias, papel de filtro devem ser esterilizados a seco a temperatura de 160°C por duas horas. Água, meios de cultura (caso de BDA), solução de 2,4-D devem ser autoclavados a 121°C por 20 minutos sob pressão de 1,5 atm. Recipientes de plásticos, como determinados tipos de placas, gerboxes devem ser esterilizados, em casos de reutilização, em câmaras herméticas contendo no interior óxido de propileno ou formol a 4%.

Em operações de manipulação de sementes por ocasião da montagem de testes, no interior de capelas de fluxo laminar, instrumentos metálicos utilizados devem ser desinfestados com álcool 70% seguido de flambagem em bico de Bunsen ou lamparinas.

Cuidados gerais de assepsia, como uso de aventais de proteção, máscaras e luvas pelos analistas e demais usuários do laboratório devem ser tomados visando à garantia do controle de qualidade sanitário do Laboratório e a segurança dos operadores.

Verificação do nível de contaminação do interior do Laboratório pode ser feito expondo algumas placas de petri com meio de cultura, abertas, por alguns minutos em locais estratégicos nos recintos de trabalho e incubação de sementes. Após incubação por 4-7 dias, a 25 °C, é possível avaliar a presença de colônias de microrganismos desenvolvidas nessas placas.

Para o controle periódico de contaminações microbianas e de ácaros, é recomendável a aplicação de formol 4% em salas de incubação, e outras sob suspeita, pelo período de 24-48 horas a cada 15 ou 30 dias, dependendo do grau de contaminação suspeito.

4.5.2 Preparo de material para exame microscópico

O exame complementar de material fungico ao microscópio ótico, quase sempre é necessário para confirmações da identidade de alguns microrganismos. Uma primeira alternativa é a raspagem de material fungico diretamente das sementes para lâminas de observação microscópicas. Este procedimento se presta para alguns fungos, principalmente quando se trata de espécies que se caracterizam, em grande parte, pelo tipo de frutificação ou esporos/conídios. Em casos que a frutificação com a presença de esporos torna-se essencial para a identificação da espécie, a raspagem pode não conduzir a conclusões seguras. Para esses casos e em situações que observações mais rápidas sejam requeridas, uma alternativa que tem sido das mais eficazes, é a técnica do preparo de lâminas com fita adesiva transparente de boa qualidade. Pedacos de 4-6 cm deste material são seguros pelos extremos, com a face adesiva voltada para baixo, e sua parte central colocada em contato com a parte do fungo sobre as sementes. Em seguida, fixa-se a fita em uma lâmina para microscopia contendo uma pequena gota de líquido de montagem (Azul de Amann ou outro), tendo-se o cuidado de estendê-la, o melhor possível, sobre a lâmina.

Em casos de identificação complexa de alguns fungos em sementes, onde as observações ao microscópio não são suficientes para assegurar uma conclusão mais segura, a alternativa que resta é o isolamento da espécie em questão por meio dos procedimentos já conhecidos e descritos em manuais de microbiologia e fitopatologia. Nestes casos as sementes, em separado, ou no próprio recipiente usado em sua incubação, exibindo o microrganismo alvo, deve ser transferida para uma capela de fluxo laminar e, com auxílio do microscópio estereoscópico desinfectado e de um estilete, ou alça de platina, limpo e flambado, efetuar a transferência do inóculo diretamente das sementes para meio de cultura contido em placas de petri. Esta transferência pode ser realizada tocando cuidadosamente, com auxílio do estilete contendo no seu extremo um pequeno fragmento de Agar-água, nas frutificações do fungo a ser isolado e daí depositando o sobre o meio de cultura na placa.

Para observações microscópicas em análise de rotina, recomenda-se além de água destilada os seguintes líquidos de montagem:

1- Lactoglicerol: (usado para estruturas escuras)

Ácido láctico	20 mL
Glicerol	40 mL
Água destilada	20 mL

2- Azul de Amann modificado (para estruturas hialinas)

Ácido láctico	10 mL
Glicerol	10 mL
Água destilada	10 mL
Anilina ou Trypan Blue	0,01g

Para ambos líquidos de montagem, fenol, previamente dissolvido, pode ser adicionado à mistura na proporção de 20 g do total, ressaltando se os cuidados que este produto requer em razão dos riscos que oferece à saúde humana.

5

TESTES DE SANIDADE



No âmbito do controle de qualidade de sementes, o teste de sanidade é utilizado para definir o perfil de qualidade de um lote ao lado de outros testes que indicam a condição de germinabilidade, vigor, pureza física e identidade genética.

Para cada teste pode existir um ou mais métodos, os quais são desenvolvidos lançando-se mão de diferentes princípios/fundamentos. A opção de escolha por um ou por outro método irá depender, em princípio, do objetivo do teste.

Neste manual, são descritos os métodos de detecção dos agentes fitopatogênicos mais comumente utilizados para a análise sanitária de sementes em geral. Para alguns casos, descrições de métodos específicos ou especiais são incluídas. No Capítulo 9 das RAS, haverá indicação de apenas um método para cada patossistema, exceto em casos que a pesquisa forneça evidências estatísticas de equivalência de dois ou mais métodos disponíveis. É oportuno salientar que um mesmo agente pode ser detectado por diferentes métodos, havendo diferenças entre eles em relação a sensibilidade, custos, complexidade de execução, e objetivos do teste etc.

5.1 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE FUNGOS

Nesta seção os métodos são apresentados, seguindo-se, de certa forma, a ordem de interação do inóculo dos fungos em relação às sementes que compõem a amostra submetida para a análise, conforme tratado no capítulo 3 deste Manual.

Ao final da descrição dos protocolos simplificados, são apresentadas, em separado, as características das principais espécies que são consideradas neste Manual para o método de Incubação em Substrato de Papel (“blotter test”). Os padrões de ocorrência dos fungos são apresentados em separado, da forma como são visualizadas suas características típicas ao microscópio estereoscópico e ao microscópio ótico.

5.1.1 Inspeção visual da amostra de sementes

- **Fração de sementes para a análise:**

Considerar a fração correspondente aos pesos indicados na análise de pureza descritos nas Regras para Análise de Sementes vigentes

- **Procedimentos:**

Submeter as porções de sementes ao peneiramento com malha de tamanhos variados, coletando as frações obtidas em separado e dispondendo-as em uma camada simples sobre superfície limpa, previamente desinfestada, e sob luminosidade suficiente para observações dos componentes fracionados a olho nu e/ou com auxílio de lupas à resolução de 10 a 40 X. Sementes e impurezas devem ser examinadas em separado.

- **Avaliação:**

Contar o número de sementes com sintomas/sinais típicos dos agentes patogênicos e as unidades de cada tipo de inóculo, caso de escleródios, estromas e agregados de frutificações reconhecidas, presentes na amostra (Ilustrações na Figura 2). Presença de insetos e sementes de outras espécies deve ser registrada.

Os resultados devem ser expressos em número de estruturas fúngicas ou de sementes com sintomas do patógeno por peso.

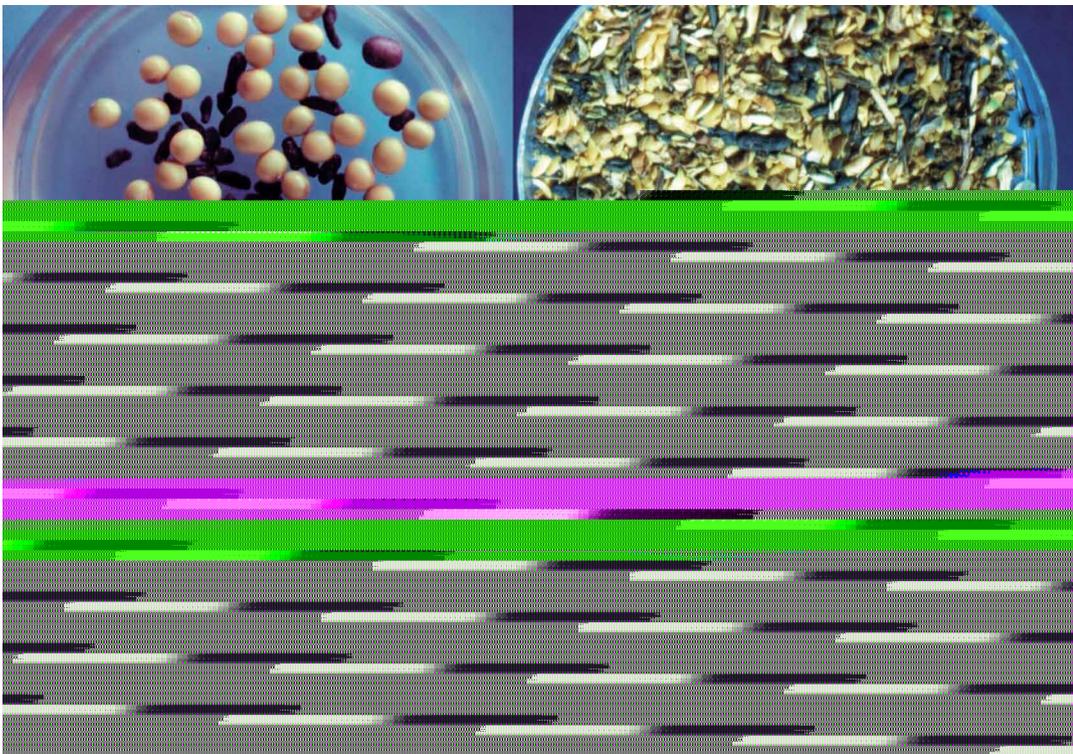


Figura 2 - Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja (A), trigo (B), feijão (C) e algodão (D). [Fotos de Prof. J.C.Machado- UFLA]

- **Observações gerais:**

i - Metodologia aplicável para exame de sementes que exibem sintomas ou sinais típicos da presença de determinados fungos patogênicos, como é o caso de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara (1889) (Figura 3A) em feijão; *Peronospora manshurica* (Naumov) Syd. (1923) (Figura 3B) e *Cercospora kikuchii* (Tak. Matsumoto & Tomoy.) M.W. Gardner (1927) (Figura 3C) ambos em soja; *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (1959) em trigo (Figura 3D); *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (1976), (Figura 4A) e *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wilson (1914) (Figura 4 B) ambos em milho; *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subram. & B.L. Jain (1966) em arroz (Figura 4 C).

Fusarium graminearum Schwabe (1839)

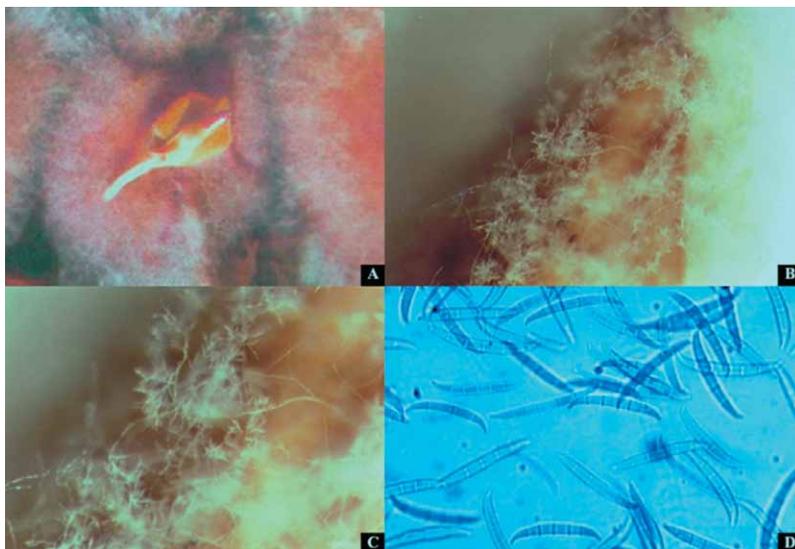


Figura 58 - *Fusarium graminearum* em sementes de milho (A, B e C) e conídios em preparação microscópica (D). [Fotos de Prof. J.C. Machado-UFLA].

Idem descrição para o Trigo.

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenb (Syn. *F. moniliforme* J. Sheld. (1904)

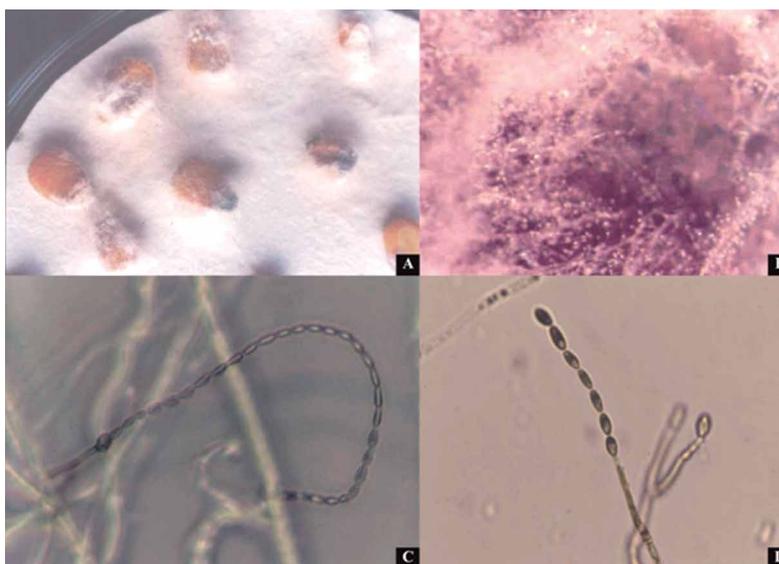


Figura 59 - *Fusarium verticillioides* em sementes de milho (A e B) e cadeia de microconídios (C e D). [Fotos de Prof. J.C. Machado-UFLA].

Micélio esbranquiçado, levemente pigmentado de púrpura, ou branco-alaranjado; colônias bem desenvolvidas sobre as sementes, às vezes com aparência floculosa. Por vezes, o crescimento micelial é acompanhado pela formação de pionodes de tamanho e superfícies irregulares, coloração laranja a vermelho-púrpura (Figura 59A e B). Sob alta resolução, cadeias de microconídios simples, ou ramificadas, longas ou curtas; às vezes com pequenas agregações de microconídios são visualizadas. Cadeias de microconídios são mais frequentes em colônias pouco desenvolvidas.

Macroconídios, quando formados em pionodes, são fusiformes, afilados, parede delicada, tamanho $25-60 \times 2,5-4,0 \mu\text{m}$ e com 3-7 septos. Microconídios, mais frequentes em cadeias, são hialinos, unicelulares, em geral com a base achatada, tamanho $5-12 \times 1,5-2,5 \mu\text{m}$. (Figura 59C e D)

Fusarium sub-glutinans (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas (1983)



Figura 60 - *Fusarium sub-glutinans* na semente de milho (A) e agregados de conídios sob alta resolução(B).
[Fotos de Prof. J.C. Machado-UFLA]

Em geral as colônias apresentam as mesmas características que *F. verticillioides*, exceto que, sob alta resolução as cadeias de microconídios são raramente produzidas, sendo a formação de agregados (falsas cabeças) de microconídios predominantes (Figura 60A e B). Conídios são semelhantes aos de *F. verticillioides*.

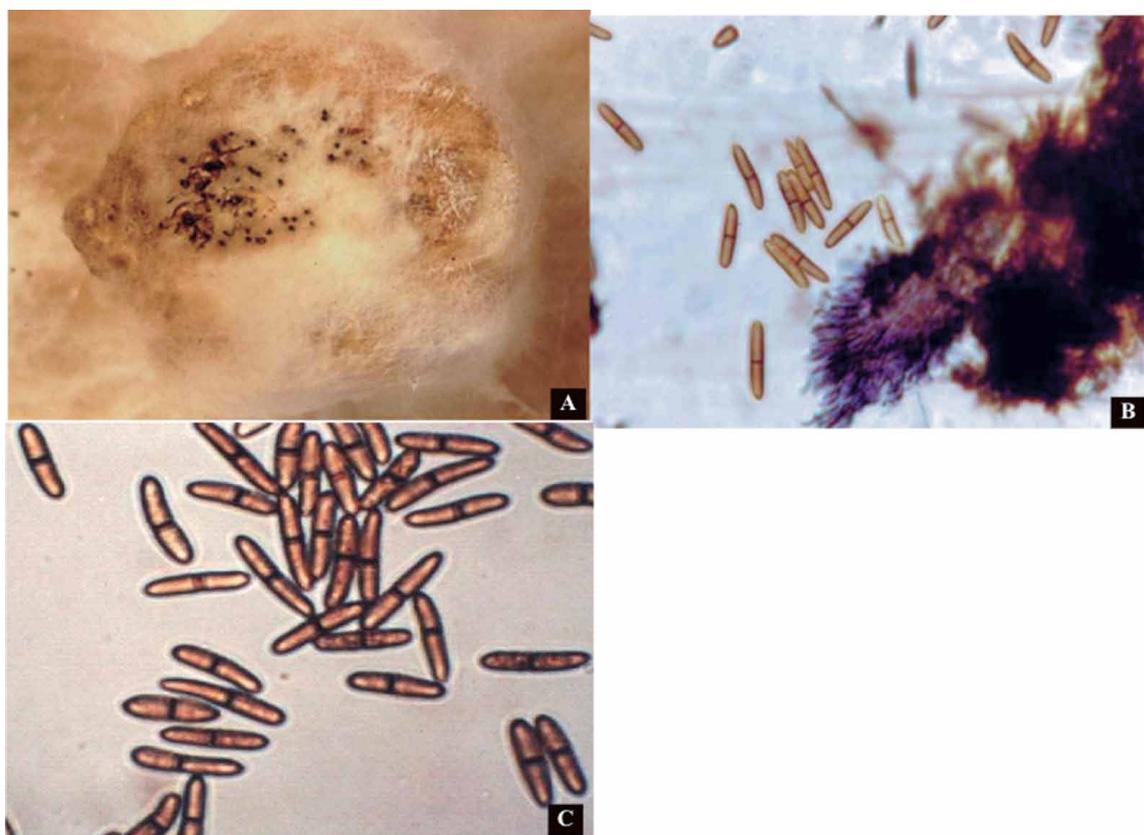
Stenocarpella maydis (Berk.) B. Sutton (1980)

Figura 61 - *Stenocarpella maydis*; picnídios em sementes de milho (A) e conídios em preparações microscópicas (B e C). [Fotos de Prof. J.C. Machado-UFLA]

Micélio branco a cinzento-pálido, superficial nas sementes. Picnídios imersos, esféricos a subglobosos, marrons escuros a negros, com ostíolos protudentes (Figura 61 A).

Conídios retilíneos, curvados ou irregulares, com 1, às vezes 2, septo(s), marrom-claros, com ápice atenuado ou arredondado, base truncada, tamanho $15-34 \times 5-8 \mu\text{m}$, (Figura 61 B e C) formados a partir de fiáldes hialinas, asseptadas e cilíndricas.

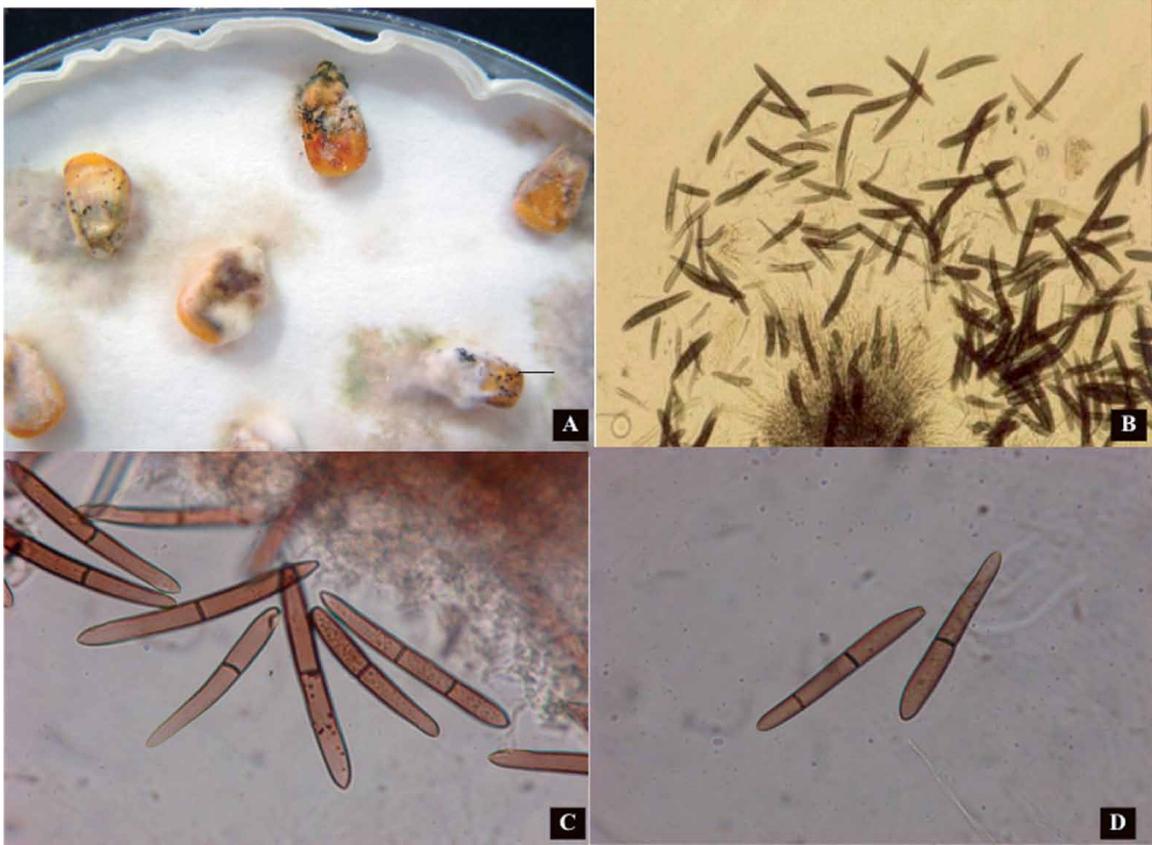
Stenocarpella macrospora (Earle) B. Sutton (1977)

Figura 62 - *Stenocarpella macrospora*; picnídios em sementes de milho (A), conídios em preparações microscópicas (B, C e D). [Fotos A, C e D de Prof. J.C. Machado-UFLA e Foto B, cedida por Dr. N.F. Pinto – Embrapa/Milho e Sorgo)

Micélio branco a cinzento-pálido, superficial nas sementes. Picnídios imersos, esféricos a subglobosos, marrom escuro a negros, com ostíolos protudentes (Figura 62 A).

Conídios retilíneos, curvados ou irregulares, 2 septos (às vezes 1), marrom claro, com ápice atenuado ou arredondado, base truncada, tamanho 44-82 x 7,5-11,5 μm , (Figura 62 B, C e D) formados a partir de fiálides hialinas, asseptadas e cilíndricas.

FUNGOS DE ARMAZENAMENTO

Aspergillus candidus

Conidióforos com tamanho variável, não excedendo 1mm. Formação de vesícula globosa e fiálides. Conídios são globosos ou subglobosos com tamanho 2.5 x 3.5 µm de diâmetro. Colônias com coloração branca para creme, uniseriado ou biseriado (D) e (Figura 64A)

Aspergillus flavus

Colônias, em geral, de coloração verde amarelada sobre as sementes. Conidióforos com vesículas esféricas, na maturidade fendidas em colunas, pouco definidas, 500-600µm de diâmetro, e raramente maiores. Presença de fiálides que cobrem a vesícula. O conidióforo apresenta cabeça, normalmente menor que 1µm de comprimento. Os conídios são tipicamente globosos a subglobosos, equinulados, medindo 3-6 µm de diâmetro, frequentemente de 3.5µm – 4.5µm, às vezes elípticos ou periformes. Uniseriado ou biseriado, cabeças dos conídios são radiais ou formando colunas pouco definidas. Possuem coloração verde amarelo e conidióforos ásperos (não lisos). (Figura 63B).

Aspergillus glaucus

Colônias de coloração brilhante azulada tornando se verde para castanho verde, ocasionalmente formando cleistotécio de cor amarela a laranja. Cabeça do conídio radial; conidióforos lisos e septados. Fiálides são formadas diretamente na vesícula, uniseriada, que possuem cabeças globosas e amarelo brilhante e pode ocorrer a formação de cleistotécio. Os conídios são rugosos, raramente lisos, formato oval tipo pêra com 5µm de comprimento, em baixas temperaturas pode chegar até 15 ou 24µm (Figura 63A).

Aspergillus ochraceus

Crescimento, inicialmente pardo, granular, formando uma massa de conídios, amarelo palha, tornando-se amarelo “ochraceus”. (As colônias possuem coloração amarelo a laranja ou caramelizado). Os conídios são globosos radial ou elípticos. Ocorre formação de vesícula e fiálides que estão firmemente unidas, formando camadas uniseriada ou biseriada. O tamanho dos conídios pode variar de 2.5-3µm de diâmetro. (Figura 63 C).

Penicillium SP.

Colônia sobre a superfície da semente é de coloração amarelo verde ou azulada. Conidióforos são curtos de 30-100µm x 4-5µm, geralmente eretos, lisos ou algumas vezes ligeiramente ásperos. Formação de poucas fiálides. Os conídios são unicelulares, variáveis, lisos subglobosos para esféricos, mas geralmente elípticos 3.4 -12 x 3-8µm normalmente 6-8µm x 4-6µm.(Figura 63 E; 64C e D).

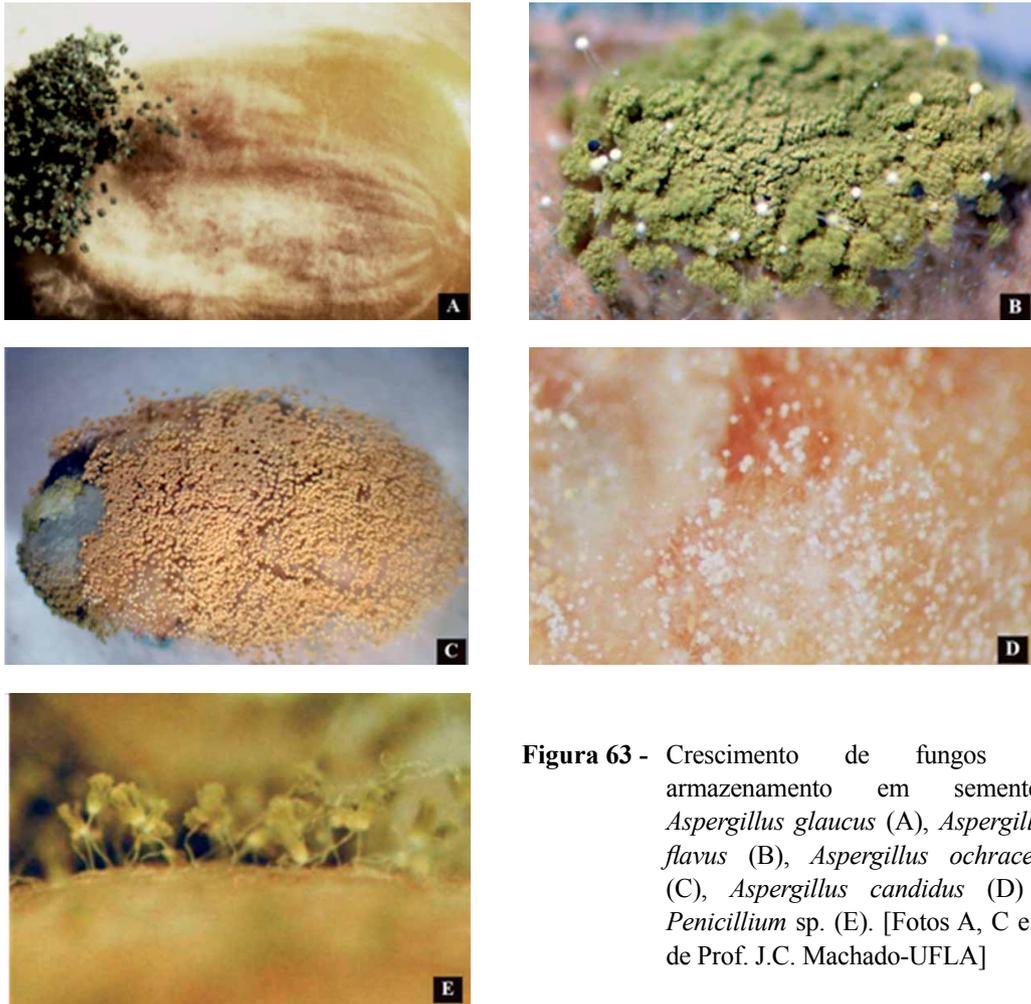


Figura 63 - Crescimento de fungos de armazenamento em sementes: *Aspergillus glaucus* (A), *Aspergillus flavus* (B), *Aspergillus ochraceus* (C), *Aspergillus candidus* (D) e *Penicillium* sp. (E). [Fotos A, C e D de Prof. J.C. Machado-UFLA]

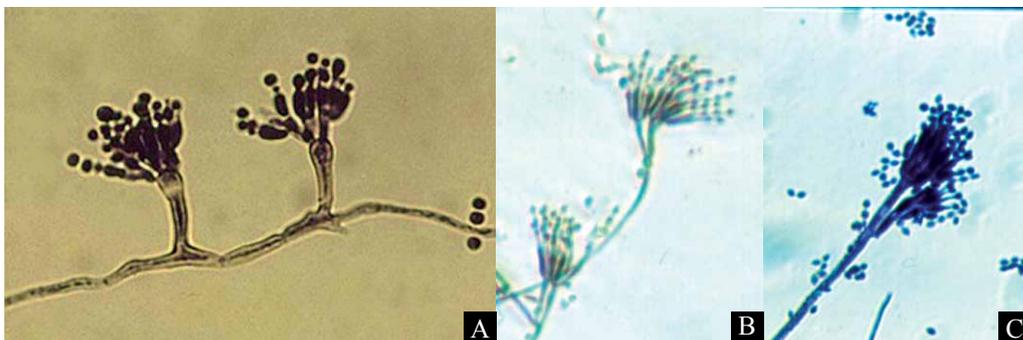


Figura 64 - *Aspergillus* e *Penicillium* frutificações: *Aspergillus* (A) e *Penicillium* (B e C) em preparações microscópicas. [Fotos A, C e D de Prof. J.C. Machado-UFLA]

ESPÉCIES CONTAMINANTES MAIS FREQUENTES EM SEMENTES

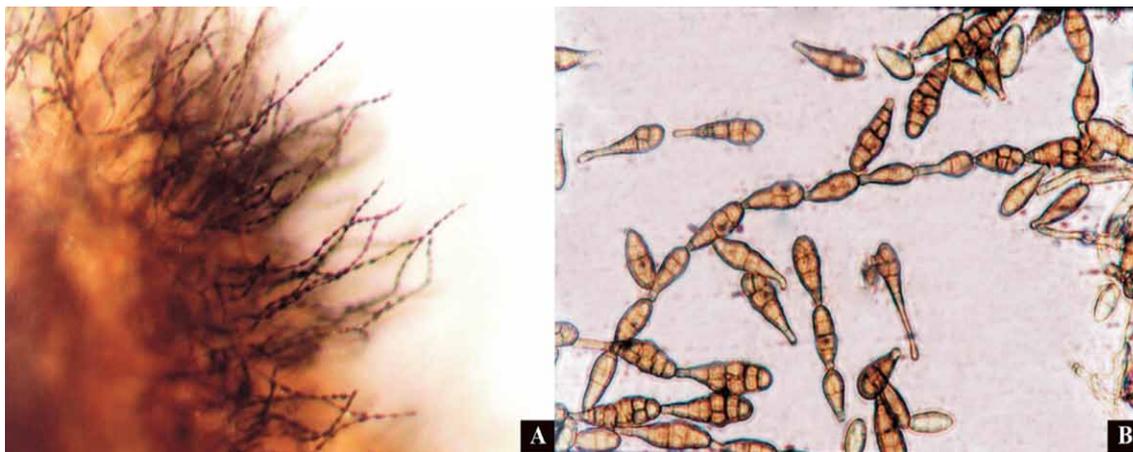
Alternaria alternata

Figura 65 - *Alternaria alternata* em sementes (A) e conídios em preparação microscópica (B). [Fotos de Prof. J.C. Machado-UFLA]

Crescimento cinza escuro, aéreo, variável em densidade, com produção de conidióforos diretamente sobre as sementes. Conídios produzidos em cadeias longas, em número de 2 a 11, com mais frequência. Geralmente as cadeias são simples, podendo ser ramificadas. Conídio polimorfo, curto ou longo, marrom para preto, altamente variado quanto ao formato, oval para cilíndrico. Quanto ao número de septos, podem ter até 8 transversais e normalmente vários longitudinais ou oblíquos. O tamanho varia de 20-63(37) μm x 9-18 (13) μm na parte mais larga, com a ponta (bico) pálido com 2-5 μm de espessura. (Figura 65).

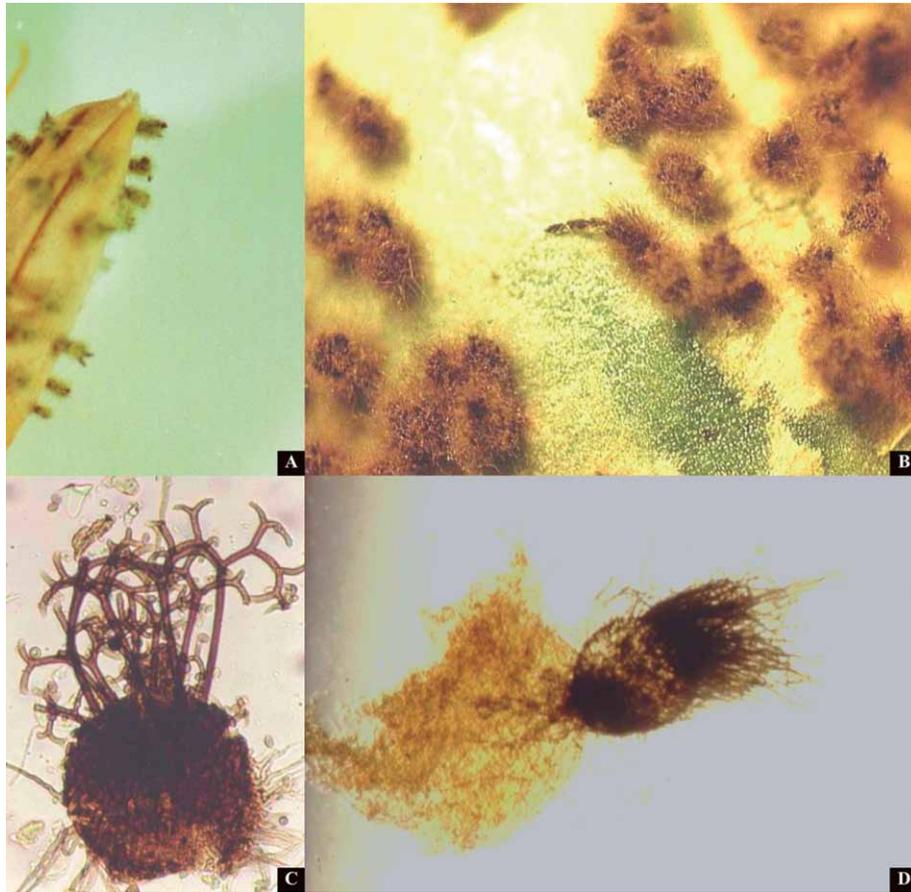
Chaetomium sp.

Figura 66 - *Chaetomium* sp. em sementes de arroz (A), sementes de soja (B) e peritécios em preparações microscópicas (C e D). [Fotos de Prof. J.C. Machado-UFLA]

Peritécios são formados no meio de micélio de baixa densidade na superfície da semente e, muitas vezes, sobre o papel próximo a sementes. Os peritécios são esféricos ou piriformes, abundantemente cobertos por setas geralmente longas. Características das setas, como ornamentações, ramificações, formato, coloração, são importantes na identificação de espécies. As ascas, evanescentes, desaparecem com a maturação dos ascósporos unicelulares, limoniformes e escuros (Figura 66).

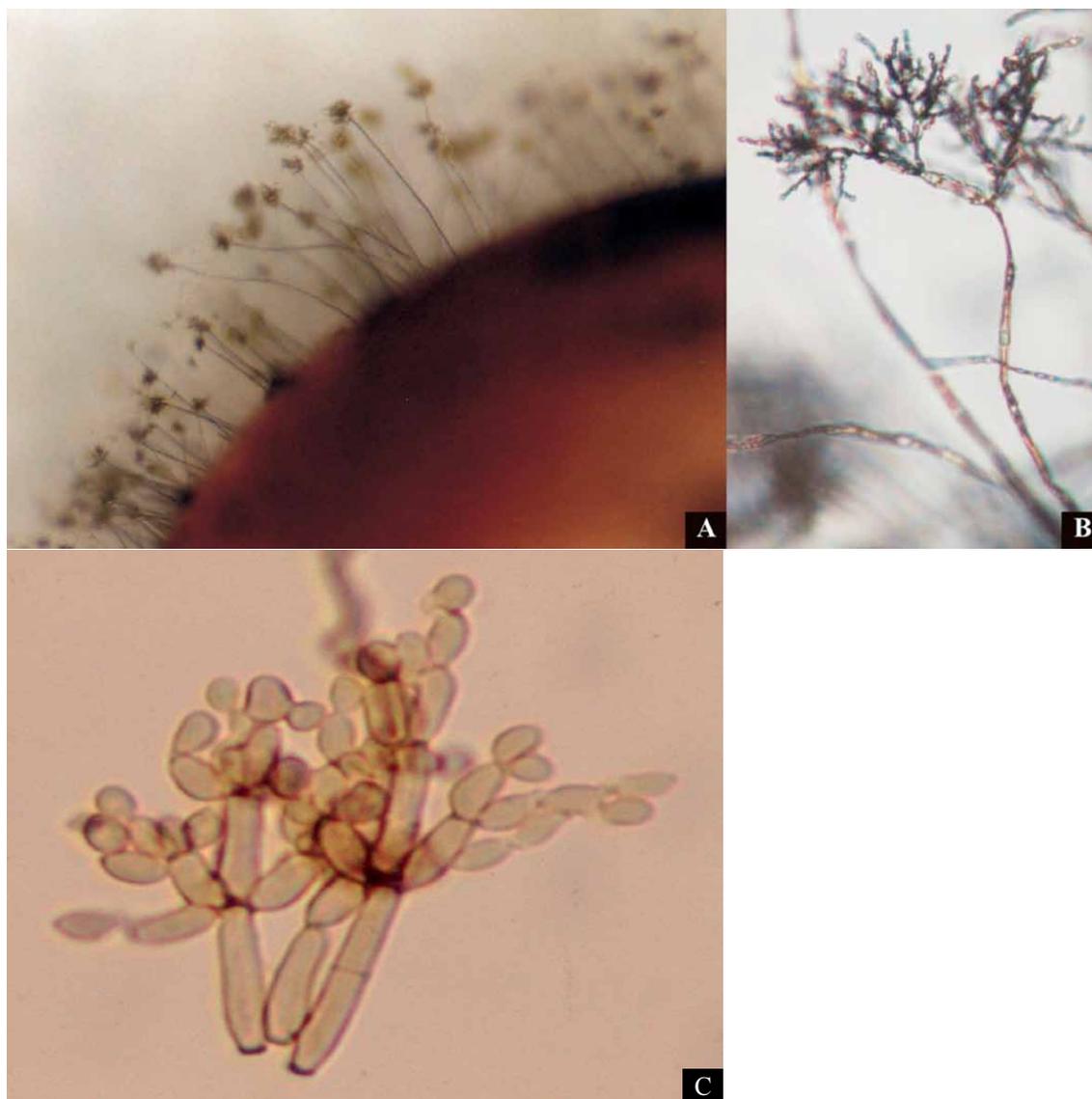
Cladosporium sp.

Figura 67 - *Cladosporium* sp em semente (A e B), e conídios em preparação microscópica (C). [Fotos de Prof. J.C. Machado-UFLA].

Conidióforos altos, escuros, eretos, ramificados irregularmente no ápice, dendróides. Conídios escuros, 0-3 septos, variáveis em forma e tamanho, formando cadeias frequentemente ramificadas, globosos ou subglobosos com 3-4,5 μm de diâmetro. Apresenta colônias, cinza, oliva ou café. Longas cadeias de conídios com tamanho principalmente de 4-9 x 3-5 μm . (Figura 67).

Curvularia sp.

Figura 68 - *Curvularia* sp. em sementes (A) e conídios em preparação microscópica (B).
[Foto A de Dr. S.B. Mathur (Dinamarca) e Foto B de Prof. J.C. Machado – UFLA].

Colônias difusas, com micélio escuro, conidióforos escuros, retos a flexuosos. Conídios marrom pálido a marrom escuro, com 3 ou mais septos, usualmente as células apicais mais claras e uma célula com um lado maior que outro, tornando o conídio curvo. Tamanho dos conídios é variável de acordo com a espécie. Em algumas espécies ocasionais estauroconídios trirradiados ocorrem. (Figura 68)

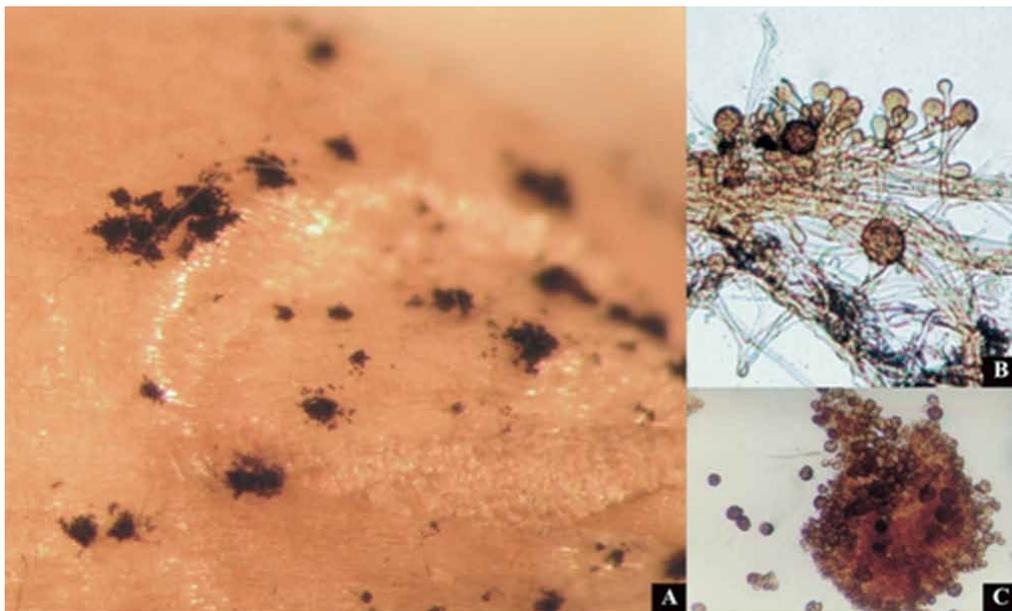
Epicoccum purpurascens

Figura 69 - *Epicoccum purpurascens* em sementes (A) e conídios (B e C) em preparação microscópica.
[Fotos de Prof. J.C. Machado-UFLA].

Colônias de crescimento rápido, amareladas a alaranjadas, produzindo, muitas vezes, pigmentação avermelhada púrpura no substrato de papel ao redor das sementes contaminadas. O fungo produz esporodóquio marrom para preto, normalmente agrupados e granulares. Conidióforos compactos, curtos, escuros, em grupos e com um único conídio terminal de 15-25 μm . Os conídios, em sua maioria esféricos, são septados irregularmente, com paredes espessas cobertas de protuberâncias curtas. (Figura 69).

Nigrospora sp.

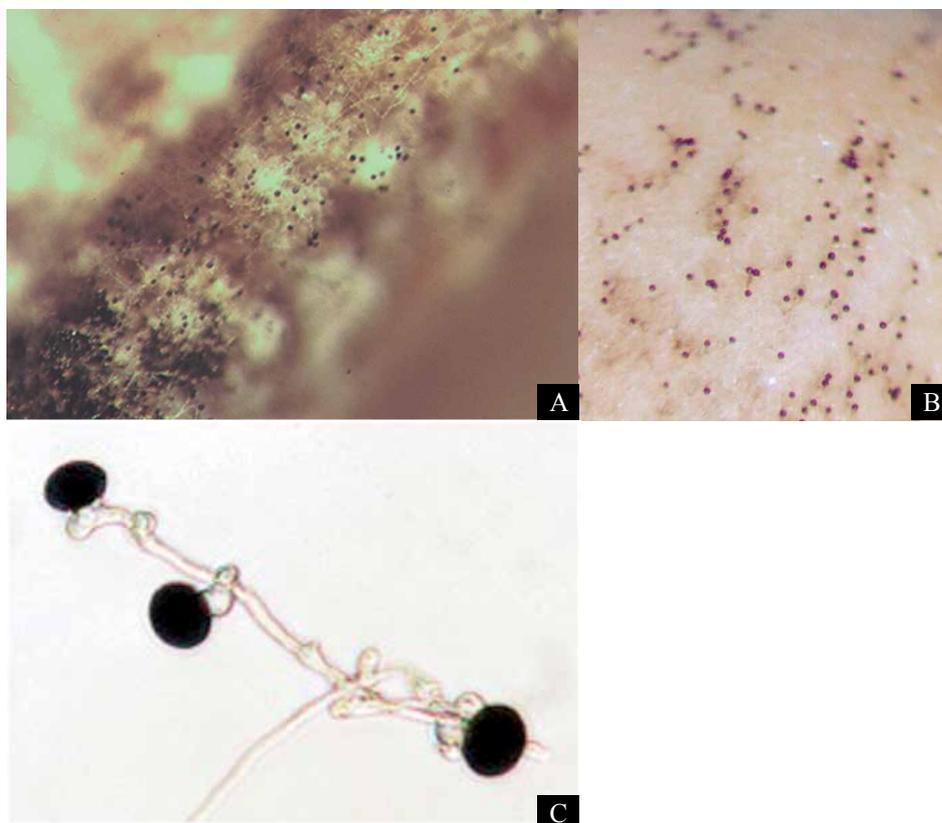


Figura 70 - *Nigrospora* sp. em sementes (A e B) conidióforos com conídios em preparação microscópica (C).[Fotos de Prof. J.C. Machado- UFLA]

Micélio imerso ou parcialmente superficial nas sementes com produção abundante de conídios negros intercalados nas hifas (Figura 70A e B). As colônias são inicialmente de cor branca, contrastando com os esporos negros e brilhantes, depois se tornam escuras pela intensa esporulação. Conidióforos são curtos, com um único esporo terminal, produzido sobre célula intercalar e flexuosos com tamanho entre 3-7 μm de altura. Conídios são lisos, brilhantes, esféricos ou ovóides com 10-16 μm de diâmetro (Figura.70 C).

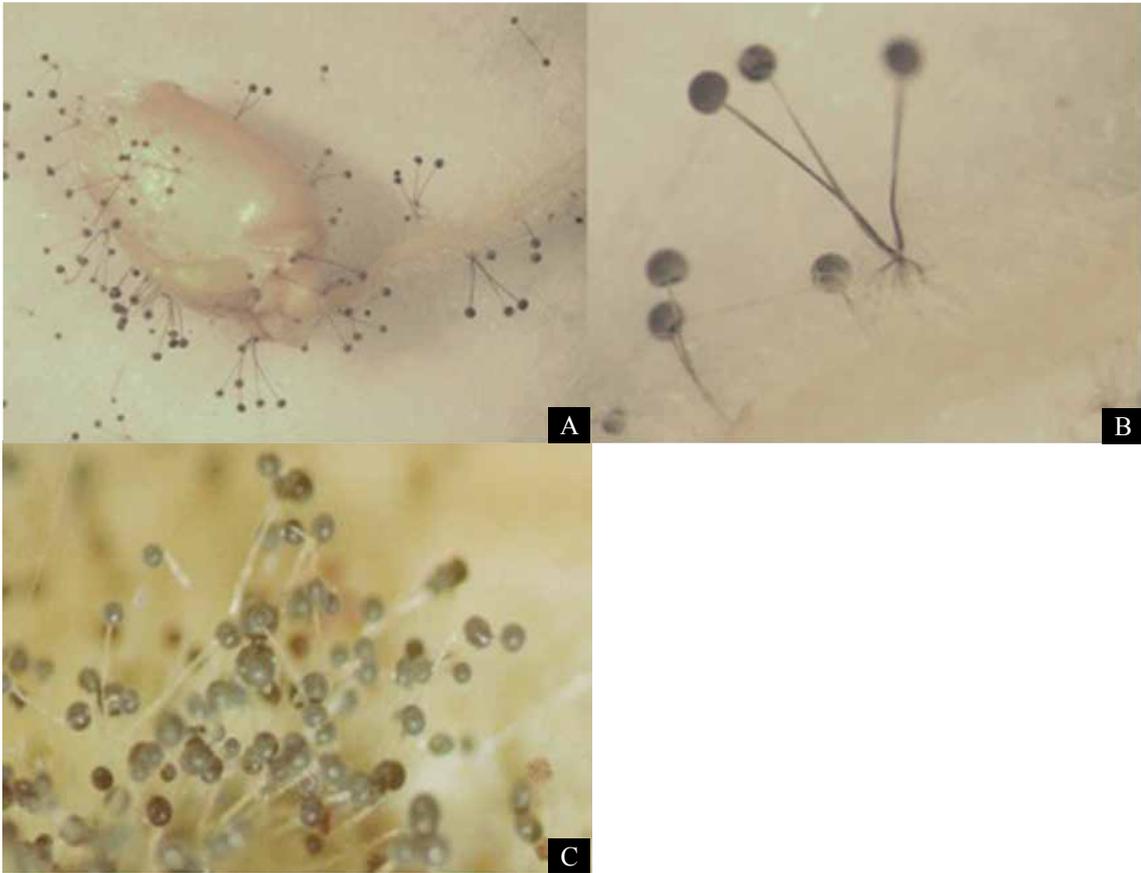
Rhizopus stolonifer

Figura 71 - *Rhizopus stolonifer*: esporângios e esporangiósporos em sementes e papel de filtro (A, B e C).

O crescimento das colônias é muito rápido, ocorre formação de esporângios esféricos de coloração negra, contendo numerosos esporóforos. Os esporóforos, geralmente são eretos e em grupos, com até 2,5 mm de tamanho e com 20 μ m de diâmetro. Os esporóforos podem variar de globosos para oval, elipsóides, poligonal ou angular. Os esporângios são esféricos (globosos), inicialmente branco, tornando-se negros quando maduros com até 200 μ m de diâmetro. (Figura 71).

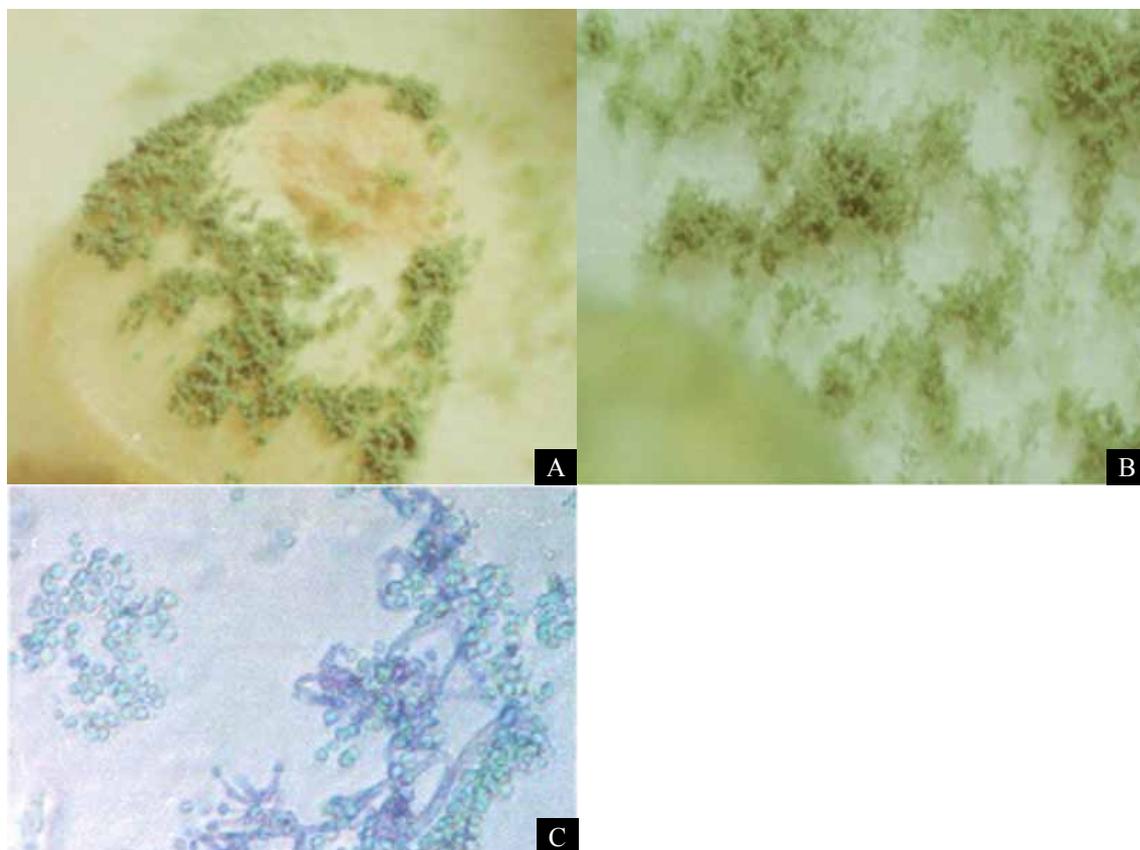
Trichoderma sp.

Figura 72 - *Trichoderma sp.*: em sementes de milho (A e B) e conidióforos com conídios em preparação microscópica (fita adesiva).[Fotos de Prof. J.C.Machado- UFLA]

As colônias, inicialmente brancas, se tornam verdes com a abundante esporulação. Conidióforos hialinos ramificados em ângulos retos. As fálides produzem conídios unicelulares, ovóides, hialinos que permanecem, em grupos. Os conídios, em massa, apresentam em geral coloração verde (Figura 72).

Trichothecium sp.

Figura 73 - *Trichothecium* sp. Frutificação sobre as sementes (A) e em preparação microscópica.(B).
[Fotos de Prof. J.C.Machado- UFLA].

Sobre as sementes contaminadas o fungo produz colônia com intensa esporulação formando uma massa densa (Figura 73A). Conidióforos são hialinos, eretos, septados, produzindo conídios no ápice, os quais permanecem em grupos ou cadeias, geralmente aderidos lado a lado, de forma característica. Os conídios são bicelulares, ovóides ou elipsóides, com dimensão de 12-18 x 8-10 μ m (Figura 73B).

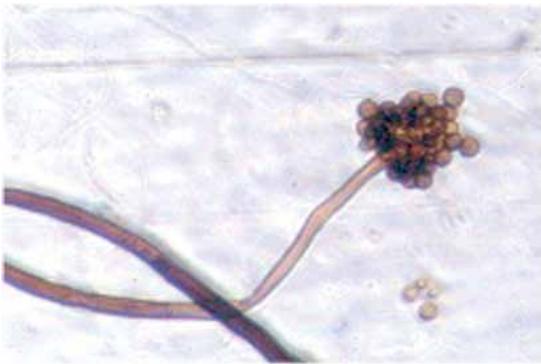
Periconia sp

Figura 74 - *Periconia* sp.

Conidióforos de *Periconia* sp., sobre as sementes, são longos, visíveis com baixa resolução, medindo se até 360 μ m de comprimento, frequentemente curvos, produzindo conídios lateralmente, abaixo do ápice setiforme. Conídios são esféricos, marrom claro, dimensão de 8 (10,4)15 μ m de diâmetro, verrugosos ou levemente equinulados (Figura 74).

5.2 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE BACTÉRIAS

Nesta seção são apresentados os métodos utilizados para a detecção de bactérias em sementes, bem como os métodos específicos para cada espécie.

5.2.1 Plantio de Sementes em Substrato Esterilizado

Fração ou número de sementes a ser analisada: 1.000 sementes.

Procedimento do teste: semear as sementes desinfestadas em substrato esterilizado (areia, solo, vermiculita e outros) de forma individualizada e incubar em câmara de crescimento a 25°-28°C.

Avaliação: a avaliação é realizada a partir da emergência das plântulas, observando-se a ocorrência ou não de sintomas característicos da infecção pelo patógeno alvo. A taxa de infecção é calculada com base no número de plântulas emergidas.

Confirmação dos resultados: é realizado o isolamento da bactéria e sua posterior identificação.

Observações gerais: permite determinar a porcentagem de transmissão do patógeno associado às sementes para a planta que ela originará, entretanto, não permite a detecção de bactérias em sementes não germinadas nem naquelas infectadas por uma quantidade de células bacterianas inferior à necessária para que a infecção se manifeste. É simples e não requer equipamento ou pessoal com treinamento específico, exceto para reconhecimento dos sintomas, detectando somente células viáveis e patogênicas, porém demorado, de baixa sensibilidade, utiliza grande espaço físico e é bem adaptado para organismos normalmente presentes em relativamente alto nível populacional ou porcentagem de sementes contaminadas (1 a 10%). Nesta forma de detecção existe a possibilidade de ocorrência de dispersão e disseminação secundária, o que pode levar a valores superestimados.

5.2.2 Inoculação em plantas susceptíveis

Fração ou número de sementes a ser analisada: 1000 sementes

Procedimento do teste: inocular plantas suscetíveis com extrato obtido pela imersão de sementes em água, solução salina ou tampão, seguida da observação dos sintomas desenvolvidos. Como forma de aumentar a sensibilidade desta técnica, é possível acrescentar alguns passos após a extração como o enriquecimento (crescimento de alíquota do extrato em meio de cultura líquido) e ou a concentração por centrifugação.

Avaliação: a avaliação é realizada observando-se a ocorrência ou não de sintomas característicos da infecção pelo patógeno alvo.

Confirmação dos resultados: é realizado o isolamento da bactéria e sua posterior identificação.

Observações gerais: a técnica é de fácil execução e permite a detecção somente de células viáveis, porém é demorada e exige a manutenção de plantas em estágio de desenvolvimento recomendado para a inoculação e sob condições ambientes controladas. É um método não quantitativo.

5.2.3 Plaqueamento em meio seletivo e semi-seletivo

Fração ou número de sementes a ser analisada: variável com a cultura.

Procedimento do teste: plaquear sementes ou o extrato obtido pela sua imersão em água, solução salina ou tampão, em meios seletivos ou semi-seletivos.

Avaliação: a avaliação é realizada observando-se colônias típicas do patógeno, e o resultado é expresso qualitativamente (presença ou ausência).

Confirmação dos resultados: testes bioquímicos, de patogenicidade, PCR, Imunofluorescência, ELISA, uso de bacteriófagos.

Observações gerais: permite o isolamento do patógeno, entretanto, é necessária a identificação posterior dos organismos isolados por testes bioquímicos, sorológicos ou de patogenicidade; muitos meios seletivos não são suficientemente seletivos para detectar todos os isolados do patógeno; é trabalhoso e requer tempo para incubação e confirmação da patogenicidade.

5.2.4 Registro de resultados

Os casos de resultados negativos (patógeno não detectado nas sub-amostras) deverão ser registrados em termos de padrão de tolerância e limite de detecção. O padrão de tolerância depende do número total de sementes testadas, n , e é aproximadamente $3/n$ ($P=0.95$); o limite de detecção por sub-amostra é equivalente ao limite de detecção por mL multiplicado pelo volume do extrato.

Nos casos de resultados positivos, o registro deve indicar o número médio de unidades formadoras de colônias (ufc) por semente e/ou o número de sub-amostras positivas do número total testado e o tamanho da amostra ou a probabilidade máxima estimada da proporção de sementes infestadas.

5.2.5 Métodos específicos para cada espécie

5.2.5.1 Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em *Brassica* spp. (ISTA)

Cultura: *Brassica* spp. (brócolis, repolho, couve, couve-flor)

Patógeno: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (podridão negra)

Preparado por: Roberts, S.J. e Koenraad, H.

Método

1 Extração: Suspende as sementes em solução salina (10 mL por 1.000 sementes) pré-resfriada (2-4°C) acrescida de Tween 20 (0,02% v/v) em um frasco cônico e agitar por 2,5 h à temperatura ambiente (20-25°C) em shaker orbital a 100-125 rpm.

2 Diluição e plaqueamento: Preparar a diluição em série fator 1:10 do extrato de sementes até a diluição 10^3 , pipetar 100 µl de cada diluição e do extrato não diluído em placas de cada um dos meios semi-seletivos (FS, mCS20ABN) e espalhar sobre a superfície com alça de Drigalski estéril. A seguir, incubar a 28-30°C e examinar após 3-4 d.

3 Controle positivo: Preparar a suspensão de um isolado conhecido de Xcc, em solução salina estéril e diluir o suficiente para obter 10^2 a 10^4 ufc/mL. A seguir, pipetar 100 µl das diluições apropriadas em placas contendo os meios semi-seletivos (FS, mCS20ABN) e espalhar sobre a superfície com alça de Drigalski estéril e incubar nas condições citadas acima.

4 Controle negativo: Preparar uma diluição em série de uma amostra da solução extratora (solução salina acrescida de Tween 20), sem sementes, e plaquear nos meios semi-seletivos como as amostras.

5 Avaliação: Examinar as placas das amostras para verificar a presença de colônias típicas de Xcc comparando-as com as placas do controle positivo.

Em meio FS após 3-4 d, as colônias de Xcc são pequenas, verde pálido, mucóides e circundadas por um halo de hidrólise de amido.

Após 3-4 d em meio mCS20ABN, as colônias de Xcc são de coloração amarelo palha, mucóides e circundadas por um halo de hidrólise de amido. As colônias podem variar no tamanho. Dependendo do número de colônias presentes, pode ser mais fácil avaliar as placas após 3 d, antes da coalescência dos halos de hidrólise de amido os quais podem tornar mais difícil a identificação das colônias suspeitas.

Registrar o número de colônias suspeitas e outras colônias.

6 Confirmação/identificação de colônias suspeitas: Repicar as colônias suspeitas em placas setoriadas contendo meio YDC. O número preciso de colônias repicadas dependerá do número e variabilidade de colônias suspeitas na placa: se presentes, pelo menos seis colônias deverão ser repicadas por sub-amostra.

Repicar o isolado do controle positivo em uma placa setoriada para comparação e incubar as placas por 24-48 h a 28-30°C.

Comparar o crescimento das colônias com o controle positivo. Em meio YDC as colônias de Xcc são de coloração amarelo palha e mucóide/fluidal.

Confirmar a identidade dos isolados pelo teste de patogenicidade em plântulas de Brássicas de susceptibilidade conhecida.

7 Teste de patogenicidade: Cultivar as plântulas de uma cultivar de brássicas susceptível a todas as raças de Xcc em pequenos vasos ou bandejas pelo menos até o estágio de 3-4 folhas verdadeiras.

Raspar uma pequena quantidade de crescimento bacteriano diretamente de uma cultura de 24-48 h YDC (placas setoriadas) com estilete ou alfinete entomológico esterilizados.

Inocular seis das nervuras principais no ponto perto das bordas nas duas folhas mais novas por ferimento com estilete ou alfinete entomológico.

O número de plantas a serem inoculadas dependerá da variabilidade da cultivar e experiência do operador, mas 1-3 plantas por isolado deve ser suficiente. É melhor inocular mais isolados com 1 planta por isolado do que menos isolados com 3 plantas por isolado.

Com estilete ou alfinete entomológico esterilizados inocular primeiro o controle negativo e depois o isolado do controle positivo e mantenha as plantas a 20-25°C.

Examinar as plantas para verificar o aparecimento de lesões típicas progressivas em forma de V, de coloração amarelo/necrótico com as nervuras escuras após 10-14 d. Sintomas podem ser visíveis antes dependendo da temperatura e agressividade do isolado. Compare com o controle positivo.

5.2.5.2 Detecção de *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* em *Daucus carota* (ISTA)

Método

1 Extração: Suspender as sementes em solução salina acrescida de Tween 20 (0,02% v/v) (10 mL por 1.000 sementes) em um frasco cônico, embeber as sub-amostras overnight (16-18 h) a 4-7°C e agitar por 5 min à temperatura ambiente (20-25°C) em shaker orbital a 200 rpm.

2 Diluição e plaqueamento: Agitar os frascos para homogeneizar antes da diluição, preparar a diluição em série fator 1:10 do extrato de sementes até a diluição 10^3 , pipetar 100 µl de cada diluição e do extrato não diluído em duas placas de cada um dos dois meios semi-seletivos escolhidos, ou meio MKM com o meio MD5A ou meio MKM com o meio mTBM, e espalhe sobre a superfície com alça de Drigalski estéril em seguida incubar com as placas do controle positivo a 28°C e examine após 4-8 dias.

3 Controle positivo: Preparar a suspensão de um isolado conhecido de Xhc, em solução salina estéril. Se utilizar uma cultura liofilizada, cultive pelo menos uma vez em meio não seletivo antes de usar para checar a viabilidade e morfologia, diluir o suficiente para obter aproximadamente 10^2 a 10^4 ufc/mL. Isto pode requerer acima de sete diluições em série de uma suspensão turbida, pipetar 100 µl das diluições apropriadas em placas contendo os meios semi-seletivos (MKM/MD5A ou MKM/mTBM) e espalhe sobre a superfície com alça de Drigalski estéril e incubar as placas controle e das amostras.

4 Controle negativo: Preparar a diluição em série de uma amostra da solução extratora (solução salina acrescida de Tween 20), sem sementes, e plaquear nos meios semi-seletivos como as amostras.

5 Avaliação: Examinar as placas dos controles positivo e negativo e as placas das amostras para verificar a presença de colônias típicas de Xhc comparando-as com as placas do controle positivo.

Em meio MKM após 4-6 d, as colônias de Xhc são de coloração creme amarelo clara, marrom claro a amarelo pêssego, brilhantes, arredondadas e com diâmetro de 2-4 mm.

Em meio MD5A após 7-8 d, as colônias de Xhc são de coloração amarelo palha, brilhantes, redondas e lisas, convexa com margens inteiras, diâmetro de 2-3 mm.

Em meio mTBM após 7-8 d, as colônias de Xhc são de coloração branca ou amarela ou, brilhantes, redondas, cremosas, convexas com margens inteiras, diâmetro de 1-2 mm e circundadas por uma zona clara da hidrólise de caseína. A hidrólise da caseína em meio mTBM nem sempre está presente.

O tamanho e a coloração das colônias podem diferir dentro de uma amostra.

Registrar o número de colônias suspeitas e outras colônias.

6 Confirmação/identificação de colônias suspeitas: Repicar as colônias suspeitas em placas setoriadas contendo meio YDC. Para evitar contaminação de isolados, use uma nova placa setoriada para cada sub-amostra. O número preciso de colônias repicadas dependerá do número e variabilidade de colônias suspeitas na placa: se presentes, pelo menos seis colônias deverão ser repicadas por sub-amostra.

Repicar o isolado controle positivo em uma placa setoriada para comparação em seguida incubar as placas setoriadas por 48-72 h a 28°C. Comparar o crescimento das colônias com o controle positivo. Em meio YDC as colônias de Xhc são de coloração amarelo palha e mucóides. Confirmar a identidade dos isolados pelo teste de patogenicidade em plântulas de cenoura de susceptibilidade conhecida ou por PCR e registrar os resultados para cada colônia repicada.

7 Teste de patogenicidade: Cultivar as plântulas de uma cultivar de cenoura susceptível a Xhc em pequenos vasos ou bandeja pelo menos até o estágio de 3-4 folhas verdadeiras (aproximadamente 3-4 semanas após o plantio). Preparar suspensões de cada cultura bacteriana suspeita cultivada em meio YDC em água de torneira esterilizada e dilua até a concentração aproximada de 2×10^6 ufc/mL. O mesmo procedimento deverá ser utilizado para o isolado do controle positivo. Após esta etapa, inocular as plantas, pulverizando-as até o ponto de escorrimento. Usar um pequeno vaso com 3-4 plantas por isolado. Incluir os controles positivo e negativo. É importante não esfregar as folhas após a pulverização, isto pode causar resultados falso-positivos.

Incubar as plantas inoculadas a 27-28°C em sacos plásticos fechados (para promover condições perto de 100% UR). Após 48 h, retire os sacos durante o dia e recoloque a noite.

Registrar os sintomas após 7-10 d de incubação. Sintomas típicos de *X. hortorum* pv. *carotae* aparecem primeiro como pequenas áreas irregulares encharcadas amareladas com uma delgada mancha marrom no centro nas folhas inoculadas. Posteriormente, as áreas afetadas aumentam, tornam-se marrons e são frequentemente circundadas por um halo amarelo. Comparar com o controle positivo.

8 Reação da Polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction - PCR): Preparar suspensões de células ligeiramente túrbidas (OD_{600nm} aproximadamente 0,05) em 1,0 mL de água destilada esterilizada das culturas suspeitas cultivadas em meio YDC e do controle positivo. Além disso, utilizar um isolado não suspeito como controle negativo. As suspensões podem ser armazenadas a -20°C até a identificação.

Usar os seguintes primers específicos de Xhc (Meng *et al.*, 2004):

3Sforw 5' CAT TCC AAG AAG CAG CCA 3'

3Srev 5' TCG CTC TTA ACA CCG TCA 3'

Os Primers Universais bacterianos devem ser utilizados para validar a reação de PCR. Estes primers darão um produto de tamanho de 441 bp (adaptado de Eden *et al.*, 1991) comparado com o produto de 355 bp dos primers específicos para Xhc.

1052F 5' GCA TGG TTG TCG TCA GCT CGT 3'

Bac R 5' TAC GGC TAC CTT GTT.ACG ACT T 3'

Preparar a reação de PCR. Conduza a reação de PCR na parede de tubos de microcentrífuga de 0,2 mL com um volume final de 10 µl (8 µl reação + 2 µl suspensão bacteriana).

Programa de PCR: incubação inicial de 5 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 15s a 94°C, 15s a 58°C e 30s a 72°C. Incubação final de 5 min a 72°C e 20 min a 20°C.

Submeter à eletroforese durante 1,5 h a 150V em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x (Tris Borate EDTA) colorido com brometo de etídeo 10 µl dos produtos da PCR. Incluir um marcador (ladder) de 100 bp.

Análise dos produtos amplificados: produto de 355 pb específico para Xhc e um produto universal bacteriano de 441 pb. Duas bandas (específica e universal) = identificação positiva; uma banda (universal) = identificação negativa; nenhuma banda = template bacteriano ausente, repetir reação.

5.2.5.3 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em algodão (*Gossypium hirsutum* L.)

Plantio de Sementes em Substrato Esterilizado (Halfon-Meiri & Volcani, 1981)

Método

1 Fração ou número de sementes a ser analisada: 6 repetições de 200 sementes

2 Procedimento do teste: Incubar 200 sementes em 60 mL de água destilada por 17 horas. Semear as sementes em areia úmida esterilizada, espaçamento de 1 x 3 cm. Verter o restante da água sobre as sementes antes de cobri-las com uma camada de 2 cm de areia úmida e incubar em câmara de crescimento a 25°-28°C e UR 80-90%.

3 Avaliação: A avaliação será realizada 10-14 dias após o plantio, observando-se as lesões típicas da bacteriose nas folhas cotiledonares (Figura 75). A taxa de infecção será calculada com base no número de plântulas emergidas.

4 Confirmação dos resultados: Isolamento em meio 523 de Kado e Heskett (1970)

Em meio 523 as colônias de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* são de coloração amarelas e mucóides (Figura 76).

Registrar os resultados para cada colônia repicada.

C.2 Plaqueamento de sementes em meio semi-seletivo (Mehta *et al.*, 2005)

Método

1 Fração ou número de sementes a ser analisada: 1.000 sementes.

2 Desinfestação superficial e plaqueamento das sementes: Desinfestar as sementes com álcool etílico 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2,5% por 4 minutos seguido de 3 lavagens com água esterilizada. Plaquear as sementes em placas de Petri contendo 15 mL de meio PSA (Mehta *et al.*, 2005). Em seguida, incubar com as placas do controle positivo.

3 Controle positivo (cultura ou material de referência): Preparar a suspensão de um isolado conhecido de Xam, em solução salina estéril. Diluir o suficiente para aproximadamente 10^2 a 10^4 ufc/mL. Pipetar 100 µL das diluições apropriadas em placas contendo o meio PSA (Mehta *et al.*, 2005) modificado e espalhe sobre a superfície com alça de Drigalski estéril. Em seguida incubar com as placas das amostras.

4 Avaliação: Examinar as placas periodicamente e examinar as placas do controle positivo. Dentro de 7 a 12 dias após a incubação, será observado se colônias típicas de Xam ao redor das sementes (Figura 79). Contar o número de sementes infectadas.

5 Confirmação/identificação de colônias suspeitas: Repicar as colônias suspeitas em placas setoriadas contendo meio 523 (Kado e Heskett, 1970). Repicar o isolado controle positivo em uma placa setoriada para comparação. Incubar placas setoriadas por 24-48 h a 28°C. Após incubação, comparar o crescimento das colônias com o controle positivo. Em meio 523 as colônias de Xam são de coloração amarela e mucóides (Figura 76).

Confirmar identidade dos isolados pelo teste de patogenicidade em plântulas de algodão de susceptibilidade conhecida.

Registrar os resultados para cada colônia repicada.

6 Teste de patogenicidade: Cultivar as plântulas de uma cultivar de algodão susceptível a Xam em pequenos vasos pelo menos até o estágio de 3-4 folhas verdadeiras (aproximadamente 3-4 semanas após o plantio). Preparar em água de torneira esterilizada a suspensão de cada cultura bacteriana suspeita cultivada em meio 523 e dilua a aproximadamente 2×10^6 ufc/mL. O mesmo procedimento deverá ser utilizado para o isolado controle positivo.

Inocular as plantas, pulverizando-as até o ponto de escorrimento. Use um pequeno vaso com 3-4 plantas por isolado. Incluir o controle positivo e um controle negativo. As plantas inoculadas serão incubadas a 27-28°C em sacos plásticos fechados (para promover condições perto de 100% UR). Após 24 h, retire os sacos e mantenha as plantas incubadas a 27-28°C.

Registrar os sintomas após 7-10 d de incubação. Sintomas típicos de Xam aparecem primeiro como pequenas áreas angulares encharcadas. Posteriormente, lesões angulares aumentam, tornam-se marrons (Figura 75). Comparar com o controle positivo.



Figura 75 - Lesões típicas causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em plântulas de algodão.

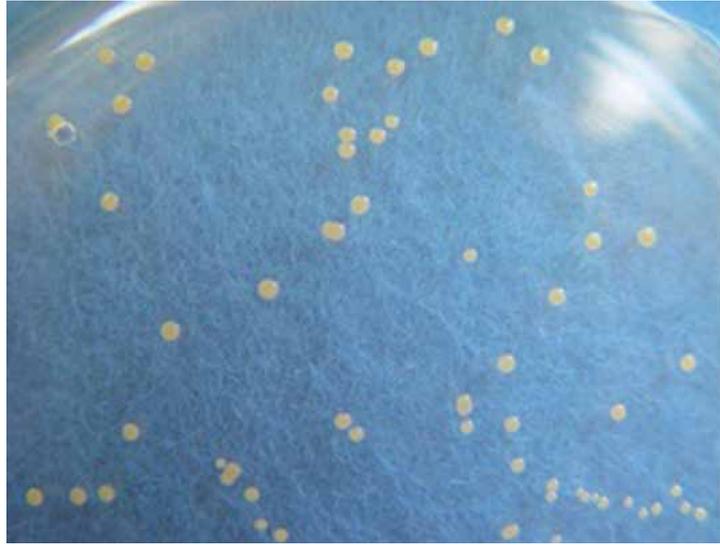


Figura 76 - Colônias típicas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em meio 523.

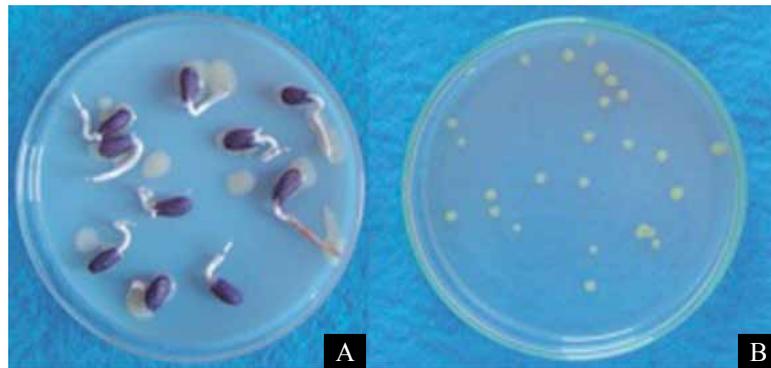


Figura 77 - *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em meio PSA: plaqueamento de sementes (a) e colônias (b) (Foto Barbosa, J.F.).

5.2.5.4 Detecção de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em tomate (*Lycopersicon esculentum*) – Workshop 1999

Método

1 Extração: Suspender as sementes (10.000 sementes - aprox. 24 g em 150mL) em tampão Tween fosfato-salino pré-resfriado (2-4°C) em um frasco cônico de 250mL fechado com parafilme. Saturar as sementes por 24 h a 4 °C.

2 Diluição e plaqueamento: Agitar o extrato (manualmente ou em um shaker) para homogeneizar completamente (~1 min) e permitir que as bactérias se estabeleçam (~10 min). Preparar duas diluições em série do extrato de sementes até diluição 10^2 .

Pipetar 100 µl de cada diluição e do extrato de sementes em placas contendo os meios SCM e mSCM e espalhe sobre a superfície com uma alça de Drigalski. Em seguida, incubar as placas a 27°C por 5-14 d.

3 Controle positivo: Preparar a suspensão de um isolado conhecido de Cmm em solução salina estéril. Diluir o suficiente para aproximadamente 10^2 a 10^4 ufc/mL. Em seguida, pipetar 100 µl das diluições apropriadas em placas contendo os meios SCM e mSCM e distribua sobre a superfície com uma alça de Drigalski. Incubar com as placas das amostras a 27°C por 5-14 d.

4 Exame das placas: Examinar as placas para a presença de colônias típicas de Cmm comparando-as com as placas do controle positivo no mesmo meio. Após 7 d em meio mSCM as colônias de Cmm são de coloração verde claro, mucóides, de 2-3 mm de diâmetro, translúcidas e facilmente distinguíveis de outras colônias mucóides pela presença de manchas escuras internas (pintas). À medida que o tempo de incubação aumenta, as colônias de Cmm tornam-se maiores e as manchas internas tornam-se amarelas enquanto outras colônias permanecem pequenas e não têm as manchas internas. Após 10 d em meio SCM as colônias de Cmm são grandes, de coloração cinza a preta, convexas, irregulares e mucóides com manchas internas pretas (Figura 78).

5 Confirmação/identificação de colônias suspeitas: Repicar as colônias suspeitas em placas setoriadas de YDC. O número preciso de colônias repicadas dependerá do número de colônias suspeitas, mas um número razoável é de seis a doze. Repicar o isolado controle positivo para uma placa setoriada para comparação. Incubar as placas setoriadas por 24-48 h a 27°C. Comparar a aparência dos isolados com o controle. Após 48 h as colônias de Cmm serão de coloração amarelo escuro, convexas, brilhantes e fluídas. Confirmar a identidade dos isolados pelo teste de patogenicidade em plântulas de tomate de susceptibilidade conhecida.

Registrar os resultados para cada colônia repicada.

6 Patogenicidade: Preparar uma suspensão túrbida (10^6 células/mL) em aproximadamente 5 mL de solução salina pela raspagem de uma pequena quantidade de crescimento bacteriano de 24-48 h em YDC (placas setoriadas). Cortar o caule de plântulas de tomate de 5 semanas bem acima dos cotilédones com um par de tesouras estéreis mergulhadas no inóculo (Fig. 79). Descartar a parte superior do caule. Inocular um isolado conhecido como controle positivo e solução salina estéril como controle negativo. Manter as plântulas a 25-27°C e em seguida observar os sintomas (murcha) após 7-11 dias.

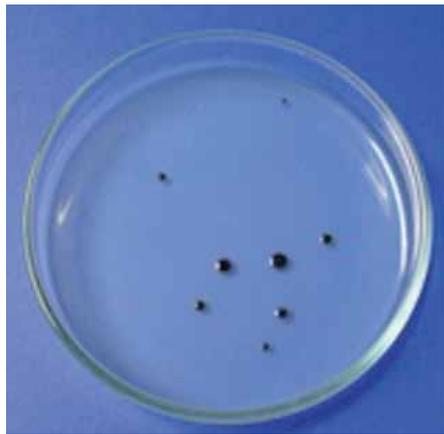


Figura 78 - Colônias de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em meio mSCM.



Figura 79 - Sintomas de murcha causados por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: a) muda proveniente de semente infectada; b) plântulas inoculadas por corte do caule com tesoura estéril mergulhada em suspensão do inóculo.

5.2.5.5 Detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Plantio de Sementes em Substrato Esterilizado (Jones, McCarter e Gitaitis, 1989)

Método

1. Extração: Semear as amostras (100 sementes) em vasos (bandejas) de plástico com mistura de solo esterilizada.

Observação: os vasos também deverão ser esterilizados e podem ser protegidos com plásticos ao redor para prevenir contaminação entre as amostras. Identificar devidamente os vasos de acordo com as amostras. Incubar os vasos semeados em câmaras de crescimento a 18-20°C.

Observação: esta temperatura é ótima para o desenvolvimento da doença. Em baixas temperaturas a germinação mais lenta permite que a bactéria se multiplique ao nível para causar doença. Quando as plantas estiverem no estágio de folhas verdadeiras e depois com 6-7 cm de altura, incube-as em sacos plásticos fechados (para promover condições perto de 100% UR) por 36 h.

2. Detecção

Manter as plantas em câmara de crescimento durante 4 semanas e examina-las à procura de sintomas típicos da mancha bacteriana nos cotilédones e nas primeiras folhas verdadeiras 7 dias após a emergência ou em outros casos, somente após a câmara úmida.

Observação: o número de lesões nas plântulas varia com o grau da contaminação das sementes; a quantidade de lesões permite a estimativa semi-quantitativa do nível de contaminação.

Para confirmar que Pst é o agente causal dos sintomas observados, lesões representativas são trituradas separadamente em gotas de água destilada esterilizada, plaqueadas em meio King B pelo método de estrias e as colônias fluorescentes identificadas. Testes utilizados para confirmar Pst: reação de oxidase, atividade arginina dihidrolase, HR em fumo, utilização de erythritol, D(-)-tartarato e DL-lactate, e atividade de nucleação em gelo. Como confirmação final, plantas de tomate susceptíveis serão inoculadas com isolados capazes de produzir sintomas típicos da doença associada com Pst.

Lotes de sementes com resultado positivo devem ser reavaliados para confirmação ou obtenção de resultados adicionais quantitativos de infestação de sementes.

Avaliação

Lesões causadas por Pst ou *P. syringae* pv. *syringae* produzem reação de fluorescência positiva. Lesões infectadas com *X. vesicatoria* ou lesões não originadas de bactérias são negativas para fluorescência.

Após a incubação, as placas serão checadas à procura de colônias fluorescentes. Colônias fluorescentes em meio King B e DL-lactato não são Pst. Colônias fluorescentes em meio King B, mas não no meio DL-lactate são transferidas para testes posteriores.

Os isolados negativos para oxidase serão testados posteriormente e os oxidase positiva serão descartados. Os isolados que induzirem HR em fumo e utilizarem sucrose e D(-) tartarato, mas não erythritol ou DL-lactate e forem negativos para atividade arginina dihidrolase são identificados como Pst. Para confirmar a identidade destes isolados, deve-se fazer o teste de patogenicidade. Os isolados que reproduzirem lesões da mancha bacteriana em tomate são confirmados como Pst.

Plaqueamento em meio semi-seletivo (Soares, Valarini e Menten, 2001)

Método

1 Extração: Suspender as sementes em tampão PBS Tween 0,05 M em um frasco cônico. O volume de solução salina deve ser ajustado de acordo com o número de sementes utilizado (proporção de 3:1 - v:w). Embeber as sub-amostras por 16-18 h a 4°C.

2 Diluição e plaqueamento: Agitar os frascos para homogeneizar antes da diluição. Preparar a diluição em série do extrato de sementes até a diluição 10^3 . Pipetar 100 μ l de cada diluição e do extrato não diluído em duas placas do meio King B modificado e espalhe sobre a superfície com alça de Drigalski estéril. Incubar com as placas do controle positivo a 28°C e examine após 4-8 d.

3 Controle positivo (cultura ou material de referência): Preparar a suspensão de um isolado conhecido de Pst, em solução salina estéril. Se utilizar cultura liofilizada, cultivar pelo menos uma vez em meio não seletivo antes para checar a viabilidade e morfologia.

Diluir o suficiente para aproximadamente 10^2 a 10^4 ufc/mL. Isto pode requerer acima de sete diluições em série de uma suspensão turbida.

Pipetar 100 μ l das diluições apropriadas em placas contendo o meio semi-seletivo (mKing B) e espalhe sobre a superfície com alça de Drigalski estéril. Em seguida incubar com as placas das amostras.

4 Controle negativo: Preparar a diluição em série de uma amostra da solução extratora (solução salina acrescida de Tween 20), sem sementes, e plaquear nos meio semi-seletivos como as amostras.

5 Avaliação: Examinar as placas dos controles positivo e negativo e as placas das amostras para verificar a presença de colônias típicas de Pst comparando-as com as placas do controle positivo.

Em meio mKing B após 4-6 d, as colônias de Pst ficaram de coloração branca (Figura 80).

Registrar o número de colônias suspeitas e outras colônias.

6 Confirmação/identificação de colônias suspeitas: Repicar as colônias suspeitas em placas setoriadas contendo meio King B. O número preciso de colônias repicadas dependerá do número e variabilidade de colônias suspeitas na placa: se presentes, pelo menos seis colônias deverão ser repicadas por sub-amostra. Repicar o isolado controle positivo em uma placa setoriada para comparação. Incubar as placas setoriadas por 48-72 h a 28°C. Comparar o crescimento das colônias com o controle positivo. Em meio King B as colônias de Pst são de coloração branca.

Confirmar a identidade dos isolados pelo teste de patogenicidade em plântulas de tomate de susceptibilidade conhecida e registrar os resultados para cada colônia repicada.

7 Teste de patogenicidade: Cultivar as plântulas de uma cultivar de tomate susceptível a Pst em pequenos vasos ou bandeja pelo menos até o estágio de 3-4 folhas verdadeiras (aproximadamente 3-4 semanas após o plantio). Preparar a suspensão em água de torneira esterilizada de cada cultura bacteriana suspeita cultivada em meio King B e dilua à concentração contendo aproximadamente 2×10^6 ufc/mL. O mesmo procedimento deve ser utilizado para o isolado controle positivo. Inocular as plantas, pulverizando-as até o ponto de escorrimento. Usar um pequeno vaso com 3-4 plantas por isolado. Incluir os controles positivo e negativo. É importante não esfregar as folhas após a pulverização, isto pode causar resultados falso-positivos.

Incubar as plantas inoculadas a 27-28°C em sacos plásticos fechados (para promover condições perto de 100% UR). Após 48 h, retire os sacos durante o dia e recoloque a noite.

Registrar os sintomas após 7-10 d de incubação. Sintomas típicos de Pst aparecem primeiro como pequenas áreas irregulares encharcadas. Posteriormente, as áreas afetadas aumentam, tornam-se marrons e são frequentemente circundadas por um halo amarelo. Comparar com o controle positivo.



Figura 80 - Colônias de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em meio mKing B.

5.2.5.6 Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em tomate (*Lycopersicon esculentum*) - ISHI-Veg

Método

1. Extração: Suspender as sementes em tampão PBS Tween 0,05 M em um frasco cônico. O volume de solução salina deve ser ajustado de acordo com o número de sementes utilizado (proporção de 3:1 - v:w).

Embeber as sub-amostras por 16-18 h a 4°C.

2 Diluição e plaqueamento: Agitar os frascos para homogeneizar antes da diluição. Preparar as diluições em série do extrato de sementes até 10^3 . Pipetar 100 µl das diluições 10^{-1} e 10^{-2} e do extrato não diluído em duas placas de um dos meios semi-seletivos (mTBM, CKTM e TAM) e espalhar sobre a superfície com alça de Drigalski estéril. Em seguida, incubar com as placas do controle positivo a 26-28°C no escuro e examine após 4-8 d.

3 Controle positivo (cultura ou material de referência): Preparar a suspensão de um isolado conhecido de Xcv, em solução salina estéril. Diluir o suficiente para obter diluições que contenham aproximadamente 10^2 a 10^4 ufc/mL. Pipetar 100 µl das diluições apropriadas em placas contendo os meios semi-seletivos (mTBM, CKTM ou TAM) e espalhar sobre a superfície com alça de Drigalski estéril. Incubar as placas com as das amostras (Figura 81).

4 Controle negativo: Preparar a diluição em série de uma amostra da solução extratora (tampão PBS Tween 0,05 M), sem sementes, e plaquear nos meio semi-seletivos como as amostras.

5 Avaliação: Examinar as placas dos controles positivo e negativo aos 3, 5 e 7 dias e as placas das amostras para verificar a presença de colônias típicas Xcv comparando-as com as placas do controle positivo.

As colônias de Xcv em meio mTMB, CKTM e TAM aparecem tipicamente em 4-7 dias e podem ser identificadas apresentando-se amarelas, levemente mucóides e arredondadas (circulares). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* utiliza tween e em 3-7 dias um halo branco cristalino geralmente é formado ao redor da colônia amarela. Alguns isolados de Xcv formam apenas um fraco halo, halo claro ou apenas clareia o meio abaixo da colônia (não visível). (NOTA: halo branco cristalino é devido ao cálcio depositado no halo claro causado pela utilização do tween).

O tamanho e a coloração das colônias podem diferir dentro de uma amostra.

Registrar o número de colônias suspeitas e outras colônias.

6 Confirmação/identificação de colônias suspeitas: Repicar as colônias suspeitas em placas setoriadas contendo meio YDC. O número preciso de colônias repicadas dependerá do número e variabilidade de colônias suspeitas na placa: se presentes, pelo menos seis colônias deverão ser repicadas por sub-amostra. Repicar o isolado controle positivo em uma placa setoriada para comparação. Em seguida incubar as placas setoriadas por 24-48 h a 28°C.

Comparar o crescimento das colônias com o controle positivo.

Confirmar a identidade dos isolados pelo teste de patogenicidade em plântulas de tomate de susceptibilidade conhecida. Testes de confirmação adicionais como ELISA, PCR, IF ou testes bioquímicos são opcionais.

Registrar os resultados para cada colônia repicada.

7 Teste de patogenicidade: Cultivar as plântulas de uma cultivar de tomate susceptível a Xcv em pequenos vasos ou bandeja pelo menos até o estágio de 2-3 folhas verdadeiras (aproximadamente 3-4 semanas após o plantio). Preparar a suspensão em água de torneira esterilizada de cada cultura bacteriana suspeita cultivada em meio YDC e diluir à concentração de aproximadamente 10^8 ufc/mL (0,1 to 0,2 o.d. at 600 nm). O mesmo procedimento deverá ser utilizado para o isolado controle positivo.

Infiltrar a folha de uma cultivar susceptível de pimentão/tomate com a suspensão forçando delicadamente o líquido na sua superfície inferior utilizando uma seringa estéril sem agulha e marque a folha com o número de identificação da amostra. Fazer testes de patogenicidade de pelo menos cinco colônias suspeitas de Xcv purificadas por repetição. Incluir os controles positivo e negativo.

Incubar as plantas inoculadas a 90-100% de umidade relativa e a 27-32°C com 8-12 h de luz. Observar as plantas diariamente e registre o dia em que as lesões encharcadas aparecem. Geralmente, isolados patogênicos de Xcv desenvolvem uma lesão encharcada dentro de 48-96 h.

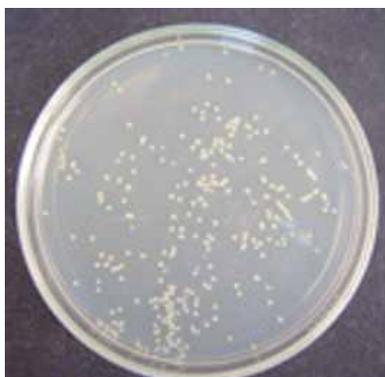


Figura 81 - Colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em meio TAM.

5.2.5.7 Detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*)

Cultura: feijão (*Phaseolus vulgaris*)

Patógeno: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff)

Método

1 Extração: Suspender as sementes em solução salina em um frasco cônico. O volume de solução salina deverá ser ajustado de acordo com o número de sementes utilizado (500 mL por 1.000 sementes). Embeber as sub-amostras por 16-18 h a 4°C.

2 Diluição e plaqueamento: Agitar os frascos para homogeneizar antes da diluição. Preparar diluições em série do extrato de sementes (10^1 , 10^2 e 10^3). Pipetar 100 µl de cada diluição e do extrato não diluído em duas placas contendo o meio CNS e espalhe sobre a superfície com alça de Drigalski estéril.

Incubar junto às placas do controle positivo a 28°C e examine após 4-8 d.

3 Controle positivo: Preparar a suspensão de um isolado conhecido de Cff, em solução salina estéril. Diluir o suficiente para obter aproximadamente 10^2 a 10^4 ufc/mL. Pipetar 100 µl das diluições apropriadas em placas contendo o meio CNS e espalhe sobre a superfície com alça de Drigalski estéril.

Incubar as placas junto àquelas das amostras.

4 Controle negativo: Preparar a diluição em série de uma amostra da solução extratora (solução salina), sem sementes, e plaquear nos meio semi-seletivos como as amostras.

5 Avaliação: Examinar as placas dos controles positivo e negativo e exanimar as placas das amostras para verificar a presença de colônias típicas de Cff comparando-as com as placas do controle positivo (Figura 82).

O tamanho e a coloração das colônias podem diferir dentro de uma amostra.

Registrar o número de colônias suspeitas e outras colônias.

6 Confirmação/identificação de colônias suspeitas: Repicar as colônias suspeitas em placas setoriadas contendo meio 523. Repicar o isolado controle positivo em uma placa setoriada para comparação. Incubar as placas setoriadas por 48-72 h a 28°C.

Comparar o crescimento das colônias com o controle positivo. Em meio 523 as colônias de Cff amarelo alaranjadas ou também amarelo claro. Confirmar a identidade dos isolados pelo teste de patogenicidade em plântulas de feijão de susceptibilidade conhecida ou por PCR.

Registrar os resultados para cada colônia repicada.

7 Teste de patogenicidade: Cultivar as plântulas de uma cultivar de feijão susceptível a Cff em pequenos vasos ou bandeja por 14 dias. Preparar a suspensão em água de torneira esterilizada de cada cultura bacteriana suspeita cultivada em meio 523 e dilua à concentração de aproximadamente 2×10^6 ufc/mL. O mesmo procedimento deverá ser utilizado para o isolado controle positivo.

Inocular as plantas, introduzindo a agulha umedecida nas colônias bacterianas no caule da planta. Usar um pequeno vaso com 3-4 plantas por isolado. Incluir o controle positivo e um controle negativo.

Incubar as plantas inoculadas a 27-28°C até o aparecimento dos sintomas e comparar com o controle positivo.

8 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR): Fazer a suspensão de células ligeiramente turbida (OD_{600nm} aproximadamente 0,05) em 1,0 mL de água destilada esterilizada das culturas suspeitas cultivadas em meio 523 e do controle positivo. Incluir um isolado não suspeito como controle negativo. As suspensões poderão ser armazenadas a -20°C até a identificação.

Usar os seguintes primers específicos para Cff (Guimarães et al., 2001):

CF4 forward 5'-CACAGCCACCTACATGC 3'

CF5 reverse 5'- ATCGGGAGTCCGAG 3'

Preparar a reação de PCR. Conduzir a reação de PCR na parede de tubos de microcentrifuga de 0,2 mL com um volume final de 50 µl (45 µl reação + 5 µl suspensão bacteriana).

Programa de PCR: incubação inicial de 2 min a 96°C seguido por 34 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 55°C e 30s a 72°C. Incubação final de 10 min a 72°C.

Colocar 10 µl dos produtos de PCR por eletroforese durante 1,5 h a 150V em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x (Tris Borate EDTA) colorido com brometo de etídeo. Incluir um marcador (ladder) de 100 bp.

Estes primers geram um produto de 198 pb específico para Cff (Figura 83).

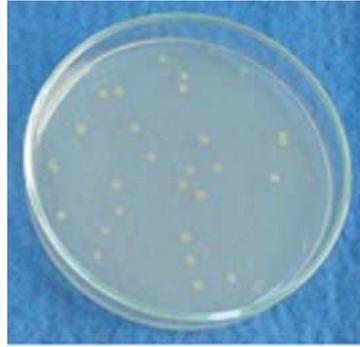


Figura 82 - Colônias de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em meio CNS.

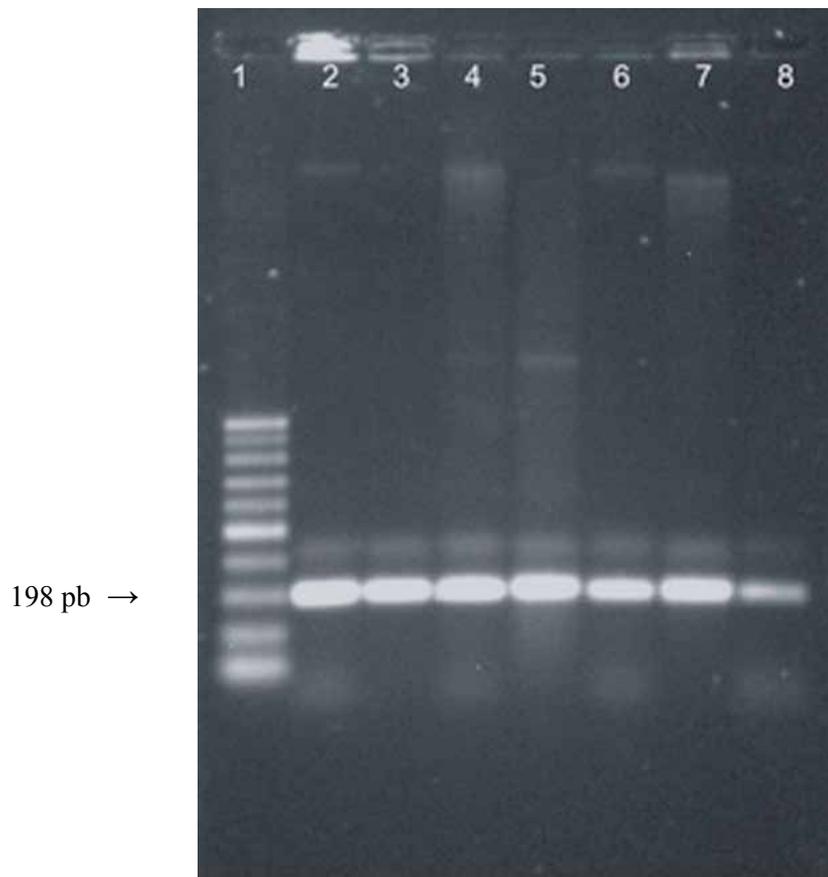


Figura 83 - Análise eletroforética em gel de agarose (1%) dos produtos amplificados por PCR para confirmação da identidade dos isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* utilizando-se os primers descritos por Guimaraes et al. (2001). Legenda: 1 marcador; 2 isolado SP (São Paulo); 3 isolado SC (Santa Catarina); 4 DF (Distrito Federal); 5 isolado PR (Paraná); 6 isolado GO (Goiás); 7 isolado MG (Minas Gerais); 8 isolado Unai.

5.2.5.8 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijão (*Phaseolus vulgaris*) – Workshop 1999; Kobayashi, 2002.

Método

1 Extração: Suspender 1000 sementes em 600 mL de água destilada esterelizada em um frasco cônico.

Embeber as sub-amostras por 16-18 h a 4°C.

2 Plaqueamento: Agitar os frascos para homogeneizar antes da diluição. Preparar a diluição em série do extrato de sementes (diluição 10^1 , 10^2 e 10^3). Pipetar 100 µL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} e do extrato não diluído em duas placas de um dos dois meios semi-seletivos (meio XCP1 e meio MT) e espalhar sobre a superfície com alça de Drigalski estéril. Em seguida, incubar com as placas do controle positivo a 26-28°C no escuro e examine após 3 d.

3 Identificação preliminar da bactéria: As colônias de Xap no meio XCP1 são amarelas, mucóides, lisas, convexas e circundadas por zonas de hidrólise de amido. Em meio MT, as colônias são amarelas, circulares, não fluorescentes e circundadas por 2 zonas de hidrólise: uma maior, clara, correspondente à hidrólise de caseína e uma menor, leitosa (láctea), à lipólise de Tween 80. As variantes fuscans podem produzir pigmento marrom, solúvel em água em meio MT (Figura 84).

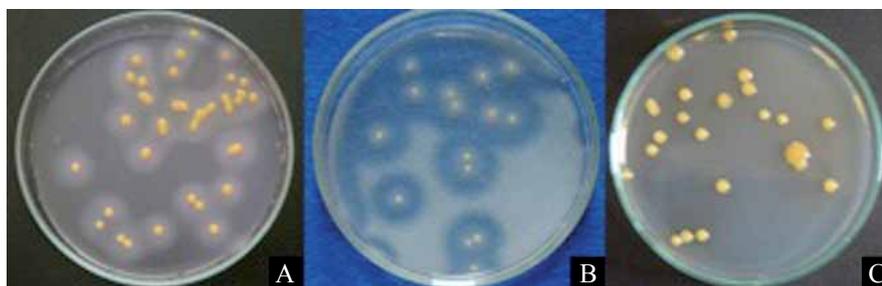


Figura 84 - Colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* formadas a partir de extratos de sementes de feijão naturalmente infectadas, 6 dias após o plaqueamento. A e B) meios de cultura semi-seletivos XCP1 e MT, respectivamente; C) meio de cultura não seletivo 523. Lavras – MG, 2005. (Foto Tebaldi, N.D.)

4 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR): Preparar as suspensões de células, ligeiramente túrbida (OD_{600nm} aproximadamente 0,05), das culturas suspeitas e do controle positivo cultivadas em meio YDC em 1,0 mL de água destilada esterilizada. Preparar também um isolado não suspeito como controle negativo. As suspensões podem ser armazenadas a -20°C até a identificação.

Usar os seguintes primers específicos para Xap (Audy *et al.*, 1994):

X4c (5'-GGCAACACCCGATCCCTAAAACAGG-3')

X4e (5'-CGCCGGAAGCACGATCCTCGAAG-3')

Preparar a reação de PCR. Conduza a reação de PCR na parede de tubos de microcentrífuga de 0,2 mL com um volume final de 10 µl (8 µl reação + 2 µl suspensão bacteriana).

Programa de PCR: 94°C/2 min., 25 ciclos de 94 °C/1 min., 58 °C/1 min., 72 °C/2 min. e extensão final a 72 °C/8 min. (Schaad *et al.*, 1995, modificado). Colocar 10 µl dos produtos de PCR por eletroforese durante 1,5 h a 150V em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x (Tris Borate EDTA) colorido com brometo de etídeo. Incluir um marcador (ladder) de 100 bp. Estes primers geram um produto de tamanho de 730 pb específico para Xap (Figura 85).

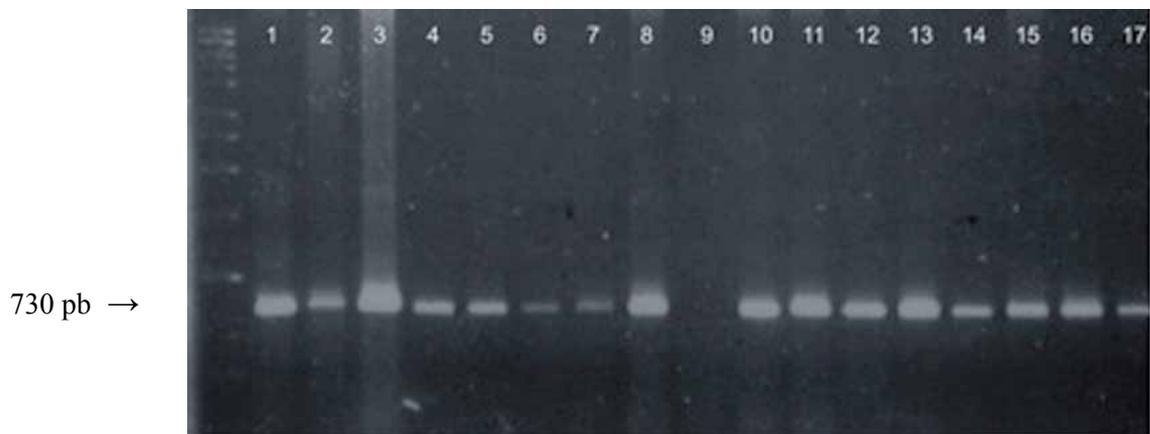


Figura 85 - Análise eletroforética em gel de agarose (0,9%) dos produtos amplificados pela Bio-PCR para detecção do número de colônias características de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e de microrganismos contaminantes obtidos dos extratos de sementes de feijão, cultivar Carioca. UFLA, Lavras – MG, 2002. M = DNA Marker (Pharmacia Biotech); 1 = C18; 2 = C20; 3 = C23; 4 = C25; 5 = C27; 6 = C28; 7 = C29; 8 = C31; 9 = C32; 10 = C34; 11 = C35; 12 = C36; 13 = C37; 14 = C38, 15 = C39, 16 = C40, 17 = C41. (Foto Kobayasti, L.).

5. Inoculação do hospedeiro: Adicionar uma quantia de crescimento bacteriano com uma alça de platina em um tubo com meio nutriente líquido e misture bem. Usando uma seringa hipodérmica de 1 mL, puxar uma amostra desta suspensão. Inserir a agulha no caule de uma plântula de feijão de 7-10 dias, bem abaixo das primeiras folhas verdadeiras de forma que a agulha saia no outro lado.

Após retirar a agulha injetar lentamente o inóculo dentro da plântula. Uma gota de inóculo deve estar aparente em cada local do ferimento. Repetir todo o procedimento, inoculando primeiro 6 plantas com meio nutriente líquido estéril, como controle negativo, e 6 plantas com os isolados conhecidos de Xap, como controle positivo.

Incubar as plantas em câmara de crescimento por 7-10 dias. Sintomas típicos da bacteriose são lesões deprimidas, encharcadas no local do ferimento onde a bactéria está abundante e lesões em folhas, começando pelas mais baixas. Zonas necróticas amarelas desenvolverão, escurecendo do centro (Figura 86).



Figura 86 - Lesões típicas do crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em plantas de feijão. (Foto Kobayashi, L.).

ANEXOS

NOTAS:

Preparo de antibióticos

- A atividade (unidades/mg) de alguns antibióticos pode variar entre grupos. É necessário ajustar o peso ou volume adicionado para assegurar que o volume final de unidades por litro de meio seja consistente.
- Todas as medidas dos antibióticos são baseadas no peso do ingrediente ativo. Cuidado ao calcular a quantidade requerida da solução estoque do produto para dar a quantidade desejada do ingrediente ativo (ex: Tobramycin).

Armazenamento

- Armazene as placas invertidas em sacos de polietileno a 4°C e use dentro de duas semanas do preparo para assegurar a atividade dos antibióticos.
- Dependendo da fonte de amido, armazenar em geladeira por vários dias antes de usar pode resultar em zonas de hidrólise de amido mais visíveis.

Anexo 1

Solução salina esterilizada		
Reagente	g/L	g/500 mL
Cloreto de sódio (NaCl)	8,5	4,25
Água destilada	1000 mL	500 mL

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes dentro de um recipiente.
- 2 Adicione 1000 mL (ou 500 mL) de água destilada.
- 3 Para extração de sementes, adicione 200 µl de Tween 20 estéril por 1000 mL.
- 4 Dissolva e distribua em recipientes.
- 5 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.

Armazenamento

Contanto que os recipientes estejam bem fechados, podem ser armazenados por vários meses antes de usar.

Anexo 2

Meio YDC (Yeast Extract Dextrose Chalk) (Schaad, 1988)		
Reagente	g/L	g/500 mL
Bacto Agar	17,0	8,5
Extrato de levedura	10,0	5,0
CaCO ₃ (pó fino)	20,0	10,0
D-Glucose (Dextrose)	20,0	10,0
Água destilada	1000 mL	500 mL

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes dentro de um recipiente grande (250 mL de meio em um frasco de 500 mL) que permita misturar o meio antes de vertê-lo.
- 2 Adicione 1000 mL (ou 500 mL) de água destilada.
- 3 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.
- 4 Deixe o meio esfriar até aproximadamente 50°C.
- 5 Agite levemente para assegurar a distribuição do CaCO₃ e evitar bolhas de ar e verta o meio nas placas (22 mL por placa de 9,0 cm).
- 6 Deixe as placas secarem em câmara de fluxo laminar antes de usar.

Anexo 3

Meio FS ágar (Schaad, 1989).		
Reagente	g/L	g/500 mL
Bacto Agar	15,0	7,5
Amido solúvel (Aldrich No 17,993-0) (CCP)	10,0	5,0
Bacto extrato de levedura (Difco)	0,1	0,05
K ₂ HPO ₄	0,8	0,4
KH ₂ PO ₄	0,8	0,4
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,05
Methyl Green (1% aq.)	1,5 mL	0,75 mL
Água destilada	1000 mL	500 mL
Cycloheximida ^a (200 mg/mL álcool 70%)	200 mg (1 mL)	100 mg (0,5 mL)
D-methionina ^b (3 mg/mL álcool 50%)	3 mg (1 mL)	1,5 mg (0,5 mL)
Pyridoxina-HCl ^c (1 mg/mL álcool 50%)	1 mg (1 mL)	0,5 mg (0,5 mL)
Cephalexina ^d (50 mg/mL álcool 70%)	50 mg (1 mL)	25 mg (0,5 mL)
Gentamicina ^e (1 mg/mL água)	0,4 mg (0,4 mL)	0,2 mg (0,2 mL)
Trimethoprima ^f (10 mg/mL álcool 70%)	30 mg (3 mL)	15 mg (1,5 mL)

^{a, b, c, d, e, f} Adicionar após a autoclavagem

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes, exceto os antibióticos e metionina dentro de um recipiente.
2. Adicione 1000 mL (ou 500 mL) de água destilada.
- 3 Cozinhe no vapor para dissolver.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.
- 5 Prepare as soluções de antibióticos e metionina.
- 6 Deixe o meio esfriar até aproximadamente 50°C antes de adicionar as soluções de antibióticos e metionina.
- 7 Misture completamente, mas de forma suave através de inversão e rodando para evitar a formação de bolhas e verta o meio nas placas (22 mL por placa de 9,0 cm).
- 8 Deixe as placas secarem em câmara de fluxo laminar antes de usar.

Antibióticos e outras adições

- ^a Dissolva 2 g de cycloheximida em 10 mL de álcool 70%. Adicione 1 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ^b Dissolva 60 mg de D-methionina em 10 mL de água destilada, então adicione 10 mL de etanol. Adicione 1,0 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ^c Dissolva 20 mg de pyridoxina em 20 mL de álcool 50%. Adicione 1,0 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ^d Dissolva 500 mg de cephalexina em 10 mL de álcool 70%. Adicione 1,0 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ^e Dissolva 10 mg de gentamicina em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 0,4 mL/L (0,2 mL/500 mL).
- ^f Dissolva/suspenda 200 mg de trimethoprim em 20 mL de álcool 70%. Como este produto não pode dissolver totalmente, é necessário agitar a suspensão em vortex imediatamente antes de adicioná-la ao meio (3 mL/L ou 1,5 mL/500 mL).

Anexo 4

Meio mCS20ABN agar		
Reagente	g/L	g/500 mL
Peptona de soja (Oxoid L44)	2,0	1,0
Bacto Triptona (Difco Bacto)	2,0	1,0
KH ₂ PO ₄	1,59	0,79
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,33	0,17
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4	0,2
L-Glutamina (Sigma G-3126)	6,0	3,0
L-Histidina (Sigma H-8000)	1,0	0,5
D-Glucose (Dextrose)	1,0	0,5
Água destilada	1000 mL	500 mL
Amido solúvel (Aldrich No 17,993-0)	25,0	12,5
Bacto Agar (Difco)	15,0	7,5
Cycloheximida ^a (200 mg/mL álcool 70%)	200 mg (1 mL)	100 mg (0,5 mL)
Neomycina ^b (40 mg/mL álcool 20%)	40 mg (1 mL)	20 mg (0,5 mL)
Bacitracina ^c (100 mg/mL álcool 50%)	100 mg (1 mL)	50 mg (0,5 mL)

^{a, b, c} Adicionar após autoclavagem

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes, exceto ágar, amido e antibióticos dentro de um recipiente.
- 2 Adicione 1000 mL (ou 500 mL) de água destilada.
- 3 Dissolva e cheque pH o qual deve ser 6,5, ajuste se necessário.
- 4 Adicione o amido e ágar e cozinhe em vapor para dissolver.
- 5 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.
- 6 Prepare as soluções de antibióticos.
- 7 Deixe o meio esfriar até aproximadamente 50°C e adicione as soluções de antibióticos.
- 8 Misture completamente, mas suavemente através de inversão e rodando para evitar bolhas e verta o meio nas placas (22 mL por placa de 9,0 cm).
- 9 Deixe as placas secarem em câmara de fluxo laminar antes de usar.

Antibióticos

- ^a Dissolva 2,0 g de cycloheximide (Sigma C-7698) em 10 mL de álcool 70%. Adicione 1 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ^b Dissolva 400 mg de neomycina (Sigma N-1876) em 10 mL de álcool 20%. Adicione 1 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ^c Dissolva 1,0 g bacitracina (Sigma B-0125, 66k unidades/g) em 10 mL de álcool 50%. Adicione 1,0 mL/L (0,5 mL/500 mL).

Anexo 5

Meio MKM agar		
Reagente	g/L	g/500 mL
NH ₄ Cl	1,0	0,5
K ₂ HPO ₄	1,2	0,6
KH ₂ PO ₄	1,2	0,6
Lactose monohidratada	10,0	5,0
D(+) trealose dihidratada	4,0	2,0
Extrato de levedura	0,5	0,25
2- Acid Thiobarbiturico	0,2	0,1
Bacto agar	17,0	8,5
Sulfato de Tobramycina ^a	0,002	0,001
Cephalexina monohidratada ^b	0,010	0,005
Bacitracina ^c	0,050	0,025
Nystatina ^d	0,035	0,018

^{a, b, c, d} Adicionar após autoclavagem

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes, exceto os antibióticos dentro de um recipiente.
- 2 Adicione 1000 mL (ou 500 mL) de água destilada.
- 3 Dissolva e cheque o pH o qual deve ser 6,6.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.
- 5 Prepare as soluções de antibióticos.
- 6 Deixe o meio esfriar até aproximadamente 50°C e adicione as soluções de antibióticos.
- 7 Misture completamente, mas suavemente através de inversão/rodando para evitar bolhas e verta o meio nas placas (22 mL por placa de 9,0 cm).
- 8 Deixe as placas secarem em câmara de fluxo laminar antes de usar.

Antibióticos e outras adições

- ^a Dissolva 20 mg de sulfato de tobramycina (Sigma T-1783 ou Duchefa T-0153) em 10 mL de álcool 70%. Adicione 1 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ^b Dissolva 200 mg de cephalexina monohidratada (Sigma C-4895) em 10 mL de álcool 70%. Adicione 0,5 mL/L (0,25 mL/500 mL).
- ^c Dissolva 500 mg de bacitracina (Sigma B-0125 66K unidades/g ou Duchefa B-0106, 70 K unidades/g) em 10 mL de álcool 70%. Adicione 1,0 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ^d Dissolva 100 mg de nystatina (Sigma N-3503, Duchefa N-0138) em 10 mL de álcool 70%. Adicione 3,5 mL/L (1,75 mL/500 mL). Use 100 mg/L de cyclohexamida, ao invés de nystatina, quando o crescimento de fungos no meio seletivo não for completamente inibido por 35 mg/L de nystatina.

Anexo 6

Meio MD5A ágar (Cubeta e Kuan, 1986)		
Reagente	g/L	g/500 mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	0,15
NaH ₂ PO ₄	1,0	0,5
NH ₄ Cl	1,0	0,5
K ₂ HPO ₄	3,0	1,5
Bacto agar	17,0	8,5
Celobiose ^a	10,0	5,0
Ácido L-glutâmico ^b	0,005	0,0025
L-metionina ^c	0,001	0,0005
Cephalexina monohidratada ^d	0,01	0,005
Bacitracina ^e	0,01	0,005
Nystatina ^f	0,035	0,018

^{a, b, c, d, e, f} Adicionar após a autoclavagem

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes, exceto os antibióticos, ácido L-glutâmico, L-metionina e celobiose dentro de um recipiente.
- 2 Adicione 900 mL (ou 450 mL) de água destilada.
- 3 Dissolva e cheque pH o qual deve ser 6,4, ajuste se necessário.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.
- 5 Prepare as soluções de antibióticos, ácido L-glutâmico, L-metionina e celobiose.
- 6 Deixe o meio esfriar até aproximadamente 50°C antes de adicionar as soluções.
- 7 Misture completamente mas suavemente através de inversão/rodando para evitar formação de bolhas e verta o meio nas placas (22 mL por placa de 9,0 cm).
- 8 Deixe as placas secarem em câmara de fluxo laminar antes de usar.

Antibióticos e outras adições

- ^a Dissolva 10 g de celobiose em 100 mL de água destilada e filtre em membrana de Millipore.
- ^b Dissolva 50 mg de ácido L-glutâmico em 10 mL de água destilada e filtre em membrana de Millipore. Adicione 1,0 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ^c Dissolva 10 mg de L-metionina em 10 mL de água destilada e filtre em membrana de Millipore. Adicione 1,0 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ^d Dissolva 200 mg de cephalexina monohidratada (Sigma C-4895) em 10 mL de álcool 70%. Adicione 0,5 mL/L (0,25 mL/500 mL).
- ^e Dissolva 500 mg de bacitracina (Sigma B-0125, 66K unidades/g ou Duchefa B-0106, 70 K unidades/g) em 10 mL de álcool 70%. Adicione 0,2 mL/L (0,1 mL/500 mL).
- ^f Dissolva 100 mg de nystatina (Sigma N-3503, Duchefa N-0138) em 10 mL de álcool 70%. Adicione 3,5 mL/L (1,75 mL/500 mL). Use 100 mg/L de cycloheximide, ao invés de nystatin, quando o crescimento de fungos no meio seletivo não for completamente inibido por 35 mg/L de nystatina.

Anexo 7

Meio mTBM agar

Nota. Este meio é uma modificação do meio Tween B (McGuire *et al.*, 1986) do qual difere na adição de 10,0 g/L de leite em pó desnatado e na ausência de 0,4 mg/L de tobramycine e 0,25 g/L de CaCl₂.

Reagente	g/L	g/500 mL
H ₃ BO ₃	0,3	0,15
KBr	10,0	5,0
Peptona	10,0	5,0
Leite em pó desnatado ^a	10,0	5,0
Bacto agar	17,0	8,5
Tween 80 ^b	10,0 mL	5,0 mL
Cephalexina monohidratada ^c	0,065	0,033
5-Fluorouracil ^d	0,012	0,006
Nystatina ^e	0,035	0,018

^{a, b, c, d, e} Adicionar após autoclavagem

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes, exceto leite em pó desnatado, antibióticos e Tween 80 dentro de um recipiente.
- 2 Adicione 900 mL (ou 450 mL) de água destilada.
- 3 Dissolva e cheque pH o qual deve ser 7.4, ajuste se necessário.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.
- 5 Prepare as soluções de antibióticos e leite desnatado.
- 6 Deixe o meio esfriar até aproximadamente 50°C antes de adicionar as soluções de antibióticos e leite desnatado e Tween 80.
- 7 Misture completamente, mas suavemente através de inversão/rodando para evitar formação de bolhas e verta o meio nas placas (22 mL por placa de 9,0 cm).
- 8 Deixe as placas secarem em câmara de fluxo laminar antes de usar.

Antibióticos e outras adições

- ^a Autoclave a solução (10,0 g/100 mL) separado. A qualidade do leite em pó desnatado afeta muito as capacidades do mTBM. Leites de boa qualidade são BBL, Oxoid ou Sigma.
- ^c Dissolva 200 mg de cephalexina monohidratada (Sigma C-4895) em 10 mL de álcool 70%. Adicione 3,25 mL/L (1,625 mL/500 mL).
- ^d Dissolva 100 mg de 5-fluorouracil (Sigma F-6627, Duchefa F-0123) em 10 mL de álcool 70%. Adicione 1,2 mL/L (0,6 mL/500 mL).
- ^e Dissolva 100 mg de nystatina (Sigma N-3503, Duchefa N-0138) em 10 mL de álcool 70%. Adicione 3,5 mL/L (1,75 mL/500 mL). Use 100 mg/L de cycloheximide, ao invés de nystatina, quando o crescimento de fungos no meio seletivo não for completamente inibido por 35 mg/L de nystatina.

Anexo 8

Mistura de reação de PCR (<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>)		
Reagente	Concentração final	Volume (µl) em 10 µl
Água MilliQ esterilizada		3,42
Tampão 10x	1x	1,00
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	0,30
dNTP's (10 mM total, 2,5 mM cada)	200 µM cada	0,80
Primer 3Sforw (5 pmol/µl)	0,50 µM	1,00
Primer 3Srev (5 pmol/µl)	0,50 µM	1,00
Primer 1052F (5 pmol/µl)	0,10 µM	0,20
Primer BacR (5 pmol/µl)	0,10 µM	0,20
Taq Polymerase (5U/µl)	0,04 U/µl	0,08
Suspensão bacteriana		2,00

Tampão 10x		
Tris-HCL (pH 9,0)	750 mM	
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM	
Tween 20	0,1% (v/v)	

Tampão TBE (Tris Borate EDTA) 0,5x		
Reagente	g/L	g/500 mL
Tris	5,39	2,70
Ácido bórico	2,75	1,38
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,37	0,19

O pH é 8,3 e não requer ajuste.

Gel de agarose 1,5% para eletroforese		
Composto	1 gel de agarose (20x20 cm)	1 Litro
TBE (Tris Borate EDTA) 0,5x	160 mL	1000 mL
Agarose	2,4 g	15,0 g
Brometo de etídeo ^a	8,0 µl	50,0 µl

^a Dissolva 100 mg de brometo de etídeo em 10 mL de água destilada. Adicione 50 µl/l desta solução. Brometo de etídeo é cancerígeno!

Preparo

- 1 Para calcular o volume do gel (em mL), multiplique a área do gel pela espessura requerida (0,4 cm).
- 2 Tenha certeza que a bandeja do gel esteja limpa e seca antes de uso. Marque o final da bandeja com uma fita.
- 3 Pese a quantidade de agarose desejada e coloque em um Erlenmeyer com a quantidade medida do tampão de eletroforese (um gel de 100 mL adicione 1,5 g de agarose e 100 mL de tampão TBE 0,5x em um frasco de 200 mL).

- 4 Dissolva a agarose em um banho com água fervente ou em microondas. Todos o grânulos de agarose devem ser dissolvidos e a solução deve ser limpa.
- 5 Deixe esfriar até aproximadamente 60°C antes de adicionar a solução estoque de brometo de etídeo^a, misture bem e verta o gel imediatamente numa espessura de 0,4 cm. Use luvas quando adicionar o brometo de etídeo.
- 6 Coloque o(s) pente(s) no gel.
- 7 Após a solidificação do gel (aproximadamente 30 minutos em temperatura ambiente) remova cuidadosamente o(s) pente(s) do gel.
- 8 Remova as fitas do final da bandeja e a coloque na unidade de eletroforese. Para eletroforese do modelo “submarine”, verta o tampão de eletroforese no aparato, o suficiente para cobrir o gel numa profundidade de pelo menos 1 mm.
- 9 O mesmo tampão de eletroforese usado no gel é utilizado como tampão de corrida.

Anexo 9

Meio 523 (Kado e Heskett, 1970)		
Componente	g/L	g/500 mL
K ₂ HPO ₄	2	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3	0,15
Sacarose	10	5
Extrato de levedura	4	2
Caseína hidrolizada	8	4
Agar	20	10
Água destilada	1000 mL	500 mL

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes.
- 2 Adicione 1000 mL (ou 500 mL) de água destilada.
- 3 Dissolva todos os ingredientes.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.
- 5 Deixe o meio esfriar até aproximadamente 50°C e verta o meio nas placas (22 mL por placa de 9,0 cm).
- 6 Deixe as placas secarem em câmara de fluxo laminar antes de usar.

Anexo 10

Meio mPSA (Mehta, <i>et al.</i>, 2005)		
Componente	g/L	g/500 mL
Ca(NO ₃)	0,35	0,175
FeSO ₄	0,35	0,175
Na ₂ HPO ₄	1,4	0,7
Peptona	3,5	1,75
Sacarose	14,0	7,0
Bacto-ágar	10,5	5
Água destilada	700 mL	350 mL
Cycloheximida ^a (500 mg/10mL 75% EtOH)	100mg (2mL)	50 mg (1 mL)
Cephalexina ^b (100 mg/10mL 75% EtOH)	10 mg (1mL)	5 mg (0,5 mL)
Pencycuron ^c	0,05 g	0,025 g
Triadimenol ^d	1 mL	0,5 mL
Tolyfluanid ^e (125 mg/10 mL água esterilizada)	12,5 mg (1 mL)	6,25 (0,5 mL)

^{a, b, c, d, e} Adicionar após a autoclavagem.

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes, exceto os antibióticos dentro de um recipiente.
- 2 Adicione 1000 mL (ou 500 mL) de água destilada.
- 3 Dissolva e cheque pH o qual deve ser 6,6.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.
- 5 Prepare as soluções de antibióticos.
- 6 Deixe o meio esfriar até aproximadamente 50°C e adicione as soluções de antibióticos.
- 7 Misture completamente, mas suavemente através de inversão/rodando para evitar formação de bolhas e verta o meio nas placas (22 mL por placa de 9,0 cm).
- 8 Deixe as placas secarem em câmara de fluxo laminar antes de usar.

Antibióticos e outras adições

- ^a Dissolva 500 mg de ciclohexamida em 10mL de álcool 75%. Adicione 2 mL/L (1 mL/500 mL).
- ^b Dissolva 100 mg de cephalexina em 10mL de álcool 75%. Adicione 1 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ^c Dissolva 125 mg de Tolyfluanid em 10 mL de água esterilizada. Adicione 1,0 mL/L (0,5 mL/500 mL).

Anexo 11

Tampão tween fosfato	
Reagente	g/L
Na ₂ HPO ₄	7,75 g
KH ₂ PO ₄	1,65 g
Tween 20	0,2 mL

pH 7,4

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes dentro de um recipiente.
- 2 Adicione 1000 mL (ou 500 mL) de água destilada.
- 3 Para extração de sementes, adicione 200 µl de Tween 20 estéril por 1000 mL.
- 4 Dissolva, ajuste o pH 7,4 e distribua em recipientes.
- 5 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.

Armazenamento

Contanto que os recipientes estejam bem fechados, podem ser armazenado por vários meses antes de usar.

Anexo 12

Meio SCM (Fatmi e Schaad, 1988)		
Reagente	g/L	g/500 mL
Bacto agar (Difco)	15	7,5
Bacto extracto de levedura (Difco)	0,1	0,05
Sacarose	10	5
Ácido bórico	1,5	0,75
K ₂ HPO ₄	2,0	1,0
KH ₂ PO ₄	0,5	0,25
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25	0,125
Água destilada	975 mL	487 mL
Ciclohexamida ^a (200 mg/mL 70% EtOH)	200 mg (1 mL)	100 mg (0,5 mL)
Ácido nicotínico ^b (5 mg/mL H ₂ O)	100 mg (20 mL)	50 mg (10mL)
Ácido nalidíxico ^c (10 mg/mL H ₂ O)	30 mg (3 mL)	15 mg (1,5 mL)
Chapman tellurite solution ^d (1% Difco)	10 mg (1 mL)	5 mg (0,5 mL)

^{a, b, c, d} Adicionar após a autoclavagem

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes, exceto antibióticos e potassium tellurite dentro de um recipiente.
- 2 Adicione 975 mL (ou 487 mL) de água destilada.
- 3 Dissolva e ajuste o pH para 7,2 a 7,4.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.
- 5 Prepare as soluções de antibiótico se necessário (filtre para esterilizar quando requerido)
- 6 Deixe o meio esfriar até aproximadamente 45-50°C e adicione as soluções de antibióticos e tellurite.
- 7 Misture gentilmente para evitar formação de bolhas e verta nas placas (22 mL por placa de 9,0 cm).
- 8 Deixe as placas secarem em câmara de fluxo laminar antes de usar.

Antibióticos

- ¹ Dissolva 2 g de cycloheximide em 10 mL de álcool 70%. Adicione 1 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ² Dissolva 0,5 g ácido nicotínico em 100 mL de água destilada esterilizada, filtre para esterilizar. Adicione 20 mL/L (10 mL/500mL).
- ³ Dissolva 100 mg de ácido nalidixico em 10 mL de NaOH 0,1 M, filtre para esterilizar. Adicione 3 mL/L (1,5 mL/500 mL)
- ⁴ Adicione 1 mL/L (ou 0,5 mL/500 mL) da solução Chapman tellurite 1% da Difco.

Anexo 13

Meio SCM modificado (mSCM) (Waters e Balkan, 1992)		
Reagente	g/L	g/500 mL
Bacto agar (Difco)	15	7,5
Bacto extrato de levedura (Difco)	0,1	0,05
Manose	10	5
Ácido Borico	1,5	0,75
K ₂ HPO ₄	2,0	1,0
KH ₂ PO ₄	0,5	0,25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25	0,125
água Distilada	975 mL	487 mL
Cycloheximide ^a (200 mg/mL 70% EtOH)	200 mg (1 mL)	100 mg (0,5 mL)
Ácido Nicotínico ^b (5 mg/mL H ₂ O)	100 mg (20 mL)	50 mg (10mL)
Ácido Nalidixico ^c (10 mg/mL H ₂ O)	30 mg (3 mL)	15 mg (1,5 mL)

^{a, b, c} Adicionar após a autoclavagem

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes, exceto antibióticos e potassium tellurite dentro de um recipiente.
- 2 Adicione 975 mL (ou 487 mL) de água destilada.
- 3 Dissolva e ajuste o pH to 7,2-7,4.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.
- 5 Prepare as soluções de antibiótico se necessário (filtre para esterilizar quando requerido)
- 6 Deixe o meio esfriar até aproximadamente 45-50°C e adicione as soluções de antibióticos e tellurite.
- 7 Misture gentilmente para evitar bolhas e verta nas placas (22 mL por placa de 9,0 cm).
- 8 Deixe as placas secarem em câmara de fluxo laminar antes de usar.

Antibióticos

- ¹ Dissolva 2 g de cycloheximida em 10 mL de álcool 70%. Adicione 1 mL/L (0,5 mL/500 mL).
- ² Dissolva 0,5 g ácido nicotínico em 100 mL de água destilada esterilizada, filtre para esterilizar. Adicione 20 mL/L (10 mL/500mL).
- ³ Dissolva 100 mg de ácido nalidixico em 10 mL de NaOH 0,1 M, filtre para esterilizar. Adicione 3 mL/L (1,5 mL/500 mL)

Anexo 14

Meio King B (Fahy & Perley, 1983)		
Componente	g/L	g/500 mL
Proteose peptona nº 3	20,0	10,0
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1,5	0,75
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,5	0,75
Agar	20,0	10,0
Glicerol	10,0 mL	5,0 mL
Água destilada	1000 mL	500 mL

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes.
- 2 Adicione 1000 mL (ou 500 ml) de água destilada.
- 3 Dissolva e cheque pH o qual deve ser 7,2.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 min.
- 5 Deixe o meio esfriar até aproximadamente 50°C e verta-o nas placas (22 ml por placa de 9,0 cm).
- 6 Deixe as placas secarem em câmara de fluxo laminar antes de usar.

Anexo 15

Meio King B modificado		
Reagente	g/L	g/500 mL
Proteose peptona nº 3	10,0	5,0
K ₂ HPO ₄	1,5	0,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	0,75
NaCl	15	7,5
Ágar	15	7,5
Água destilada	1000 mL	500 mL
Clorotalonil (200 µg/mL) ^a	200 µg (1,0 mL)	200 µg (0,5 mL)
Cefadroxil (50 µg/mL) ^b	50 µg (1,0 mL)	50 µg (0,5 mL)
Cephalexina (50 mg/mL) ^c	50 µg (1,0 mL)	50 µg (0,5 mL)
Clindamicina (100 µg/mL) ^d	100 µg (1,0 mL)	100 µg (0,5 mL)

a, b, c, d Adicionar após autoclavagem

Preparo

- 1 Pese todos os ingredientes exceto o clorotalonil e os antibióticos em um recipiente.
- 2 Adicione 1 litro de água destilada.
- 3 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 minutos.
- 4 Esterilize a quantidade requerida de Tween 80 separadamente a 121°C, 115 psi por 15 minutos.
- 5 Prepare as soluções de antibióticos e filtre para esterilizar.
- 6 Deixe o meio esfriar aproximadamente 50°C e adicione o Tween 80 e as soluções de antibióticos.
- 7 Misture gentilmente e verta nas placas (22mL por placa de 9,0 cm).
- 8 Deixe as placas para secar em câmara de fluxo laminar antes de usar ou armazenar.

Antibióticos

- ^a Dissolva 0,2 g de Clorotalonil em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^b Dissolva 0,05 g de Cefadroxil em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^c Dissolva 0,05 g de Cephalexina em 10 mL de NaOH 4%, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^d Dissolva 0,1 g de Clindamicina em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.

Anexo 16

Preparo do meio mTMB **		
Reagente	g/L	g/500 mL
H ₃ BO ₃	0,1	0,05
Bacto peptona	10,0	5,0
KBr	10,0	5,0
CaCl	0,25	0,125
Agar	15,0	7,5
Tween 80 ^a	10,0 mL	5,0 mL
Cephalexina ^b	0,065 (1 mL)	0,0325 (0,5 mL)
5-Fluorouracil ^c	0,012 (1 mL)	0,006 (0,5 mL)
Tobramycina ^d	0,0002 (1 mL)	0,0001 (0,5 mL)
Cyclohexamida ^e	0,2 (1 mL)	0,1 (0,5 mL)

^{a, b, c, d} Adicionar após autoclavagem

- 1 Pese todos os ingredientes exceto Tween 80 e os antibióticos em um recipiente.
- 2 Adicione 1 litro de água destilada.
- 3 Dissolva os ingredientes.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 minutos.
- 5 Esterilize a quantidade requerida de Tween 80 separadamente a 121°C, 115 psi por 15 minutos.
- 6 Prepare as soluções de antibióticos e filtre para esterilizar.
- 7 Deixe o meio esfriar aproximadamente 50°C e adicione o Tween 80 e as soluções de antibióticos.
- 8 Misture gentilmente e verta nas placas (22mL por placa de 9,0 cm).
- 9 Deixe as placas para secar em câmara de fluxo laminar antes de usar ou armazenar.
- 10 Armazene as placas preparadas invertidas em sacos de polietileno na geladeira ou câmara fria
- 11 Use dentro de 2 semanas após o preparo para assegurar a atividade dos antibióticos.

Antibióticos

- ^a Dissolva 0,065 g de Cephalexina em 10 mL de NaOH 4%, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^b Dissolva de 0,012 g de 5-Fluorouracil em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^c Dissolva de 0,0002 g de Tobramycina em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^d Dissolva 0,2 g de Cyclohexamida em 10 mL de etanol 70%, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.

Anexo 17

Preparo do meio CKTM		
Reagente	g/L	g/500 mL
Soy peptona	2,0	1,0
Bacto tryptona	2,0	1,0
Dextrose	1,0	0,5
L-glutamina	6,0	3,0
L-histidina	1,0	0,5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,8	0,4
KH ₂ PO ₄	1,0	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4	0,2
CaCl ₂	0,25	0,125
Pourite(=optional)	1 gota	
Difco Bacto agar	15,0	7,5
Tween 80 ^a	10 mL	5 mL
Cephalexina ^b	0,065 (1 mL)	0,0325 (0,5 mL)
5-Fluorouracil ^c	0,012 (1 mL)	0,006 (0,5 mL)
Tobramycina ^d	0,0004 (1 mL)	0,0002 (0,5 mL)
Cyclohexamida ^e	0,1 (1 mL)	0,05 (0,5 mL)
Bacitracina ^f	0,1 (1 mL)	0,05 (0,5 mL)
Sulfato de Neomycina ^g	0,01 (1 mL)	0,005 (0,5 mL)

^{a, b, c, d} Adicionar após autoclavagem

- 1 Pese todos os ingredientes exceto Tween 80 e os antibióticos em um recipiente.
- 2 Adicione 990 mL de água destilada.
- 3 Dissolva os ingredientes.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 minutos.
- 5 Esterilize a quantidade requerida de Tween 80 separadamente a 121°C, 115 psi por 15 minutos.
- 6 Prepare as soluções de antibióticos e filtre para esterilizar.
- 7 Deixe o meio esfriar aproximadamente 50°C e adicione o Tween 80 e as soluções de antibióticos.
- 8 Misture gentilmente e verta nas placas (22mL por placa de 9,0 cm).
- 9 Deixe as placas para secar em câmara de fluxo laminar antes de usar ou armazenar.
- 10 Armazene as placas preparadas invertidas em sacos de polietileno na geladeira ou câmara fria
- 11 Use dentro de 2 semanas após o preparo para assegurar a atividade dos antibióticos.

Antibióticos

- ^a Dissolva de 0,065 g de Cephalexina em 10 mL de NaOH 4%, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^b Dissolva de 0,012 g de 5-Fluorouracil em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^c Dissolva de 0,0004 g de Tobramycina em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^d Dissolva 0,1 g de Cyclohexamida em 10 mL de etanol 70%, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^e Dissolva 0,1 g de Bacitracina em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^f Dissolva 0,01 g de sulfato de neomicina em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.

Anexo 18

Meio XCP1		
Reagentes	g/L	g/500 mL
Oxoid special peptone	10,0	5,0
KBr	10,0	5,0
CaCl	0,25	0,125
Bacto Agar	15,0	7,5
Amido de batata solúvel	10,0	5,0
Crystal violeta	0,15 mL	0,075
Tween 80 ^a	10,0 mL	5,0 mL
Cephalexina (40 mg/mL) ^b	50 mg (1,25 mL)	50 mg (0,625 mL)
5-Fluorouracil (10 mg/mL) ^c	10 mg (1,0 mL)	10 mg (0,5 mL)
Tobramycina (0,8 mg/mL) ^d	0,4 mg (0,5 mL)	0,4 mg (0,25 mL)
Cycloheximida (100 mg/mL) ^e	50 mg (0,5 mL)	50 mg (0,25 mL)

^{a, b, c, d, e} Adicionar após autoclavagem

Preparo

- 1 Pese todos os ingrediente exceto Tween 80 e os antibióticos em um recipiente.
- 2 Adicione 1 litro de água destilada ou deionizada.
- 3 Ferva para dissolver.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi oor 15 minutos.
- 5 Esterilize a quantidade requerida de Tween 80 separadamente a 121°C, 115 psi por 15 minutos.
- 6 Prepare as soluções de antibióticos e filtre para esterilizar.
- 7 Deixe o meio esfriar aproximadamente 50°C e adicione o Tween 80 e as soluções de antibióticos.
- 8 Misture gentilmente e verta nas placas (22mL por placa de 9,0 cm).
- 9 Deixe as placas para secar em câmara de fluxo laminar antes de usar ou armazenar.
- 10 Armazene as placas preparadas invertidas em sacos de polietileno na geladeira ou câmara fria

Antibióticos

- ^b Dissolva 0,4 g de Cephalexina em 10 mL de NaOH 4%, filtre para esterilizar. Adicione 1,25 mL/L.
- ^c Dissolva 0,1 g de 5-Fluorouracil em 10 mL de álcool 95%, filtre para esterilizar. Adicione 1,0 mL/L.
- ^d Dissolva 0,008 g de Tobramycina em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 0,5 mL/L.
- ^e Dissolva 1,0 g de Cycloheximida em 10 mL de metanol 75%, filtre para esterilizar. Adicione 0,5 mL/L.

Anexo 19

Meio Milk-Tween (MT)		
Reagente	g/L	g/500 mL
CaCl ₂	0,25	0,125
Proteose peptona no. 3	10,0	5,0
Bacto agar	15,0	7,5
Tyrosina	0,5	0,25
Skim milk powder	10,0	5,0
Tween 80 ^a	10,0 mL	5,0 mL
Cephalexina (40 mg/mL) ^b	80 mg (2,0 mL)	80 mg (1,0 mL)
Cycloheximida (100mg/mL) ^c	200 mg (2,0 mL)	200 mg (1,0 mL)
Vancomycina (10 mg/mL) ^d	10 mg (1,0 mL)	10 mg (0,5 mL)

^{a, b, c, d} Adicionar após autoclavagem

Preparo

- 1 Pese todos os ingrediente exceto Tween 80 e os antibióticos em um recipiente.
- 2 Adicione 1 litro de água destilada ou deionizada.
- 3 Ferva para dissolver.
- 4 Autoclave a 121°C, 115 psi por 15 minutos.
- 5 Esterilize a quantidade requerida de Tween 80 separadamente a 121°C, 115 psi por 15 minutos.
- 6 Prepare as soluções de antibióticos e filtre para esterilizar.
- 7 Deixe o meio esfriar aproximadamente 50°C e adicione o Tween 80 e as soluções de antibióticos.
- 8 Misture gentilmente e verta nas placas (22mL por placa de 9,0 cm).
- 9 Deixe as placas para secar em câmara de fluxo laminar antes de usar ou armazenar.
- 10 Armazene as placas preparadas invertidas em sacos de polietileno na geladeira ou câmara fria

Antibióticos

- ^b Dissolva de 0,4 g de Cephalexina em 10 mL de NaOH 4%, filtre para esterilizar. Adicione 2,0 mL/L.
- ^c Dissolva de 1,0 g de Cycloheximida em 10 mL de metanol 75%, filtre para esterilizar. Adicione 2,0 mL/L.
- ^d Dissolva 0,1 g de Vancomycina em 10 mL de água destilada, filtre para esterilizar. Adicione 1.0 mL/L.

Anexo 20

Nutriente ágar (NA)	
Reagentes	g/L
Bacto nutrient agar (DIFCO)	23,0

Preparo

- 1 Suspensa 23,0 g em 1 litro de água destilada ou deionizada.
- 2 Ferva para dissolver completamente.
- 3 Esterilize a 121-124°C por 15 minutos.
- 4 Deixe o meio esfriar aproximadamente 50°C.
- 5 Misture gentilmente e verta nas placas (22mL por placa de 9,0 cm).
- 6 Armazene as placas preparadas invertidas em sacos de polietileno na geladeira ou câmara fria.

5.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE VÍRUS

Diversos métodos podem ser empregados para a detecção de vírus em sementes, sendo os métodos biológicos e sorológicos os mais comuns e fáceis de serem empregados. Entretanto, testes moleculares como PCR (para vírus de DNA) e RT-PCR (para vírus de RNA) também podem ser utilizados, sendo o PCR um dos mais sensíveis entre os disponíveis no momento. A principal dificuldade, que constitui um fator decisivo na eficiência dos testes de diagnose, é a sensibilidade da técnica empregada, uma vez que, além da baixa concentração de partículas virais nas sementes, geralmente a porcentagem de sementes infectadas varia entre 5 e 15%. A localização da partícula viral na semente também pode interferir na eficiência da técnica diagnóstica. O TMV (*Tobacco mosaic virus*), por exemplo, se localiza na parte externa das sementes, enquanto outros vírus, como o LMV (*Lettuce mosaic virus*) se localizam nos tecidos embrionários, devido à infecção do óvulo ou do grão de pólen.

A seguir serão apresentadas as principais técnicas que podem ser empregadas para a avaliação da sanidade de sementes em relação à presença de vírus patogênicos.

5.3.1. Testes biológicos

Os testes biológicos são, aparentemente, mais fáceis, devido ao fato de não necessitarem de infraestrutura ou de equipamentos caros. Existe a necessidade apenas de um telado ou casa-de-vegetação, ou mesmo de um câmara de crescimento com luz e temperatura controladas. Esse método consiste em fazer a semeadura das sementes que se quer analisar, em bandejas adequadas, e esperar a germinação das sementes e o crescimento das plantas por um período aproximado de uma semana a dez dias. Geralmente esse tempo é suficiente para avaliar se as plântulas apresentam ou não os sintomas da virose que se quer investigar. Esse teste tem, como desvantagem, o fato de que a observação visual, nem sempre é absolutamente segura, de modo que se pode, nos casos de dúvida, submeter a planta suspeita a testes complementares, como o sorológico ou mesmo PCR. A segunda desvantagem seria o tempo gasto para a realização do teste, que pode se alongar nos casos em que a germinação das sementes for demorada. A vantagem é que, além de ser um teste barato, não exige laboratórios sofisticados.

5.3.2. Teste sorológico DAS-ELISA (Figuras 87-91)

Esse teste consiste em empregar o antissoro específico para cada vírus, numa técnica em que se utiliza a Imunoglobulina (IGg) e a IGg conjugada com a enzima fosfatase alcalina para a diagnose de vírus em tecidos vegetais. A produção desses antissoros é bastante demorada e exige equipamentos caros, porém a maioria dos vírus mais comuns, que são transmissíveis pelas sementes, possui antissoros comerciais disponíveis no mercado.

Essa é uma técnica bastante eficiente e sensível, capaz de detectar 1 ng de vírus. A detecção de vírus na parte externa das sementes, como é o caso do TMV, é mais fácil, bastando deixar as sementes mergulhadas em solução de extração, em agitador, por cerca de 20 minutos, para eluir as partículas virais. A extração do vírus de tecidos internos das sementes é um pouco mais difícil, e pode se tornar um fator limitante para a sua detecção. O número de sementes amostradas também deve ser objeto de atenção.

Uma boa alternativa é colocar as sementes para germinar, por incubação em papel de filtro, como no *blotter test*, e utilizar os tecidos da plântula para o teste. Além dos tecidos serem mais tenros e fáceis de serem triturados, a multiplicação das partículas virais, juntamente com as células da plântula, durante o processo de germinação, aumenta a chance de detecção desse patógeno, que geralmente ocorre em baixa concentração nas sementes.

5.3.2.1. Extração do vírus

Triturar o tecido em almofariz ou sacos plásticos apropriados na presença solução de extração (1 g/10 mL), e transferir o extrato para tubos de 1,2mL, em “racks” especiais para pipetagem.

5.3.2.2. Cobertura inicial das placas

A cobertura das placas deve ser feita com 100mL/orifício dos antissoros específicos (policlonais), utilizando a diluição recomendada pelo fabricante. Em seguida faz-se a incubação da placa por 2h a 37°C e a lavagem por 3-4 vezes com água deionizada e uma vez com tampão de lavagem (idêntica em todos os passos). Pode-se empregar lavagem manual ou com o lavador automático de placas.

5.3.2.3. Adição da amostra

Após a secagem da placa adiciona-se o antígeno, compreendido pelo extrato de tecidos proveniente das sementes (ou plântulas) que se quer analisar: 100mL/orifício, com incubação de um dia para o outro (“overnight”). Lava-se novamente como descrito anteriormente. Deve-se empregar controles positivos e negativos, compreendidos por extratos de plantas comprovadamente infectadas e/ou sadias, respectivamente. Na falta de plantas infectadas ou nos casos de vírus quarentenários, pode-se empregar controles adquiridos da mesma companhia fabricante dos antissoros.

5.3.2.4. Adição do Conjugado

Adiciona-se o anticorpo conjugado com a enzima fosfatase alcalina, também diluída conforme a recomendação do fabricante : 100ml/orifício e incuba-se por 2-3h a 37°C. Efetua-se nova lavagem conforme descrito anteriormente.

5.3.2.5. Adição do substrato e leitura dos resultados

Adiciona-se o substrato p-nitrofenilfosfato (na concentração de 1mg/mL): 100ml/orifício e incubase à temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos, ou até ser observada a cor amarela nos orifícios onde foram colocados os controles positivos. Faz-se então a leitura a 405nm em um leitor de placas apropriado. Geralmente considera-se positivo a amostra, cuja absorbância for igual ou maior a duas vezes a absorbância obtida nos orifícios do controle negativo.

5.3.3. Diagnose de vírus através de PCR

A técnica PCR ou reação em cadeia da polimerase é mais sensível que a sorológica, sendo capaz de detectar menos de 1 pg de vírus. Para essa técnica, emprega-se um par de oligonucleotídeos complementares a uma determinada região do genoma viral, com a finalidade de amplificar um fragmento genômico, de tamanho conhecido. No caso de vírus cujo genoma é o RNA, deve-se primeiro fazer uma fita de DNA complementar, utilizando-se uma transcriptase reversa, para depois então fazer a PCR propriamente dita (RT-PCR).

Para realizar essa técnica, primeiro deve-se fazer a extração do RNA total da planta, para depois então fazer , a partir desse, o cDNA e a PCR.

5.3.3.1. Extração do RNA total das sementes ou plântulas

Macerar 0,1g de sementes ou tecidos das plântulas em almofariz, na presença de nitrogênio líquido, adicionar 500µL de tampão (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 2 M NaCl, 0,005% BSA) e agitar. Após a agitação, centrifugar o extrato foliar 14.000 rpm por 10 minutos (Centrífuga Eppendorf), descartando-se o sobrenadante. Adicionar 600µL de tampão CTAB (2% CTAB contendo 1,4M NaCl e 0,5% de β-mercaptoethanol) ao precipitado, agitar em vortex e incubar a 55°C por 30 minutos. Após a incubação, acrescentar 400µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitar novamente em vortex e centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos. Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar 1/10 volume de acetato de amônio 7,5M e 1 volume de isopropanol. Após nova agitação a amostra colocar a -80°C por 10 minutos para a precipitação do RNA e centrifugar a 14.000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Lavar o precipitado com etanol a 70%, secar a vácuo por 5 minutos e ressuspender em 50 µL de água ultrapura tratada com diethyl pyrocarbonate (DEPC). Analisar o RNA total obtido por eletroforese em gel de agarose 0,7%.

5.3.3.2. Transcrição reversa e PCR

Os oligonucleotídeos (par de *primers*) empregados devem ser desenhados especialmente para cada vírus, com base nas sequências específicas de cada um (Tabela 1). Para a síntese inicial do cDNA deve-se utilizar 5µL do RNA total, 1µL do *primer antisense* (na concentração de 10 pM) e 6µL de água tratada com DEPC. Incubar o material a 70°C por 10 minutos e transferir imediatamente para o gelo por 10 minutos. Em seguida adicionar 4 µL de RT buffer 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8,3 a 25°C; 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV, por exemplo). Incubar a 37°C por 1 hora e a 70°C por 15 minutos. Após a obtenção do cDNA, passar à amplificação por PCR, utilizando-se 5µL do cDNA, 5 µL do 10X tampão da PCR, 3 µL de MgCl₂ (25 mM), 1µL dNTP (10 mM), 2,5 µL do *primer senso* (a10 pM), 2,5 µL do *primer antisense* (a 10 pM), 1µL da Taq DNA polimerase e 30 µL de água ultrapura tratada com DEPC (volume total da reação igual a 50 µL). Pode-se também fazer uma reação com 25 µL, basta empregar a metade do volume dos reagentes, conforme descrito.

Para a reação de PCR pode-se empregar 35 ciclos, sendo: 94 C ° por 40 segundos, 53 °C por 55 segundos e 72° C por 2 minutos, com uma extensão final a 72° C por 10 minutos. Entretanto, dependendo do vírus poderá haver uma pequena variação nesse ciclo. Ao final da reação, alíquotas de 5 µL devem ser analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,7%), para checar o aparecimento das bandas típicas.

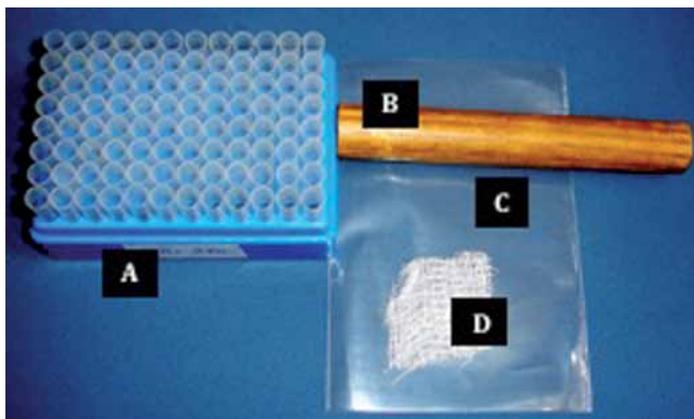


Figura 87 - Material necessário para o processamento da amostra para o Teste ELISA: A: Rack com tubos de 1,4mL; B: Bastão de madeira com cerca de 12 x 2,5cm; C: saquinho de plástico 10 x 15 x 0,10 cm; D: Gaze, 3,5 x 4,5cm, dobrada duas vezes

Procedimento do teste ELISA (Figuras 88 e 89)

A)



Colocar o material vegetal a ser triturado na gaze

B)



Dobrar cuidadosamente a gaze, de modo a envolver todo o material e colocar dentro do saquinho de plástico

C)



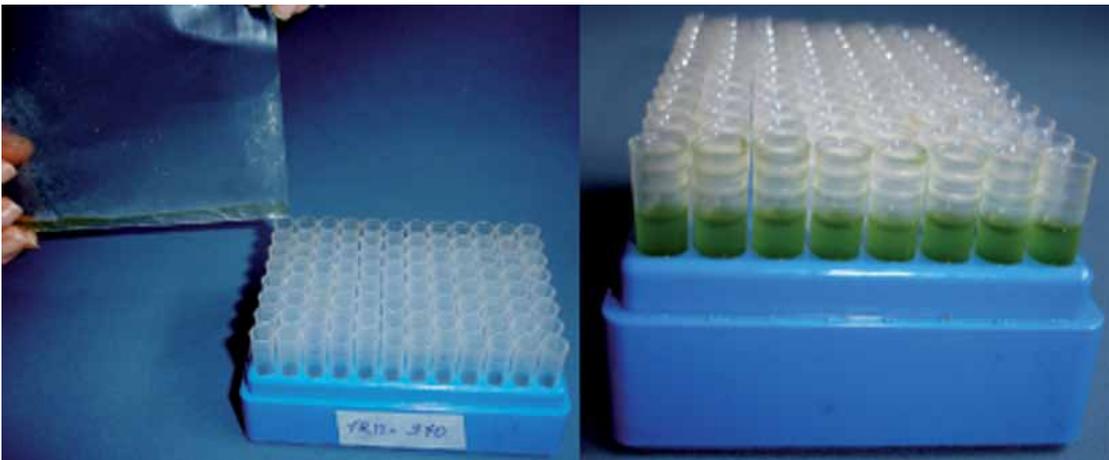
Colocar a solução tampão de extração (1mL para cada grama de tecido) dentro do saco plástico

D)



Macerar fazendo movimentos de compressão e giratório

E)



Despejar cuidadosamente nos tubos, tomando o devido cuidado para não deixar respingar nos tubos laterais.

F)



Retirar as amostras com a pipetadora multicanal e aplicar nas placas ELISA, previamente recobertas com o antissoro específico, conforme recomendação do fabricante.

Figura 88 A – F - Procedimento para extração e aplicação da amostra nas microplacas empregadas para o teste ELISA.

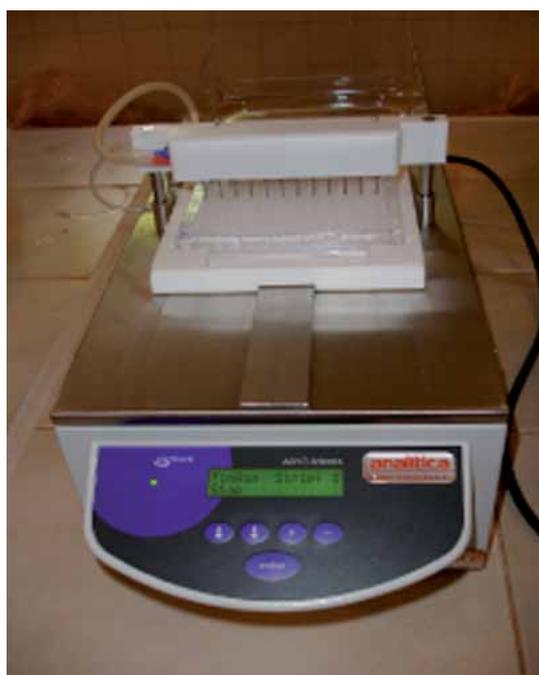


Figura 89 – Lavagem manual ou com o auxílio de um lavador automático de placas, após cada incubação (para remoção do antissoro, do extrato de tecidos vegetais e do antissoro conjugado).

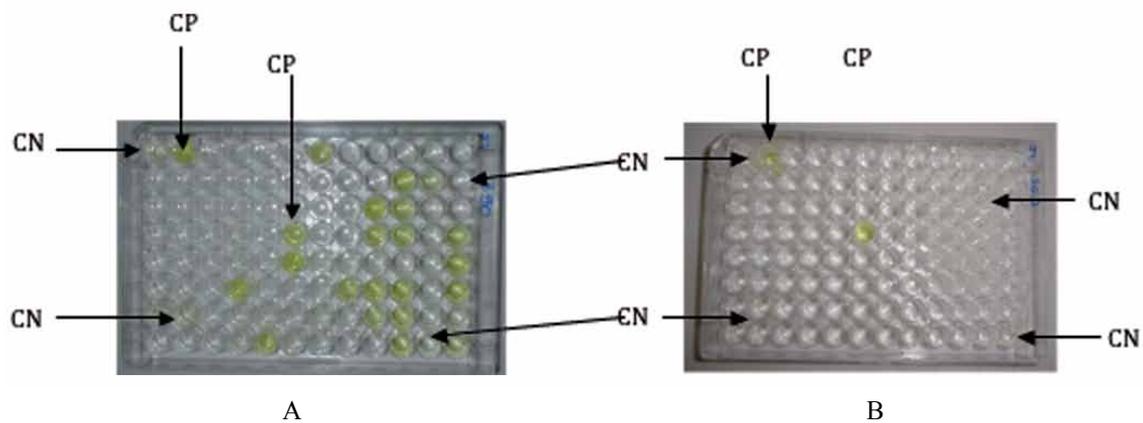


Figura 90 - Placas mostrando os controles positivos (CP) e negativos (CN), em dois testes: com 20% (A) e 0% (B) de amostras positivas, respectivamente.



Figura 91 - Leitor de Placas ELISA

5.3.4 MÉTODOS ESPECÍFICOS POR ESPÉCIE

5.3.4.1 *Capsicum* spp.

Cultivares de pimentão e de pimenta podem transmitir três espécies de Tobamovirus pelas sementes: *Tobacco mosaic virus*, *Tomato mosaic virus* e *Pepper mild mottle virus*.

- *Tobacco mosaic virus* - TMV

O TMV é um vírus com ssRNA+, pertencente à família *Tobamoviridae*, gênero *Tobamovirus*, com partícula tubular rígida, medindo 300 nm de comprimento e 18 nm de diâmetro (Figura 92). Não possui vetor na natureza, mas pode ser transmitido de modo bastante eficiente pelo atrito entre plantas e por operações culturais. Não é transmitido pelas sementes ou pólen, entretanto as partículas virais podem ficar aderidas na parte externa do envoltório das sementes, podendo infectar a plântula por qualquer ferimento causado no embrião durante a germinação. Dependendo da cultivar o TMV pode causar mosaico ou lesão local necrótica.

- *Tomato mosaic virus* - ToMV

O ToMV também é um Tobamovirus, que mede 300 nm de comprimento por 18 nm de diâmetro. Também não possui vetor na natureza, podendo ser transmitido por contato entre plantas e por operações culturais. É transmissível pelas sementes, podendo ser encontrado na mucilagem externa, na testa e algumas vezes no endosperma de sementes de tomate, mas nunca foi encontrado dentro do embrião. Sementes que contêm o vírus no endosperma, podem permanecer contaminadas por cerca de nove anos. A porcentagem de sementes contaminadas varia com o fruto, mas já foram encontradas até 94% de sementes contendo o vírus. Os sintomas variam amplamente com a cultivar e as condições ambientais, entretanto os mais comuns são mosaico verde escuro, distorção foliar das folhas jovens, nanismo e redução no crescimento dos frutos.

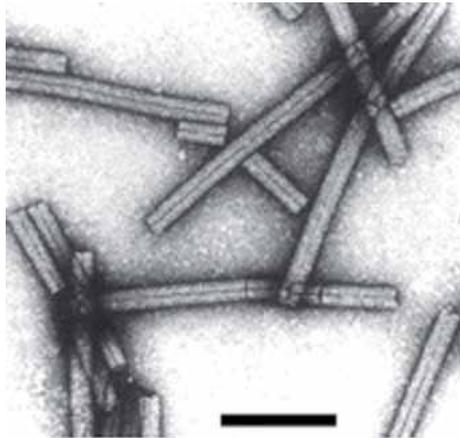


Figura 92 - Partículas de TMV

- *Pepper mild mottle virus* - PMMoV

O PMMoV é um Tobamovirus com 312 nm de comprimento por 18 nm de diâmetro. Não possui vetor na natureza mas é transmitido mecanicamente por tratos culturais e fricção entre plantas vizinhas. Foi encontrado transmissão por 22% de sementes de *C. frutescens* e por 29% das sementes de *C. annuum*. O vírus pode ser encontrado na parte externa das sementes, podendo também aparecer com baixa frequência no endosperma das sementes. As plântulas podem se infectar facilmente durante o transplântio. Os sintomas mais comuns são o amarelecimento suave das folhas, deformações dos frutos e o subdesenvolvimento das plantas.

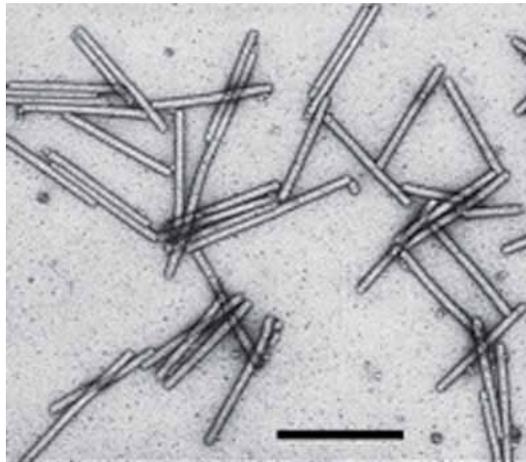


Figura 93 - Partículas de PMMoV

A) Teste Biológico

A realização desse teste é semelhante para os três vírus. Deve-se empregar 1000 sementes, para semeadura em bandejas limpas, contendo substrato devidamente esterilizado, e com os nutrientes necessários ao desenvolvimento da planta. Geralmente em uma bandeja medindo 50 x 30 cm, é possível plantar 500 sementes, enfileiradas, com 2cm entre as linhas (Figura 94: A-D). Portanto 1000 sementes poderão ser semeadas em duas bandejas.

Após a germinação das sementes, deve-se observar as folhas primárias, pois sementes contaminadas poderão dar origem a plantas com folhas menores, mostrando mosaico e deformação foliar, tanto para o TMV como para o ToMV. Os sintomas induzidos pelo PMMV geralmente são mais brandos. Como as folhas do pimentão são bastante pequenas quando germinam, nem sempre a observação de sintomas nas folhas é uma tarefa fácil, pois a intensidade dos sintomas vai depender da concentração do inóculo nas sementes. Concentrações maiores do inóculo tendem a propiciar uma maior intensidade de sintomas nas plântulas (Figura 95: A-D).



Figura 94 - Teste biológico de sementes de pimenta. A: plântulas nas bandejas uma semana após a germinação. B: plântula sadia (S) e infectada (INF); B1: detalhe da plântula infectada com TMV em B; C: plântula sadia (S) e infectada (INF); D: detalhe de plântula infectada com TMV; D1: detalhe de plântula infectada assinalada com seta em D.



Figura 95 - Teste biológico de sementes de pimentão. A e B: plântulas nas bandejas uma semana após a germinação, com alta (A) e baixa incidência (B) de vírus . C a E: detalhes das plântulas infectadas com TMV.

B) ELISA

Geralmente não é indicada a maceração direta das sementes para extração do vírus. No caso do TMV, que fica aderido externamente nas sementes, existem dois procedimentos que podem ser indicados: o primeiro é separar 1080 sementes (utilizar no mínimo 1000), colocar em cerca de 10-15 mL da solução tampão de extração, e deixar em agitação à temperatura ambiente por cerca de meia hora. Isso faz com que as partículas virais se desprendam das sementes e passem para a solução de extração. Em seguida, recuperar a solução de extração por filtração das sementes em gaze dupla, aplicar 100 mL em cada um dos 980 orifícios da placa ELISA previamente recoberta com o antissoro específico e processar o teste normalmente.

Uma segunda metodologia seria colocar as sementes para germinar em papel umedecido ou em gerbox, separar a casca das sementes (Fig. 96D e 96H) e extrair o suco das plântulas para o procedimento do teste ELISA (Figura 96 A -J). Nesse caso, deve-se colocar o extrato de 12 plântulas em cada um dos 90 orifícios da placa (1080 no total), sendo que os seis orifícios restantes deverão ser preenchidos com dois controles positivos e quatro controles negativos. Como o peso de 12 sementes de pimentão e/ou pimenta é, em média, de 0,2 a 0,3 gramas, deve-se macera-las em 1 a 1,5mL do tampão de extração (proporção 1:5).

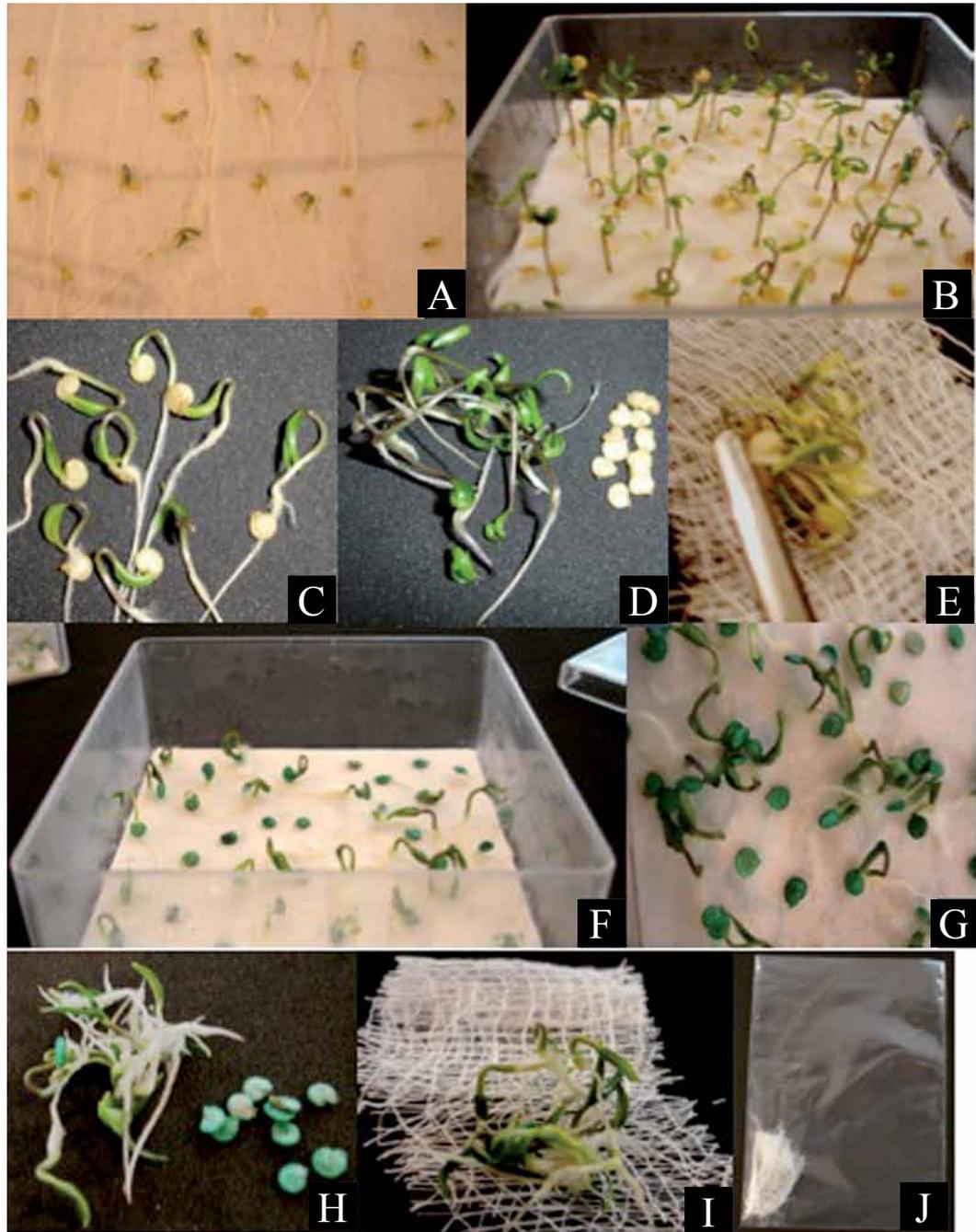


Figura 96 - Sementes de pimenta germinada em papel (A), em gerbox (B) e de pimentão germinada em gerbox (F). Detalhe das plântulas de pimenta (C e D) e de pimentão (H). Plântulas colocadas no gaze (E e I) e em seguida no saquinho (J) para extração do suco e posterior aplicação nas microplacas.

C) RT-PCR

O modo mais eficiente para se fazer o RT-PCR dos vírus que podem ser transmitidos por sementes de espécies de *Capsicum sp* é utilizar o RNA total das plântulas oriundas das sementes que se pretende analisar, obtidas conforme descrito anteriormente para a técnica sorológica ELISA, ilustrado na Figura 96. Como essa técnica (PCR) é muito mais sensível do que a ELISA, pode-se extrair o RNA de 100 plântulas (aproximadamente 1,6 a 2,3 g de tecido), em cada teste, e realizar a técnica conforme descrito no item 1.3. Para cada 1000 sementes serão feitos 10 testes de PCR, o que contribui para diminuir o custo das análises. Os primers para os três vírus se encontram descritos na tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos (primers) para a detecção de cada vírus por RT-PCR, número de pares de base (Pb) do fragmento e região do genoma a ser amplificado .

Vírus	Primers*	No. Pb	Região do Genoma
<i>Tobacco mosaic virus</i> TMV	1: 5' GTCAGTGCCGAACAAG 3' 2: 5' TCAAGTTGCTGGACTAG 3'	600	5592 – 6191 MP/CP
<i>Tomato mosaic virus</i> ToMV	1: 5' GAGTGCGGGCTACTGCCC 3' 2: 5' GCTACCCGCAGGGTAGACC 3'	703	5350 a 6052 MP/CP
<i>Pepper mild mottle virus</i> PPMV	1: 5' GGTGTGCGCCATGGAAAAGGG 3' 1: 5' GTGAGTCCACTCGCGCTCTC 3'	799	5341 – 6139 MP/CP

* Primer 1: 5'→3'(sense); Primer 2: 3'→5'(antisense).

Para os três vírus, o ciclo para PCR poderá ser:

1. Aquecimento inicial a 94 °C por 2 minutos
2. 30 ciclos : 92 °C por 1 minuto
55 °C por 1 minuto
72 °C por 2 minutos
3. Extensão final de 72 °C por 10 minutos.

As fotografias dos géis mostrando as bandas obtidas na análise eletroforética dos produtos das PCRs, realizadas com cada um dos primers descritos, podem ser vistas nas figuras 97 a 98.

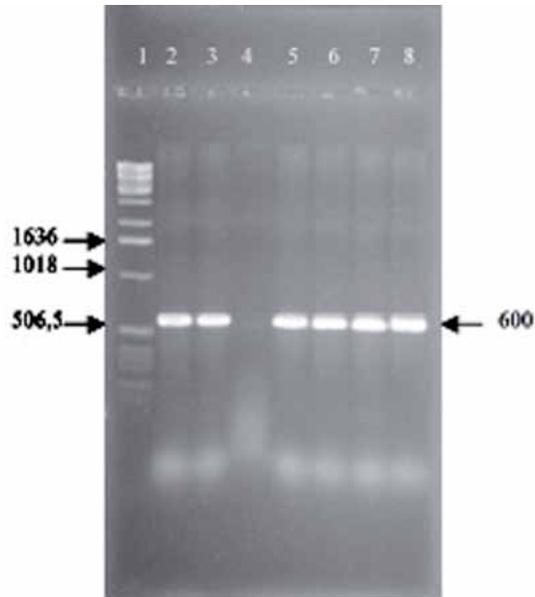


Figura 97 - Análise eletroforética do produto de PCR obtido com o par de primers desenhado para o Tobacco mosaic virus (TMV). 1: 1Kb ladder; 2 e 3: controles positivos; 4: controle negativo; 5 a 8: plântulas com sintomas de mosaico.

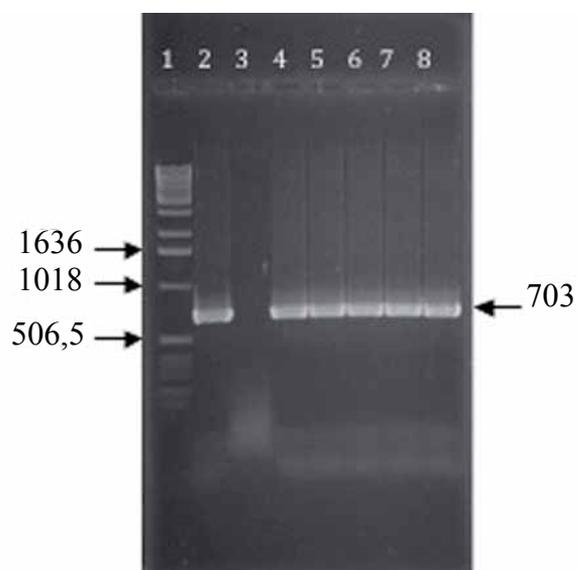


Figura 98 - Análise eletroforética do produto de PCR obtido com o par de primers desenhado para o Tomato mosaic virus (ToMV). 1: 1Kb ladder; 2: controle positivo; 3: controle negativo; 4 a 8: plântulas com sintomas de mosaico.

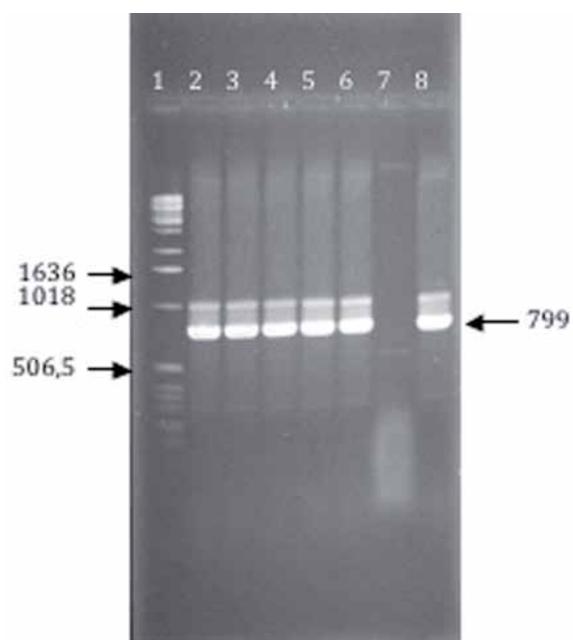


Figura 99 - Análise eletroforética do produto de PCR obtido com o par de primers desenhado para o Pepper mild mottle virus (PMMV). 1: 1Kb ladder; 2 a 6: plântulas com sintomas de mosaico; 7: controle negativo; 8: controle positivo.

5.3.4.2 *Cucumis melo/ Cucurbita sp*

Essas duas espécies podem transmitir o vírus do mosaico da abóbora (*Squash mosaic virus*- SqMV).

- *Squash mosaic virus*- SqMV

Esse é um vírus de ssRNA+, pertencente à família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*. Possui o genoma subdividido, encapsulado em três partículas isométricas, com cerca de 30 nm de diâmetro. Na natureza esse vírus é transmitido principalmente por *Diabrotica* spp. e *Acalymma* spp, dentre outros. Pode ser transmitido por sementes de *Cucurbita moschata*, *C. pepo*, *C. maxima*, *C. mixta* e *Cucumis melo*, sendo que a porcentagem de transmissão depende da planta e da estirpe do vírus e pode variar entre 1 e 94%.

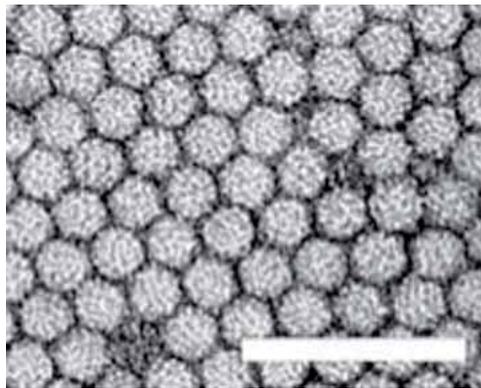


Figura 100 - Partículas de *Squash mosaic virus* SqMV.

A) Teste Biológico

O teste biológico consiste em plantar 1000 sementes em bandejas limpas, contendo substrato devidamente esterilizado, com os nutrientes necessários, e analisar as plântulas após a sua germinação. O tamanho ideal da bandeja é de 50 x 30 cm, sendo possível plantar 500 sementes, enfileiradas, com 2 cm entre as linhas (Figura 101: A-B). Portanto 1000 sementes poderão ser semeadas em duas bandejas.

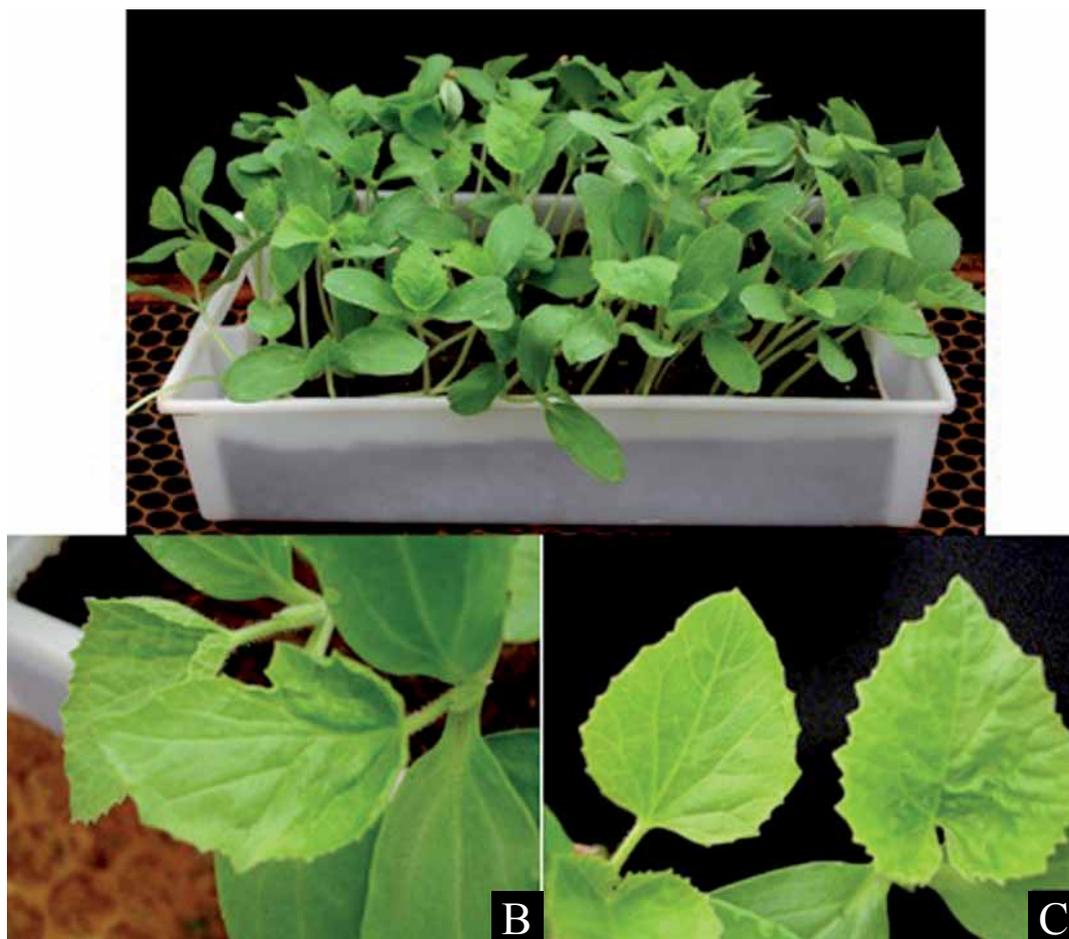


Figura 101 - Teste biológico de sementes de melão (A). B: detalhes dos na folha da plântula mostrando deformação,e mosaico; C: folha sadia (S) e infectada (I) com o SqMV.

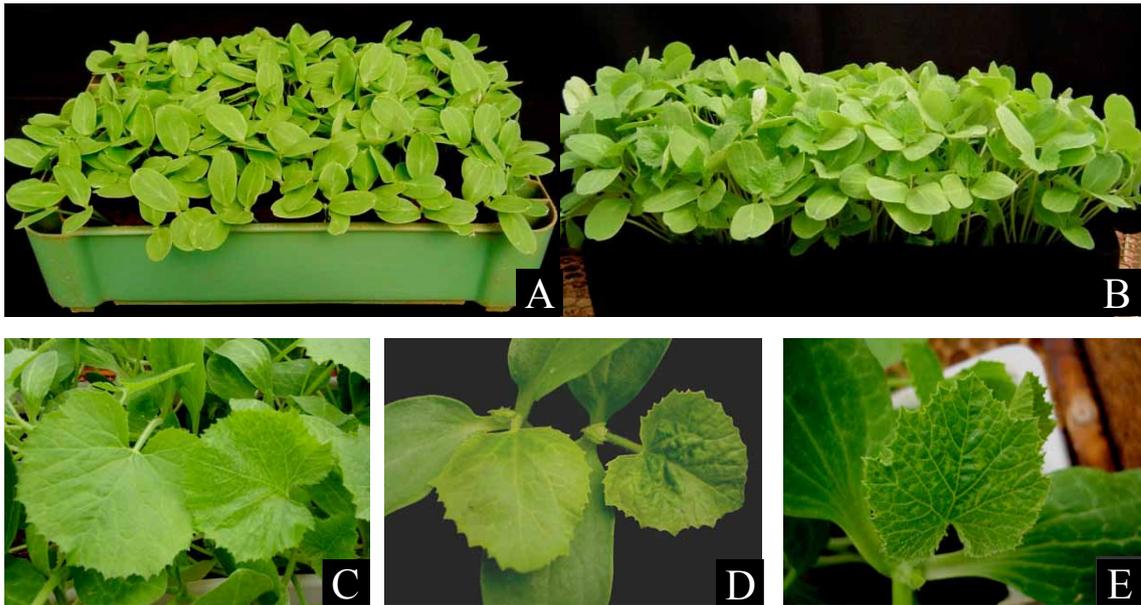


Figura 102 - Teste biológico de sementes de Abóbora uma semana (A) e duas semanas (B) após a germinação. C→E: detalhes dos nas plântulas infectadas com SqMV.

B) ELISA

Também nesse caso não é indicada a maceração direta das sementes para extração do vírus. Pode-se colocar as sementes para germinar em papel umedecido, e extrair o suco das plântulas (excluindo a parte da raiz e parte baixa do caule) para o procedimento do teste ELISA (Figura 88: A-F). O extrato de 12 plântulas deve ser aplicado em cada um dos 90 orifícios da microplaca (1080 no total), sendo que os seis orifícios restantes deverão ser preenchidos com dois controles positivos e quatro controles negativos. O peso de 12 plântulas do melão é, em média, de 0,72g e deve ser macerado em 3,6 mL. O de 12 plântulas de abóbora é de 1,52 g e deve ser macerado em 7,6mL. De qualquer modo, deve-se fazer a pesagem e ajustar a proporção para 1 g de tecido/5 mL de solução extratora.

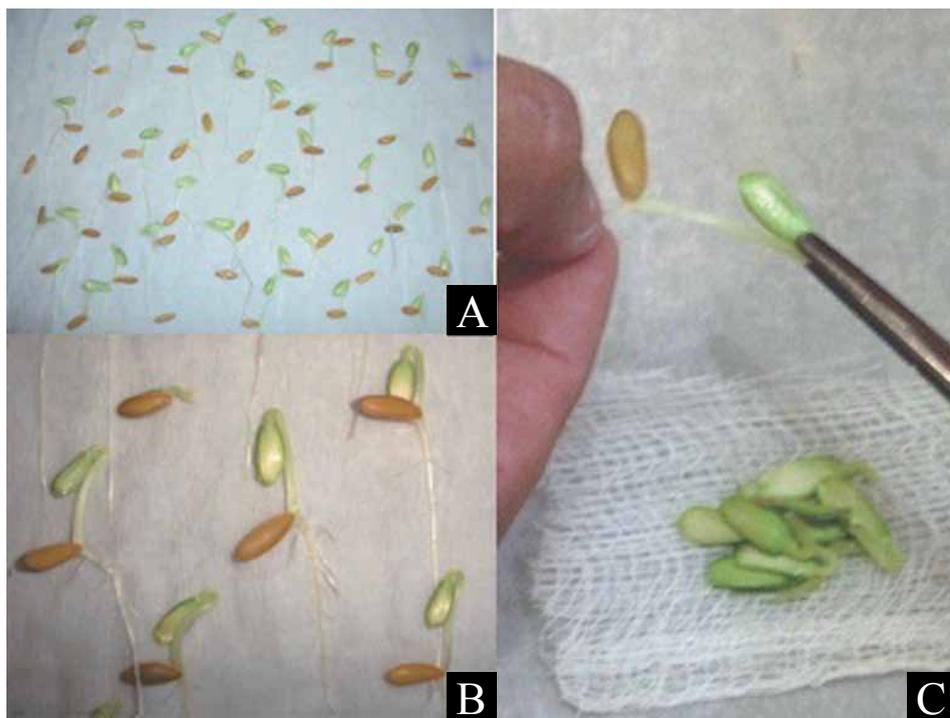


Figura 103 - Sementes de melão (A) e de abóbora (D) germinadas em papel. Detalhe das plântulas de melão (B) e de abóbora (E). Plântulas colocadas no gaze (C e F) para serem posteriormente transferidas para os saquinhos para extração do suco.

C) RT-PCR

Para a extração do RNA é melhor empregar também as plântulas germinadas em papel conforme descrito para o teste ELISA (Figuras 88, A-F). Tanto o peso das plântulas abóbora como o das de melão são maiores, portanto recomenda-se fazer a extração de RNA de 50 plântulas (cerca de 3 a 6,3 g), de modo que serão 20 testes de PCR pra 1000 sementes. Utilizar a proporção grama de tecido/mL de solução extratora recomendada no item específico da técnica (1.3). Nesse caso o teste indicará a incidência em cada 50 das 1000 sementes analisadas.

O par de primer foi desenhado para amplificar um fragmento de 655 pb, na região da capa protéica entre os nucleotídeos 2021 e 2675:

SqMV forward: 5' – GAC TAC AAC ACC GCT TAC 3'
 SqMV reward: 5' CT GCC CAG AAA TTC CTA GCA 3'.

O ciclo para PCR é:

1. Aquecimento inicial a 94° C por 2 minutos.
2. 35 ciclos: 95° C por 1 minuto
50° C por 1 minuto
72° C por 2 minutos.
3. Extensão final a 72° C por 7 minutos.

A figura 104 mostra a banda amplificada a partir de RNA extraído de planta de abóbora infectada com o SqMV.

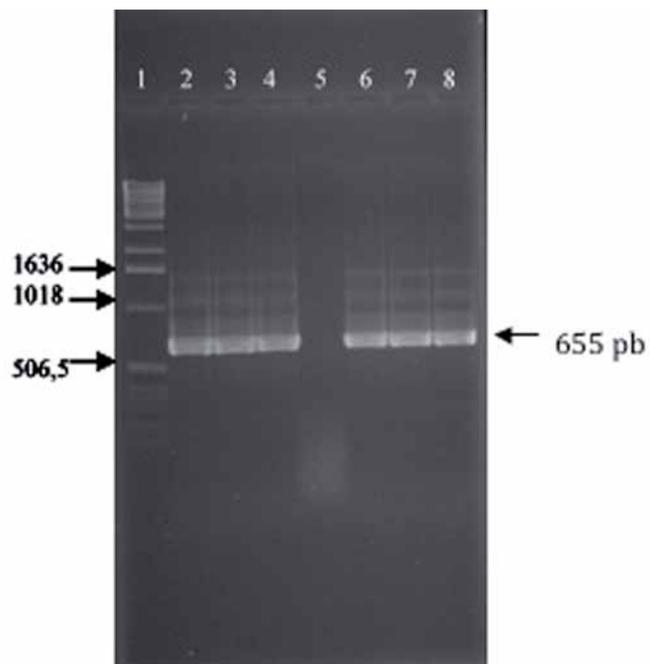


Figura 104 - Análise eletroforética do produto de PCR obtido com o par de primers desenhado *Squash mosaic virus* (SqMV). 1: 1Kb ladder; 2, 3 e 4: controles positivos; 5: controle negativo; 6 a 8: plântulas com sintomas de mosaico.

5.3.4.3 *Lactuca sativa*

Plantas de alface infectadas com o vírus do mosaico (*Lettuce mosaic virus* – LMV) podem facilmente transmiti-lo por meio das sementes produzidas.

- *Lettuce mosaic virus* – LMV

É um vírus pertencente à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, que possui ssRNA+ encapsulado em uma partícula única, alongada e flexível, medindo 750nm de comprimento por 13 nm de diâmetro. É transmitido de um modo não persistente ou estiletar por diversas espécies de afídeos, como *Acyrtosiphon scariolae*, *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Nasonovia ribisnigri*, *Rhopalosiphum pseudobrassicae*, etc. O *Myzus persicae* é o mais eficiente na transmissão do LMV, sendo que os pulgões ápteros são mais eficientes que os alados.

Os sintomas apresentados pela planta de alface infectada dependem da cultivar e da época de infecção. Os mais comuns são mosaico, enrugamento, embolhamento, deformação foliar e necrose, além de uma drástica diminuição do crescimento quando plantas jovens são infectadas.

Cerca de 3 a 15% das sementes coletadas de plantas de alface infectadas podem transmitir o vírus. Essa porcentagem de transmissão depende do tempo de infecção da planta que produziu as sementes, da variedade e das condições ambientais. O LMV pode ser transmitido pela espécie selvagem *Lactuca serriola*.

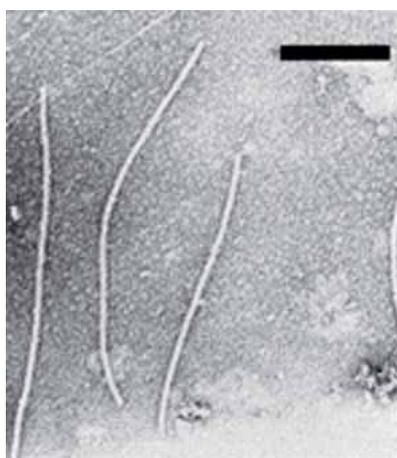


Figura 105 - Partículas de LMV.

A) Teste Biológico

Na realização desse teste deve-se empregar 1000 sementes. A semeadura deve ser feita em bandejas limpas, contendo substrato devidamente esterilizado, e com os nutrientes necessários ao desenvolvimento da planta. São necessárias 2 bandejas, com dimensões de 50 x 30 cm, para o plantio de 500 sementes, enfileiradas, com 2 cm entre as linhas, em cada uma. A observação deve ser feita nas primeiras folhas emitidas após a germinação das sementes. Os sintomas deverão ser: mosaico, diminuição e deformação das folhas (Figura 106).

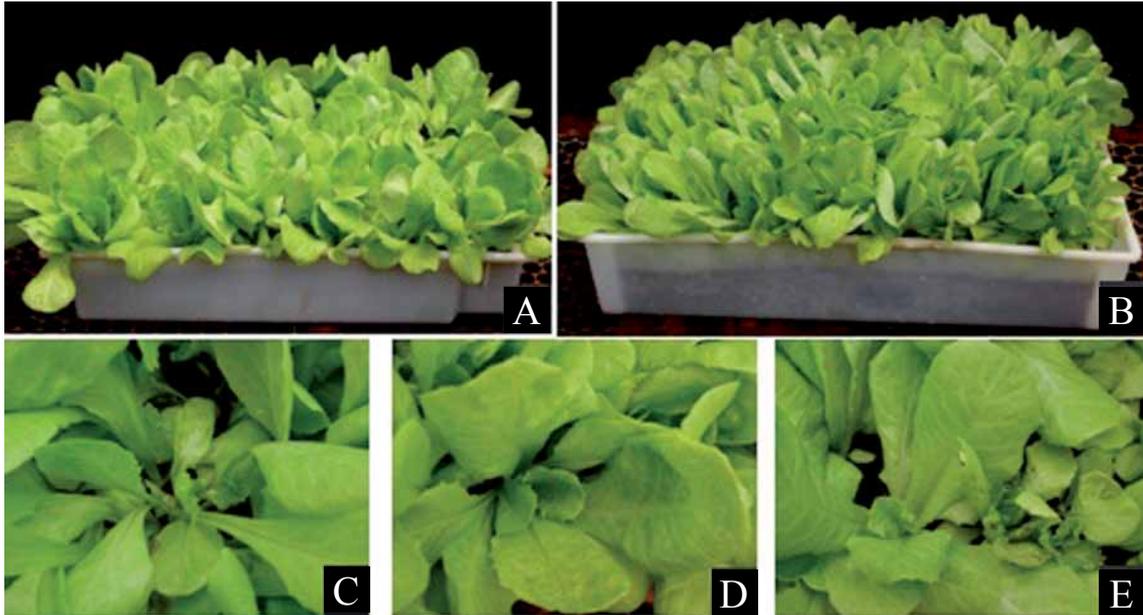


Figura 106 - Teste biológico de sementes de alface. A e B: plântulas nas bandejas duas semanas após a germinação. C – E: detalhes de plântulas infectadas com o LMV, mostrando mosaico e deformação (C), mosaico (D) e mosaico necrótico (E).

B) ELISA

Pode-se extrair o suco diretamente das sementes, ou colocar as sementes para germinarem em papel umedecido. Em seguida, separar a casca das sementes (Fig. 107 B) e extrair o suco das plântulas para o procedimento do teste ELISA. Deve-se colocar 12 plântulas em cada um dos 90 orifícios da placa (1080 no total), sendo que os seis orifícios restantes deverão ser preenchidos com dois controles positivos e quatro controles negativos. Como o peso de 12 sementes de é, em média, de 0,15 a 0,2 gramas, deve-se macera-las em 0,75 a 1 mL do tampão de extração (proporção 1:5).

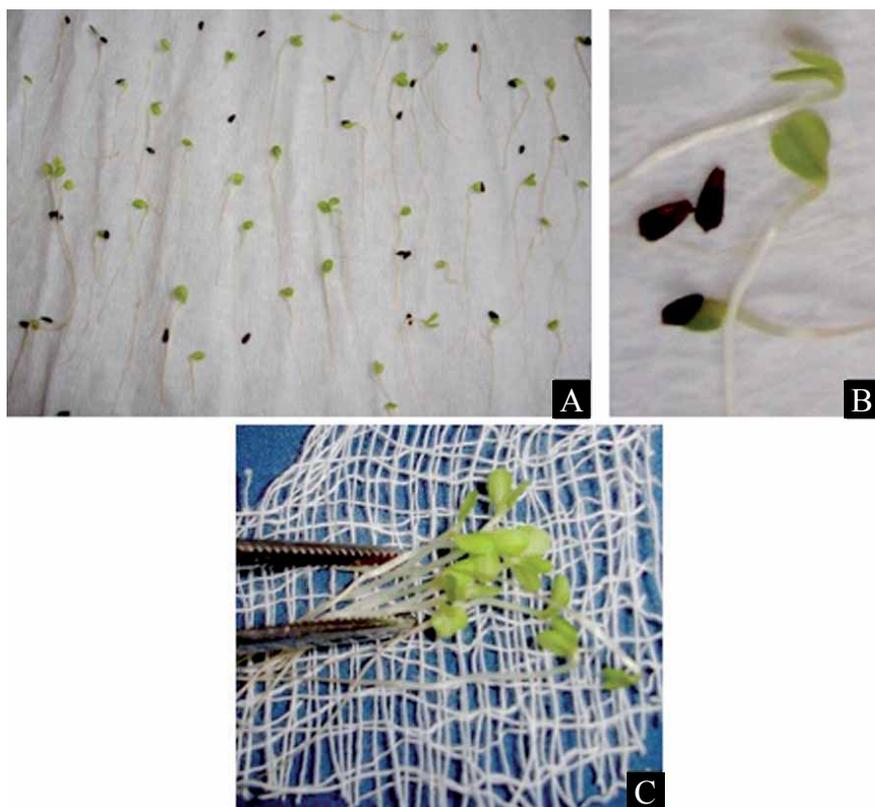


Figura 107 - Sementes de alfaca germinada em papel (A). Detalhe das plântulas de alfaca (B) e plântulas colocadas no gaze (C) e em seguida no saco plástico para obtenção do extrato a ser utilizado no teste ELISA.

C) RT-PCR

O RNA total das plântulas oriundas das sementes que se pretende analisar, obtidas conforme descrito anteriormente para a técnica sorológica ELISA, ilustrado na Figura 88 (A- D). Pode-se extrair o RNA de 100 plântulas (aproximadamente 1,25 a 1,66 g de tecido), em cada teste, e realizar a técnica conforme descrito no item 1.3. Para cada 1000 sementes serão feitos 10 testes de PCR, o que contribui para diminuir o custo das análises. Pode-se, porém, utilizar 50 plântulas (20 testes). Nesse caso, deve-se determinar o peso das plântulas para calcular o volume da solução extratora.

O par de primers empregado foi desenhado para amplificar um fragmento de 748 pb, na região da capa protéica, entre os nucleotídeos no. 9121 e 9868:

LMV Forward: 5' – GGA GAA AGG AAG TGG TTC TG 3'

LMV Reward: 5' – CAC GCC TTT AGT GCA ACC 3'

O Ciclo para PCR sera:

1. Aquecimento inicial a 94 °C por 2 minutos
2. 30 ciclos: 94 °C por 1 minuto
50 °C por 1 minuto
72 °C por 2 minutos
3. Extensão final a 72 °C por 10 minutos.

A figura 108 mostra a banda amplificada a partir de RNA extraído de planta de abóbora infectada com o LMV.

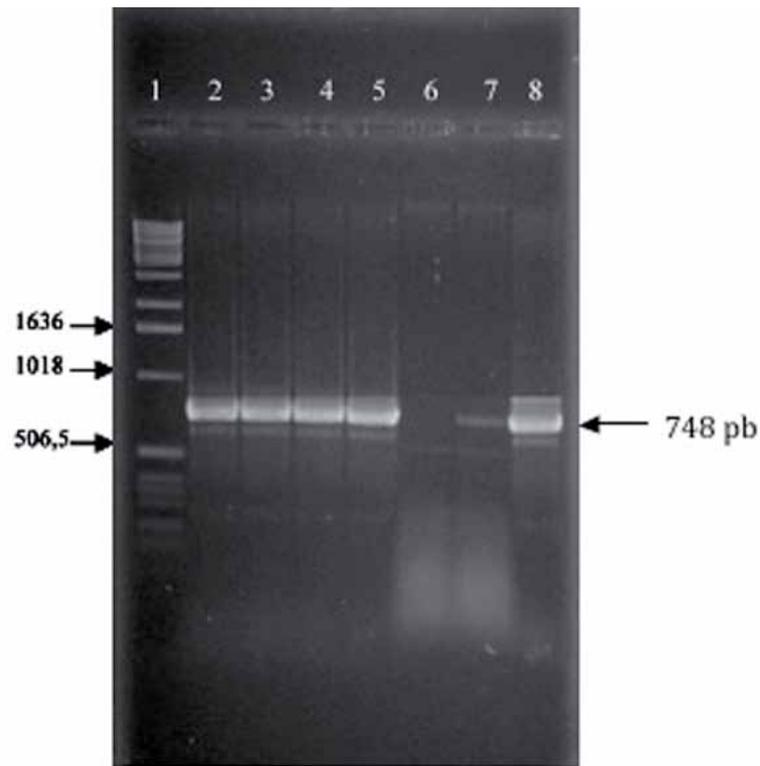


Figura 108 - Análise eletroforética do produto de PCR obtido com o par de primers desenhado para o *Lettuce mosaic virus* (LMV). 1: 1Kb ladder; 2 a 5: plântulas com sintoma de mosaico; 6: controle negativo; 7: planta com suspeita de infecção; 8: controle positivo.

5.3.4.4 *Lycopersicon esculentum*

Sementes de tomateiro podem disseminar o *Tomato mosaic virus* (ToMV) e o *Tobacco mosaic virus* (TMV), já descritos para *Capsicum* spp.

- *Tomato mosaic virus* - (ToMV)

Vírus pertencente à família *Tobamoviridae*, gênero *Tobamovirus*, se encontra descrito em detalhes na parte de detecção de vírus em *Capsicum* spp. Nas sementes de tomate também é encontrado na mucilagem externa, na testa e algumas vezes no endosperma, não sendo encontrado dentro do embrião. Pode ser transmitido por mais de 90% das sementes de plantas de tomate infectadas precocemente. Induz mosaico, deformação foliar e subdesenvolvimento da planta de tomate que, se infectada precocemente, tem a sua produção totalmente comprometida.

- *Tobacco mosaic virus* - (TMV)

Esse também é um *Tobamovirus*, já descrito para *Capsicum* spp. É um vírus que contamina as sementes, sendo encontrado na camada externa, de modo que infecta as plântulas por meio de qualquer ferimento causado no embrião por ocasião do processo de germinação. Os sintomas causados na plântula de tomate são idênticos aos causados pelo ToMV, sendo impossível a sua distinção visual.

A) Teste Biológico

A metodologia desse teste é semelhante à descrita para o teste de espécies de *Capsicum* spp. Deve-se semear 1.000 sementes em bandejas limpas, contendo substrato devidamente esterilizado, e com os nutrientes necessários ao desenvolvimento da planta. Geralmente em uma bandeja medindo 50 x 30cm, é possível plantar 500 sementes, enfileiradas, com 2cm entre as linhas. Portanto 1000 sementes poderão ser semeadas em duas bandejas.

Após a germinação das sementes, observar as primeiras folhas emitidas, pois sementes contaminadas poderão dar origem a plantas com folhas menores, mostrando mosaico e deformação foliar, tanto para o ToMV como para o TMV. A Figura 109 (A-C) mostra detalhes do teste.

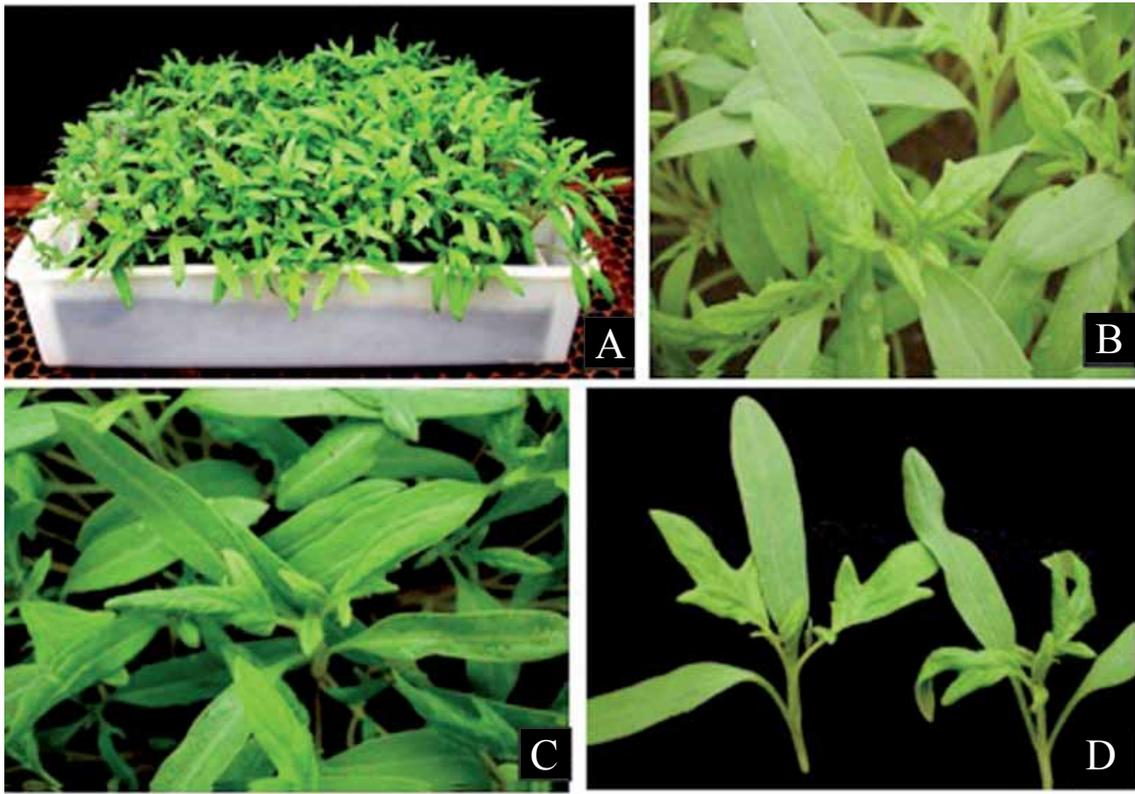


Figura 109 - Teste biológico de sementes de tomateiro. A: Plântulas na bandeja; B e C: plântulas infectadas indicadas pelas setas; D: plântula sadia (S) e infectada (IN).

B). Teste ELISA e RT-PCR

Ambos os testes já foram descritos para *Capsicum* spp. Para maior sensibilidade, a obtenção do extrato foliar para ELISA e a extração de RNA para PCR devem ser feitos com a plântula obtida pela germinação das sementes, em substrato de papel de filtro ou em gerbox (Figura 110). Pode-se empregar 12 plântulas em cada extração para o teste ELISA (cerca de 0,17g/ 0,85mL), 90 extrações, 1080 sementes.

Para o RT-PCR, pode-se fazer a extração de RNA de 100 plântulas (cerca de 1,4 g), 10 extrações, 1000 sementes. Os primers e as bandas observadas na eletroforese dos produtos obtidos no PCR, para o TMV e o ToMV, estão descritos para o *Capsicum* spp.

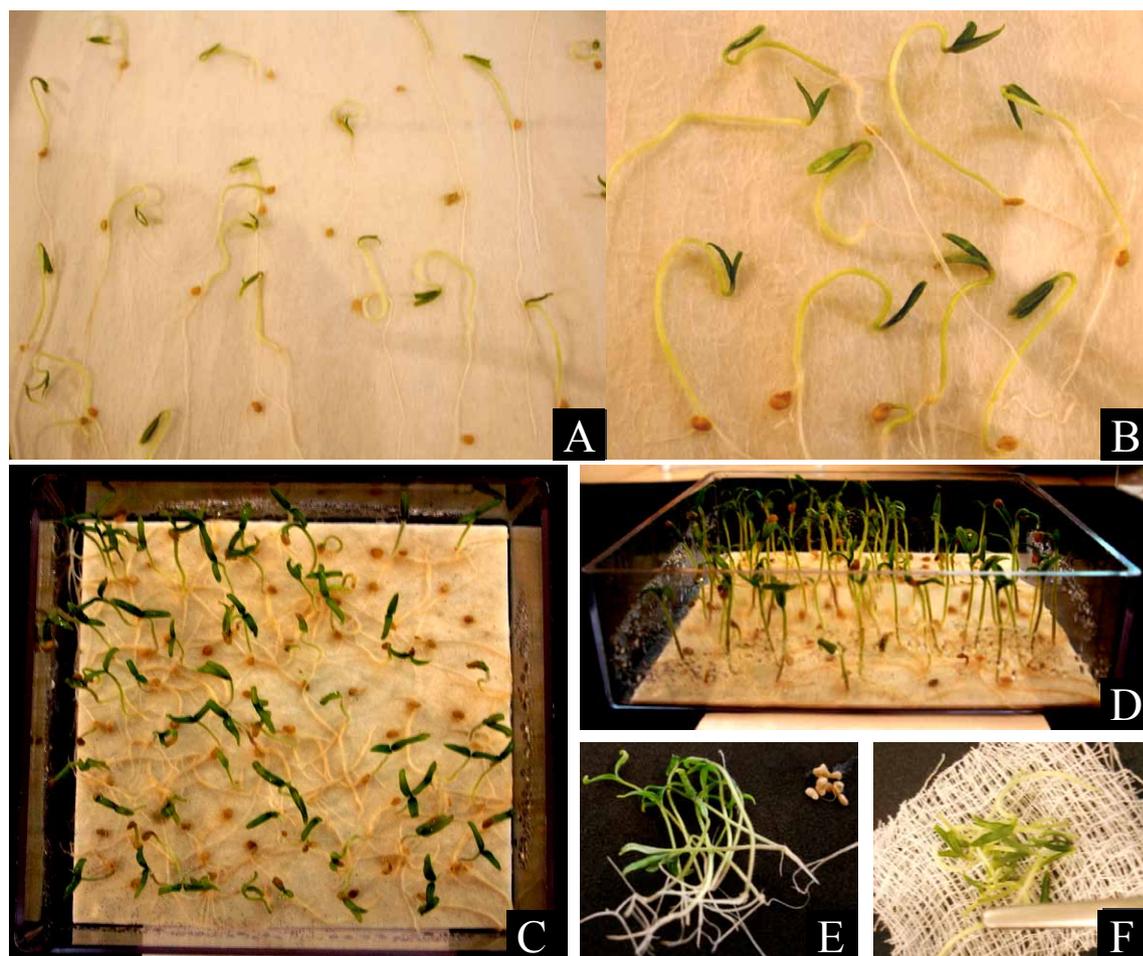


Figura 110 - Sementes de tomateiro germinada em papel (A), em gerbox (C e D). Detalhe das plântulas (B e E). Plântulas colocadas no gaze (F) para extração do suco e posterior aplicação nas microplacas.

5.3.4.5 *Phaseolus vulgaris*

Cultivares de feijoeiro suscetíveis ao vírus do mosaico comum (*Bean common mosaic virus* - BCMV), podem transmitir esse vírus através das sementes.

- *Bean common mosaic virus* - (BCMV)

O BCMV é um vírus com ssRNA+, pertencente à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, com 760 nm de comprimento (figura 111). Pode ser transmitido por diversos afídeos, principalmente pelo *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae* e *Myzus persicae*. Outros vetores como *Aphis gossypii*, *A. medicaginis*, *A. rumicis*, *Hyalopterus atriplicis*, *Macrosiphum ambrosiae*, *M. pisi* and *M. solanifolii* também podem transmitir o BCMV. Os sintomas na planta dependem da suscetibilidade da cultivar, da estirpe do vírus e da época em que ela for infectada. Infecções precoces pela estirpe comum induzem mosaico severo, deformações foliares, enrugamento embolhamento e encarquilhamento, além de subdesenvolvimento da planta. Algumas estirpes podem também induzir necroses severas.

A porcentagem de transmissão do BCMV pelas sementes também varia com a estirpe e cultivar, podendo chegar a mais de 83% das sementes provenientes de plantas infectadas. O vírus se aloja nos tecidos do embrião, podendo aí chegar por meio de infecção dos tecidos maternos ou via pólen.



Figura 111 - Partícula do BCM

A) Teste biológico

Para o teste biológico deve-se empregar 1.000 sementes. Essas devem ser plantadas em bandejas limpas, contendo substrato devidamente esterilizado, e com os nutrientes necessários ao desenvolvimento da planta. Geralmente em uma bandeja medindo 50 x 30 cm, é possível plantar 500 sementes, enfileiradas, com 1cm de espaçamento entre sementes e 3 cm entre as linhas. Portanto 1000 sementes poderão ser semeadas em duas bandejas.

Após a germinação das sementes, deve-se observar as folhas primárias, pois sementes contaminadas darão origem a plantas com folhas menores, mostrando mosaico e formação foliar (figura 112 B e C). As primeiras trifoliadas emitidas também mostrarão o sintoma de mosaico e deformação foliar (Figura 112D).

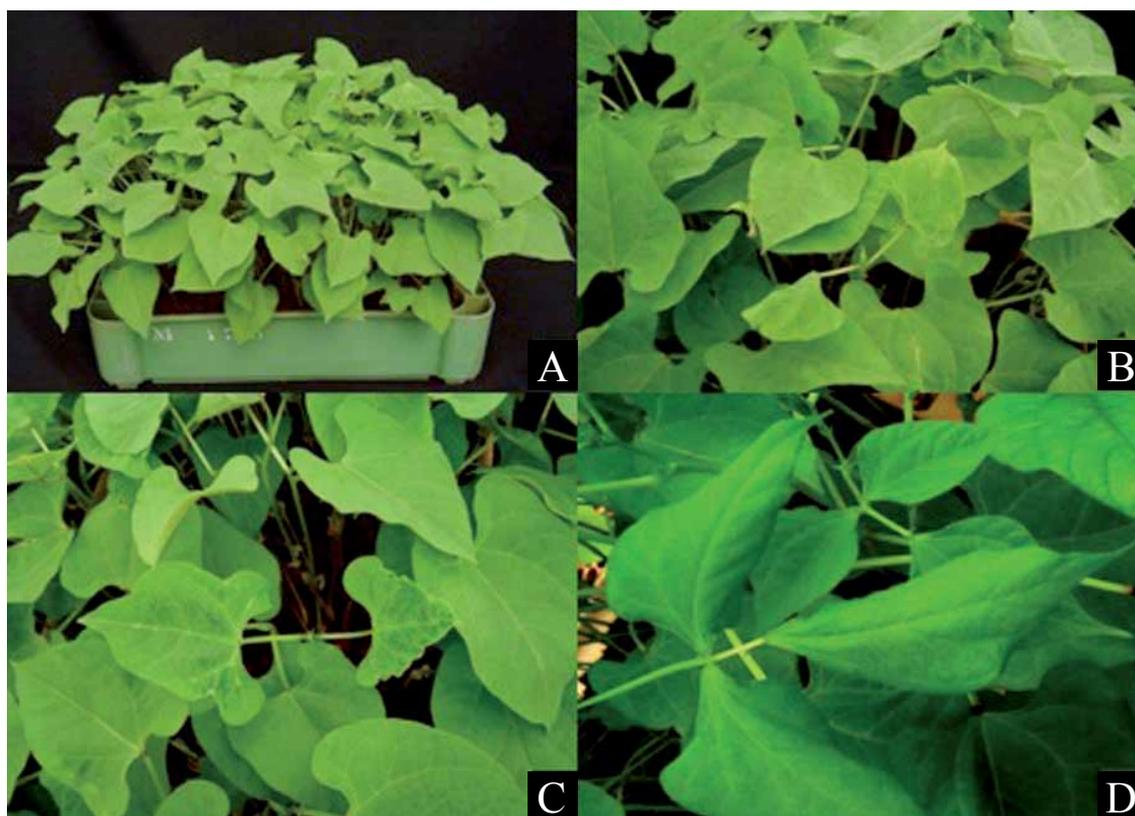


Figura 112 - Teste biológico de sementes de feijão. A: bandeja com as plântulas; B e C: sintomas do BCMV em folhas primárias e D: sintomas do BCMV em trifolioladas.

B) ELISA

O extrato das sementes nem sempre é adequado para emprego direto nesse teste. Em primeiro lugar, devido às características físicas das sementes, que contêm tecidos mais rígidos, e em segundo lugar devido à concentração de partículas virais nas mesmas, que pode estar abaixo da sensibilidade dessa técnica que é em torno de 1ng.

A alternativa que tem sido testada com ótimos resultados consiste em colocar as sementes para germinar em papel (Figuras 113), remover a camada externa da semente e então extrair o suco da parte apical das plântulas (113D e E), conforme já descrito anteriormente. A partir daí, a técnica segue os passos descritos anteriormente. As sementes podem ser combinadas 12 a 12, para aproveitar uma placa ELISA para cada amostra. Como essa possui 96 orifícios, pode-se empregar 4 controles negativos, 2 positivos e os 90 restantes com o extrato das plantas a serem testadas. No total serão testadas 1080 sementes, o que pode ser considerado uma quantidade satisfatória.



Figura 113 - Sementes de feijão germinadas em papel (A e B). Detalhe das plântulas de feijão (C e D). Parte das plântulas (folhas primárias) colocadas no gaze (E) para extração do suco e posterior aplicação nas microplacas.

C) RT- PCR

Para a realização do RT-PCR, o extrato utilizado para extração do RNA poderá também ser extraído das plântulas obtidas por germinação das semente em substrato de papel, conforme descrito anteriormente. Como esse teste é mais caro, porém mais sensível, pode-se empregar uma combinação de um maior número de sementes/teste, utilizando-se 50 sementes (cerca de 2g) em cada extração, o que permitirá fazer apenas 20 reações de PCR para cada lote de 1000 sementes.

O par de primers empregado foi desenhado para amplificar um fragmento de 854 pb, na região da capa protéica, entre os nucleotídeos no. 8944 e 9797:

BCMV Forward: 5' TTG GAC AGC CAC AGC CAC 3'
 BCMV Reward: 5'CTG CGG AGG ACC CAT GCC 3'

O ciclo para PCR é:

1. Aquecimento inicial a 92 °C por 2 minutos
2. 30 ciclos: 92 °C por 1 minuto
 64 °C por 1 minuto
 72 °C por 2 minutos
3. 72 °C por 7 minutos.

A análise eletroforética dos produtos da PCR em gel de agarose a 0,7% pode ser visualizada na figura 114

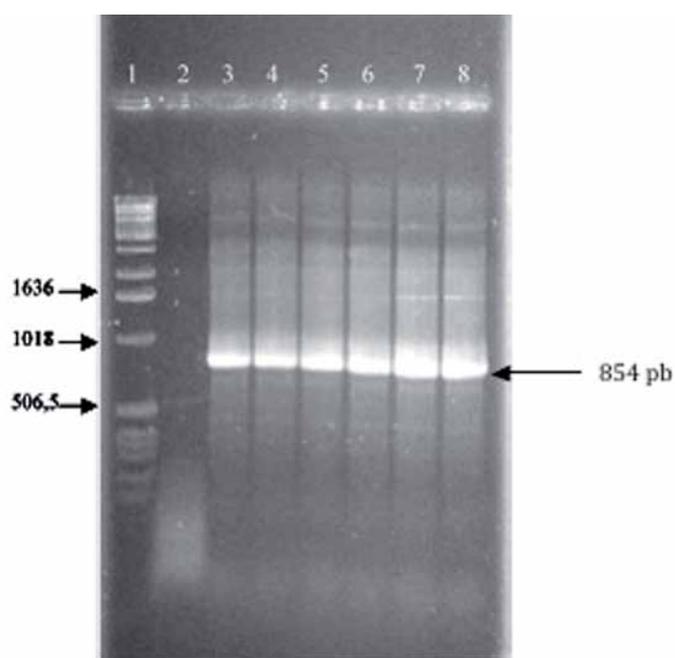


Figura 114 - Análise eletroforética dos produtos de PCR obtidos com o par de primers desenhado para o Bean common mosaic virus (BCMV). 1: 1Kb ladder; 2: controle negativo; 3 e 4: controles positivos; 5-8: plântulas com sintoma de mosaico.

5.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE NEMATÓIDES

Técnicas para detecção e quantificação de nematóides são fundamentalmente diferentes daquelas empregadas para outros grupos de patógenos e parasitas de sementes. Diferentes das bactérias e da maioria dos fungos, os fitonematóides são parasitos obrigados, e assim o emprego de meios de culturas é inútil para sua detecção.

Os principais fatores envolvidos no processo de escolha do método de extração mais adequado são: espécie de nematóide e sua caracterização; natureza e condições da amostra, tamanho da semente, época de colheita, condições e período de armazenamento das sementes e disponibilidade de pessoal.

Recomenda-se a amostragem de 500 sementes por lote devidamente homogeneizadas, subdivisão destas em sub-amostras com 100 sementes as quais por sua vez devem ser distribuídas em cinco repetições, que devem ser processadas de acordo com os métodos mais apropriados.

No caso de diagnósticos em análises de rotina em larga escala, o ideal é que o método seja prático, rápido, simples e qualitativo, de modo a permitir uma extração consistente, independentemente da espécie vegetal ou do tipo de semente, livre de erros ou da variabilidade, principalmente devido ao analista. Também deve traduzir o número real de espécimes presentes na amostra.

No geral os métodos de extração se baseiam no princípio do funil de Baermann e suas modificações, onde a motilidade dos nematóides é usada para separá-los de materiais inertes, ou de um período de flutuação onde nematóide e partículas com densidades semelhantes são separados de partículas de solo mais densas, em água e, então, recuperados em peneiras.

Para detecção e quantificação dos nematóides em sementes, praticamente todos os métodos conhecidos buscam empregar o princípio da reativação desses organismos que estão em estado de anidrobiose. Assim, a embebição em água por determinado período de tempo faz com estes migrem para o exterior das sementes, permitindo sua observação ao microscópio.

A determinação desse tipo de agente em sementes é de caráter mais qualitativo, apesar de que a contagem do número de nematóides em determinada quantidade de sementes possa fornecer a idéia do potencial de inóculo.

Os métodos baseados no funil de Baermann não requerem grandes laboratórios e nem equipamentos sofisticados. A modificação desse método, com o emprego de pratos grandes, permite a recuperação da maioria dos nematóides com tamanho mediano, podendo, entretanto, ser menos eficiente para aqueles de tamanho maior, a exemplo dos nematóides da família Longidoridae e, mesmo aqueles menos ativos.

Pesquisadores ou técnicos podem empregar funis de Baermann ou peneiras colocadas sobre pratos para extrair os nematóides das sementes. Entretanto, a escolha depende da disponibilidade de equipamentos e de materiais, quantidade de sementes e mesmo a urgência da informação.

Por meio do emprego de peneiras, um maior número de nematóides pode ser detectado após um dia da extração. No caso do funil de Baermann, o tempo requerido para extração é maior, mas pode ser um método mais adequado. Ambos os métodos apresentam vantagens e desvantagens. No caso do método de peneiras sobre pratos, a distância a ser percorrida pelos nematóides das sementes até a água é menor, com vantagem de que os pratos não possuem paredes inclinadas (presentes em funis) onde os nematóides possam se hospedar. Também nesse método, tem-se economia de espaço e maior eficiência na extração. Porém suspensões dos nematóides obtidas nos pratos podem conter relativamente mais sujeira e detritos quando comparado às suspensões obtidas através de funis. Também no caso do prato, a elevada quantidade de espuma sobre água pode matar os nematóides. No método do funil de Baermann, a suspensão de nematóides pode ser coletada em ampola de vidro, onde a água em excesso poderá ser facilmente descartada após ter-se concentrado a suspensão contendo os nematóides. A análise de sementes com casca ou tegumento por qualquer um dos métodos é mais simples do que para sementes descascadas manualmente. Também nesse caso, um número grande de sementes poderá ser processado de uma única vez para detecção de nematóides, mesmo essa técnica requerendo período maior para extração.

Assim, nessa sessão serão descritos métodos e procedimentos para facilitar e nortear a detecção e a quantificação de nematóides parasitos de plantas, que se encontram associados às sementes de espécies vegetais, assim como estimular o desenvolvimento e avaliação de outras metodologias afins.

5.4.1 Detecção de *Heterodera glycines* em amostras de sementes de soja

- **Número de sementes para análise:** 5 x 100 sementes
- **Procedimentos**

A detecção de cistos de *Heterodera* em sementes normalmente é realizada pela inspeção das sementes secas, ou destas em água. Também pode ser realizada através do método de peneiramento, com ou sem flutuação em centrífuga, seguido pela análise visual em microscópio estereoscópico (Lupa).

a) Método do peneiramento a seco (Tenente *et al.*, 2000)

Colocar as sementes sobre uma tela de metal (malha 0,840mm), que substituirá o fundo de uma caixa tipo gerbox, sobreposta a uma tampa de caixa tipo gerbox. Entre a tela e a tampa da caixa coloca-se papel de filtro umedecido e em seguida, agita-se o conjunto manualmente, permitindo a passagem dos cistos pelos poros da tela, ficando estes retidos no papel umedecido. Posteriormente, as amostras devem ser analisadas sob microscópio estereoscópico (Lupa).

b) Método da flutuação + peneiramento (Shepherd, 1970)

É um método simples para extração de cistos das sementes. As sementes devem ser dispostas em proveta de 2,0L, contendo cerca de 5,0mL de água e agitadas com movimentos rotatórios até seu completo umedecimento. Completar o volume da proveta com água e verter os resíduos e cistos flutuantes em peneira de 20 mesh (0,840mm), sobreposta em peneira de 60 mesh (0,250mm), agitando-se suavemente a proveta de modo que todo o material flutuante em suspensão seja recolhido nas peneiras e com um mínimo de perturbação das sementes. Com auxílio de pisseta deve-se recolher a suspensão contendo resíduos e cistos da peneira de 60 mesh para um becker de 100mL. A suspensão recolhida no becker deve ser analisada ao microscópio estereoscópico.

Para identificar a presença de cistos de *Heterodera* em germoplasmas introduzidos no Brasil, Tenente *et al.* (1994) empregaram metodologia descrita por Carvalho *et al.* (1953), onde as sementes foram colocadas em frascos com 50 mL de água, os quais foram agitados durante 10 minutos. A estes adicionou-se uma solução de sacarose (400 g/L de água) e, novamente, agitou-se por mais 10 minutos. Após, a suspensão foi vertida em um novo recipiente, onde permaneceu por 10 minutos. Posteriormente, a suspensão foi despejada em um filtro (papel de filtro). Após o escoamento, o material retido no papel foi examinado.

- **Avaliação**

Fêmeas de *Heterodera glycines* apresentam de 0,4 a 0,8mm de comprimento, forma de limão, 300-600 micrômetros de diâmetro, com pescoço e uma vulva subterminal próxima ao ânus; são de coloração brancas ou amarelas quando imaturas, mas com a maturidade ficam pretas ou marrons.(Figura 115).

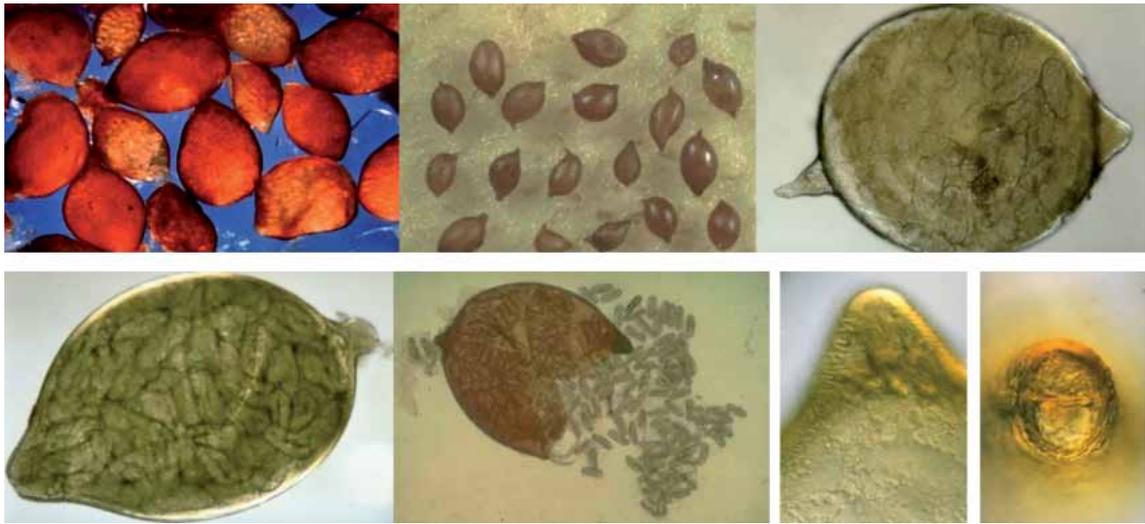


Figura 115 - *Heterodera glycines*

5.4.2 Detecção de *Aphelenchoides besseyi* e *Ditylenchus dipsaci* em amostras de sementes de *Brachiaria*

- **Quantidade de sementes para análise:** 5 x 10g de sementes

- **Procedimento**

Flutuação dos nematóides em solução de sacarose com caulim em centrífuga, e passagem por peneiras de malha de 0,037mm de abertura (400 mesh) ou 0,027mm (500 mesh), com ou sem hidratação prévia das sementes durante doze horas.

- **Método de Coolen & D'herde (1972)**

As sementes são trituradas com 200mL de água durante 10 segundos em liquidificador e a suspensão resultante da trituração é coada em peneiras de 20 mesh sobre outra de 400 ou 500 mesh. Com o auxílio de jatos fortes de água de uma pisseta, recolhe-se a suspensão de nematóides mais os tecidos vegetais da peneira de 400 ou 500 mesh em um becker com capacidade para 100mL. Recolhe-se, no máximo, 40mL ou a quantidade que cabe nos tubos da centrífuga. Em seguida, verte-se a suspensão para os tubos da centrífuga onde adiciona-se 1,0g de caulim. Calibrar o volume dos tubos. Mistura-se bem com bastão de vidro e procede-se a centrifugação, durante 4 a 5 minutos a 1750 rpm. Após, retira-se os tubos da centrífuga e elimina-se cuidadosamente o líquido sobrenadante. Adiciona-se a estes a solução de sacarose (454 gramas de açúcar refinado dissolvidos em 750mL de água). Misturar bem com auxílio do bastão de vidro para que o pelete seja diluído. Retorna-se os tubos para a centrífuga e procede-se a centrifugação por um minuto a 1750 rpm. Deve-se tomar cuidado com o tempo de centrifugação para não provocar osmose e a morte de nematóides.

Após esta operação verte-se o sobrenadante para peneira de 400 ou 500 mesh inclinada. Verte-se bastante água da torneira para eliminar o excesso de sacarose e, com o auxílio de jatos fortes de água da pisseta, recolhe-se a suspensão em becker com capacidade para 100mL. Deste, recolhe-se 20mL para observação, identificação e contagem das espécimes (Tihohod, 1989).

Favoreto *et al.* (2006), compararam a eficiência de métodos para extração de *A. besseyi* e *D. dipsaci*, em sementes de *Brachiaria brizantha*, e observaram que o método de Coolen & D'herde (1972) sem a hidratação das sementes foi mais eficiente na recuperação dos nematóides.

- **Avaliação**



Figura 116 - *Aphelenchoides besseyi* (A) e *Ditylenchus dipsaci* (B).

5.4.3 Detecção de *Aphelenchoides besseyi* e *Ditylenchus dipsaci* em amostras de sementes de *Panicum*

- **Quantidade de sementes para análise:** 5 x 0,5g de sementes (@ 250 sementes)
- **Procedimento**

Para a maioria dos endoparasitas, a técnica de trituração proporciona maior liberação e movimento em direção à água, implicando na detecção de espécimes em períodos menores de extração. Entretanto, essa técnica tem que estar associada a uma outra que permita clarear a amostra, como o funil de Baermann, que serve para formas vermiformes, como *A. besseyi* e *D. dipsaci* (Fortuner, 1991). A técnica da bandeja, descrita por Whitehead & Hemming (1965), apresenta o mesmo princípio do funil de Baermann, aplicando-se clareamento das amostras, porém com maior volume de água, o que permite o aumento da oxigenação, proporcionando melhor movimento dos parasitas em direção à água, facilitando, assim, a detecção.

- **Pré-imersão, trituração e funil de Baermann** (Fortuner, 1991; Zuckermann, 1990; Hooper, 1970)

A associação destes métodos proporciona uma melhoria considerável na recuperação de espécies que apresentam o fenômeno de dormência e anidrobiose e de sementes de *Panicum*, que são envolvidas por diversas camadas externas como glumas e glumelas, eliminando a falta de oxigenação no sistema do funil de Baermann.

As sementes são colocadas em pré-imersão em placas de Petri ou caixa do tipo Gerbox com água, onde devem permanecer por 16 horas (20-25°C). Decorrido este período, promove-se a trituração por 20 segundos do material recolhido dos recipientes (água e as sementes). Após, transfere-se o conteúdo para peneira de 20 mesh sobre outra de 400 ou 500 mesh. Com auxílio de pisseta, procede-se a lavagem e na sequência recolhe-se a suspensão obtida na peneira de 400 ou 500 mesh para becker de 100mL. Esta suspensão, contendo os nematóides e impurezas, é vertida sobre um funil de Baermann, que consiste de funil cônico de vidro ou de plástico, com um tubo de borracha ligado à base deste e, conectado na extremidade a uma ampola de vidro. No interior do topo do funil descansa um suporte de malha de aço ou tela plástica (peneira). Sobre a tela deve ser disposto um lenço de papel tipo facial ou outro papel adequado, a fim de reter as sementes e, sobre estas é adicionada água de torneira. Decorridos de 12 a 24 horas, deve-se depreender a ampola de vidro do tubo de borracha ligado à base do funil e, recolher-se o conteúdo para posterior contagem em lâmina de Peters, sob microscópio ótico.

5.4.4. Detecção de *Aphelenchoides besseyi* em sementes de arroz

- **Número de sementes para análise:** 5 x 100 sementes
- **Procedimento**

Huang & Mota Silva (1982) observaram que praticamente 100% dos exemplares viáveis de *A. besseyi* podem ser detectados pelo método de descascamento manual das sementes. No entanto, a operação é muito trabalhosa e demanda um considerável suporte. Para laboratórios de sementes em grande escala, é desejável ter um suporte técnico e econômico. São necessárias pesquisas adicionais para mecanizar o processo de descascamento das sementes sem liberar os materiais do endosperma. A mecanização deve facilitar a detecção clínica dos nematóides. Uma tarefa importante para pesquisas futuras, então, é estudar técnicas de laboratório para detecção satisfatória de nematóides em operações de grande escala.

- **Método do descascamento manual de sementes + funil de Baermann** (Flegg; Hooper, 1970)

O método consiste em eliminar a casca e a cariópse das sementes após a imersão destas em água por determinado período de tempo. Este material é lavado em peneira padrão de 400 mesh para que sejam eliminadas as substâncias leitosas liberadas pelo endosperma. O material resultante do peneiramento (nematóides e restos de casca e cariópse) é recolhido com o auxílio de pisseta para um Becker de 100mL e, posteriormente, transferido para o funil de Baermann onde permanece pelo menos por 12-24 horas, para extração dos nematóides ativos.

- **Pré-imersão, trituração e funil de Baermann** (Garcia; Tenente, 2000)

As sementes são imersas em água destilada (@ 30 minutos), para rehidratação dos nematóides em estado de anidrobiose. Esse tratamento prévio de pré-imersão facilita a fragmentação das sementes em liquidificador, feita a seguir por 20 segundos com 300mL de água. A suspensão resultante é passada pelas peneiras de 100 (0,150 mm) e 400 mesh e o material retido é disposto em funis de Baermann com água oxigenada a 0,5%. Os sedimentos são coletados e examinados ao microscópio ótico após 24, 48 e 72 horas, aproximadamente.

5.4.5 Detecção de *Ditylenchus dipsaci* em sementes de cebola

- **Quantidade de sementes para análise:** 5 x 50 ou 100g de sementes
- **Procedimento**

É mais rápido e eficiente que as técnicas de incubação geralmente utilizadas para tecidos vegetais. Também pode ser usada para recuperação de endoparasitas de folhas, hastes e também para detecção de juvenis de *A. tritici* em sementes de trigo e de outras gramíneas e de *D. dipsaci* em sementes de trevo (Southey, 1969).

- **Método da trituração e filtração para recuperação de endoparasitas migradores** (Fallis, 1943; Stemerding, 1964)

As sementes são trituradas em água durante 15 segundos, sendo 5 segundos para o triturador alcançar a velocidade máxima, 5 segundos permanecendo em velocidade máxima e 5 segundos para a parada. Este período é suficiente para facilitar a saída dos nematóides dos tecidos sem danificá-los. Após, a suspensão resultante é vertida em um papel de filtro ou lenço de papel apoiado numa peneira ou tela plástica. O conjunto é disposto sobre um prato ou bandeja com água, onde deve permanecer durante 24 a 48 horas. Os nematóides separados das partículas inertes movimentam-se pelo filtro e são recuperados no prato, para posteriormente serem quantificados em lâmina de Peters, sob microscópio ótico.

5.4.6 TÉCNICAS MOLECULARES X NEMATÓIDES X SEMENTES

Técnicas moleculares constituem uma ferramenta que em muito pode auxiliar na detecção e identificação de organismos de forma rápida e segura, possibilitando investigações ao nível de ácidos nucleicos ou de produtos gênicos. Especificamente na detecção de microrganismos em sementes, as técnicas moleculares têm sido de extrema relevância, havendo um crescente interesse na investigação neste campo em todo o mundo. Na medida em que o controle de qualidade de sementes é uma preocupação no sentido de garantir material de propagação livre de patógenos e com identidade genética comprovada, além de outros atributos, metodologias de precisão ganham importância. A necessidade de desenvolver métodos mais rápidos e confiáveis para detectar patógenos associados com sementes tem sido um desafio enfrentado por pesquisadores que trabalham com controle de qualidade de sementes. Neste sentido, análise de ácidos nucleicos surge como uma alternativa importante e tem sido objeto de intensas pesquisas nas duas últimas décadas. Embora técnicas moleculares tenham apresentado muitas vantagens, tal desenvolvimento ainda requer precauções, posto que programas de certificação de sementes caracterizam-se por particularidades que podem limitar uma aplicação mais extensiva dessas técnicas em análise de rotina. Sem levar em conta os custos que, inicialmente, podem ser elevados devido a investimentos em equipamentos especializados e reagentes, alguns outros aspectos devem ser considerados em relação à detecção de patógenos em extratos de sementes (Parizzi, 2002).

Métodos que empregam técnicas moleculares para a identificação de patógenos são variáveis e, principalmente, baseados em análises de DNA genômico. Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos com marcadores moleculares, devido à necessidade de identificação rápida e segura de raças do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines* (Bertioli *et al.*, 1998), e de espécies de *Anguina* e *Ditylenchus*, comumente transmitidos através de sementes, baseando-se nas sequências do gene ribossomal ITS1 (Bertioli, 2001; Powers *et al.*, 2001). Estes métodos podem eliminar os problemas de ambigüidade envolvendo a identificação de espécimes jovens, os quais são encontrados geralmente no interior de galhas em sementes ou resíduos destas após a germinação. Esta metodologia pode prover uma padronização para identificação em sistemas de fiscalização que, quando falhos, podem resultar em impactos econômicos significativos.

5.4.7 TÉCNICA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS NEMATÓIDES

Existem diferentes técnicas para quantificação de nematóides em uma suspensão final, obtida pelas técnicas descritas anteriormente. A seguir está descrita a técnica para quantificação mais utilizada em trabalhos de rotina em Laboratórios de Nematologia.

A suspensão com os possíveis nematóides (máximo 20mL), contidas em beakers de 100mL, devem ser decantadas por, no mínimo, uma hora ou, então, no fim do expediente. Durante esse tempo os beakers podem ser acondicionados na geladeira para que no dia seguinte, inicie-se a próxima etapa. Com auxílio de uma seringa com capacidade para 20mL ou mais, tendo na extremidade acoplada uma mangueira fina (a exemplo da usada em hospitais para aplicação de soro), reduz-se o volume de água da suspensão, deixando-se apenas 4mL. A partir desse ponto a suspensão estará pronta para a contagem. Para tanto deve ser empregado uma lâmina de Peters para contagem, com capacidade para 1mL. O número de nematóides é obtido através da multiplicação do número observado na lâmina por 4 (os 4mL iniciais) para se obter o resultado final. Deve-se proceder à contagem em três repetições para maior consistência da análise.

Caso não se possua uma câmara de contagem de Peters, pode-se improvisar, empregando-se caixas de plástico transparente (tampas de caixas de lâminulas para microscopia) bastando riscar-se a base da caixa para direcionar a visão durante a contagem. Sobre esta vertem-se os 4mL de suspensão e procede-se a contagem sob microscópio estereoscópico (lupa) no maior aumento. Uma desvantagem dessa improvisação é que a contagem não pode ser realizada em microscópio binocular, a não ser no caso do microscópio invertido.

Terminado o processo de contagem, os nematóides da suspensão podem ser mortos e fixados tendo em vista guardá-los para futuras observações ou mesmo para a “pescaria” de exemplares para o preparo de lâminas permanentes. Após as avaliações, o material deve ser levado para banho-maria e este mantido

a temperatura de 55 °C. Caso não se possua esse equipamento, pode-se empregar um becker com diâmetro maior, com água aquecida a 55°C, e no seu interior introduz-se o outro becker contendo as suspensões. Este deve permanecer em banho-maria durante 2 a 4 minutos, até que todos os nematóides morram.

Após a morte, estes podem ser fixados imediatamente. Caso contrário esse material será perdido. Para a fixação pode ser empregada a formalina a 4%, em concentração dupla (adiciona-se 4mL de formalina e formol a 4%, nos 4 mL da suspensão). Os 8mL de suspensão, assim obtidos, devem ser vertidos para vidros (capacidade para 10mL), devidamente limpos e, estes etiquetados com todos os dados sobre a suspensão: data, origem, nematóides, número da amostra etc. Os vidros, assim preparados, podem ser guardados por anos sem que ocorra a destruição dos exemplares.

BIBLIOGRAFIA



AFGC Protocols, Update August, 2002. Disponível em: <http://www.arabdopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm#isolation>. Acesso em 10/09/06.

ALBRECHTSEN, S. E. Testing methods for seed-transmitted viruses: Principles and protocols. Cambridge, MA: CABI Publishing, 2006. 268p.

ALVAREZ, A.M., BENEDICT, A.A., MIZUMOTO, C.Y., HUNTER, J.E.; GABRIEL, D.W. Serological, pathological, and genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* infecting crucifers. **Phytopathology**, 84, p.1449-1457. 1994.

ASMA, M. Proposal for a new method for detecting *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* on carrot seeds. ISTA Method Validation Reports 2, p.1-17. 2005.

ASMA, M., de Vogel, R., Woudt, B. and Krause, D. Evaluation of pathogenicity testing, rep-fingerprinting and PCR for the identification of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, ISHI Report Bejo Zaden BV, **Research Report**. p.9316-9317. 2002.

AUDY, P.; LAROCHE, A.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; GILBERTSON, R.L. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c.* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, using the polymerase chain reaction. **Phytopathology**, 84, p.1185-1192. 1994.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B.; **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1998. 218 p.

BERTIOLI, S.C.M.L. et al. Desenvolvimento de marcadores moleculares para a identificação de raças do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines*. Brasília: CENARGEN/Embrapa, 1998. p.1-4. (Pesquisa em Andamento).

BRADBURY, J. F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria : CAB International Mycological Institute.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: CLAV; DNDV; SNAD; MA, 1992. 365p.

BROADBENT, L. The epidemiology of tomato mosaic. XI. Seed transmission of TMV. **Annual Applied Biology**, 56, p.177-205. 1965.

CAMPBELL, R. N. In: Descriptions of Plant Viruses. DPV name index n°. 43. Photo Courtesy of R. Lastra, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas Disponível em: <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=43&figno=08>. Acesso em: 21/01/2008.

CARVALHO, J.C.; LORDELLO, L.G.E.; BOOCK, O.J. Considerações acerca do nematóide dourado da batatinha. **O Biológico**, 19, p.196-200. 1953.

CHANG, C.J., DONALDSON, R., CROWLEY, M.; PINNOW, D. A new semi-selective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seed. **Phytopathology**, 81, p. 449-453. 1991.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolation RNA from Pine Trees. **Plant Molecular Biology Report**, 11, p. 113-116, 1993.

- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, 34, p. 475-483, 1977.
- CUBETA, M.S.; KUAN, T.L. Comparison of MD5 and XCS media and development of MD5A medium for detection of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* in carrot seed. **Phytopathology**, 76, p.1109. 1986.
- DINANT, S.; LOT, H. *Lettuce Mosaic Virus*. **Plant Pathology**, 41, p.528-42. 1992.
- EDEN, P.A.; SCHMIDT, T.M.; BLAKEMORE, R.P.; PACE, N.R. Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using Polymerase Chain Reaction Amplified 16S rRNA specific DNA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 41, p. 324-325. 1991.
- ELLIS, M.B. Dematiaceous hyphomycetes. Surred: Commonwealth Mycological Institute, **Commonwealth Agricultural Bureaux**, CAB, 1971. 608p.
- FALLIS, A.M. Use of the waring blender to separate smallparasites from tissue. **Canadian Journal of Public Health**, 34, p.44. 1943.
- FATMI, M.; SCHAAD, N.W. A semi-selective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seeds. **Phytopathology**, 78, p.121-126. 1988.
- FIGUEIRA, A. R., DOMIER, L.L., D'ARCY, C. J. Comparison of the techniques for detection of Barley Yellow Dwarf Virus- PAV-IL. **Plant Disease**, 81, p. 1236-1240. 1997.
- GENG, S., CAMPBELL, R.N., CARTER, M.; HILLS, M. Quality control programs for seedborne pathogens. **Plant Disease** 67, p. 236-242. 1987.
- GERMAN-RETANA, S.; WALTER, J.; LE GALL, O. *Lettuce mosaic virus*: from pathogen diversity to host interactors. **Molecular Plant Pathology**, 9(2), p.127-36. 2008.
- GOSZCZYNSKA, T.; SERFONTEIN, J.J. Milk-Tween agar, a semiselective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Journal of Microbiological Methods**, 32, p.65-72. 1998.
- GUIMARÃES, P.M.; PALMANO, S.; SMITH, J.J.; SÁ, M.F.G.; SADDLER, G.S. Development of a PCR test for detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Antonie van Leeuwenhoek** 80, p. 1-10. 2001.
- HALFON-MEIRI, A.; VOLCANI, Z. A combined method for detecting *Colletotrichum gossypii* and *Xanthomonas malvacearum* in cotton seed. **Seed Science and Technology**, 5, p.129-139. 1977.
- HOCH, H. C, PROVVIDENTI, R. Ultrastructural localization of *Bean common mosaic virus* in dormant and germinating seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, 68, p.327-330. 1978.
- HUNTER, D.G., BOWYER, J.W. Cytopathology of developing anthers and pollen mother cells from lettuce plants infected by *Lettuce mosaic potyvirus*. **Journal of Phytopathology**, 145, p.521-524, 1997.
- INGLATERRA. Commonwealth Agricultural Bureaux. Commonwealth Mycological Institute. (CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria) 1980.

ISTA, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland. International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods, 2008.

JOHANSEN, E., EDWARDS, M.C.; HAMPTON, R.O. Seed transmission of viruses: current perspectives. **Annual Review of Phytopathology**, 32, p.363–386. 1994.

JONES, J.B.; McCARTER S.M.; GITAITIS, R.D. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato. In: SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. (eds.) **Detection of bacteria in seed and other planting material**. APS Press. 1989.

KOENRAADT, H., VAN BILSEN, J.G.P.M.; ROBERTS, S.J. Comparative test for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica seeds. **Seed Science and Technology**, 32, p.825-835. 2005.

KUAN, T.L., MINSAVAGE, G.V.; GABRIELSON, R.L. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* in carrot seed. **Plant Disease**, 69, p.758-760. 1985.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D.J.; TENENTE, R. C. V. ITS Sequence of Brazilian Populations of the Plant-Parasitic Nematode *Ditylenchus dipsaci*. **Nematologia Brasileira**, 24, p.83-85. 2000.

LE GALL, O. 2003. In: Descriptions of Plant Viruses. DPV name index n°. 399. Photo National Vegetable Research Station, UK. Disponível em: <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=399&figno=07>. Acesso em: 21/01/2008.

LIMA, B.V.; SOARES, D.J.; PEREIRA.; BARRETO, R. W. Natural infection of *Acalypha hispida* and *Jatropha podagrica* inflorescences by *Amphobotrys ricini* in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v.3, p.5-7. 2008.

MACHADO, J.C.; LANGERAK, C.J.; JACCOUD-FILHO, D.S. Seed-Borne Fungi- A contribution to Routine Seed Health Analysis. **International Seed Testing Association (ISTA)**, First edition, n.138, 2002.

MARTHUR, S.B.; KONGSDAL, O. **Common laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi**. Bassersdorf: International Seed Testing Association, 2003. 425p.

MATHUR, S.B.; CUNFER, B.M. Seed-borne Disease and Seed Health Testing of Wheat. Institute of Seed Pathology. Frederiksberg, Denmark, 1993. 168p.

MCGUIRE, R.G., JONES, J.B.; SASSER, M. Tween media for the semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. **Plant Disease**, 70, p. 887-891. 1986.

MEDINA, A. C., GROAN, R. G. Seed transmission of bean mosaic viruses. **Phytopathology**, 51, p.452-456. 1961.

MEHTA, Y.R.; BOMFETI, C.; BOLOGNINI, V. A semi-selective agar medium to detect the presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in naturally infected cotton seed. **Fitopatologia Brasileira**, 30, p. 489-496. 2005.

MENG, X.Q., UMESH, K.C., DAVIS, R.M.; GILBERTSON, R.L. Development of PCR based assays

for detecting the carrot bacterial leaf blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* from different substrates. **Plant Disease**, 88, p.1226-1234. 2004.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: MacMillan Press, v.1, 839p. 1979.

ONIONS, A.H.S.; ALLSOPP, D.; EGGINS, H.O.W. Smith's Introduction to Industrial Mycology. Seventh edition, 1981, 398p.

PARIZZI, P. Técnicas moleculares aplicadas à patologia de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 7, 2002, Sete Lagoas, MG. Resumos e Palestras. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. p.183-186.

POWERS, T.O., SZALANSKI, A. L.; MULLIN, P. G.; HARRIS, T. S.; BERTOZZI, T.; GRIESBACH J. A. Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. **Journal of Nematology**, 33, p.191-194. 2001.

PROVVIDENTI, R, COBB, ED. Seed transmission of *Bean common mosaic virus* in tepary bean. **Plant Disease Reporter**, 59, p.966-969. 1975.

QUANTZ, L., Untersuchungen über das gewöhnliche Bohnenmosaikvirus und das Sojamosaikvirus. **Phytopathology Z.**, 43, p.79-101. 1961.

REDSTONE, S. Extraction methods for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from brassica seed. **Seed Science and Technology**, 32, p.439-453. 2004.

ROBERTS, S.J.; KOENRAADT, H. ISTA-PDC Technical report: Revised method for *detection* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica seed. ISTA Method Validation Reports 1, 1-9. 2003.

ROBERTS, S.J., BROUGH, J., EVERETT, B.; MORALES, F. J. 1988. In: Descriptions of Plant Viruses. DPV name index n°. 337. <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=337&figno=09>. Acesso em: 21/01/2008.

RYDER, E.J. Seed transmission of *Lettuce mosaic virus* in mosaic resistant lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 98, p.610-614. 1973.

RYDER, E. J. Transmission of common *Lettuce mosaic virus* through the gametes of lettuce plants. **Plant Disease Reporter**, 48, p.522-523. 1964.

SAETTLER, A.W., SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. (Eds.). Detection of bacteria in seeds and other planting material. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 1989. 122p.

SCHAAD, N.W.; CHEONG, S.S.; TAMAKI, S.; HATZILOUKAS, E.; PANOPOULOS, N.P. A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. **Phytopathology**, 85, p. 243-248. 1995.

SCHAAD, N.W.; FRANKEN, A.A.J.M. ISTA Handbook on Seed Health Testing Working Sheet No 50 (2nd Ed): *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. ISTA, Zurich, Switzerland. 1996.

SCHAAD, N.W.; JONES, J. B.; CHUN, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3. ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 2001. 373 p.

SHEPHERD, A.M. Extraction and estimation of *Heterodera*. SOUTHEY, J. F. **Laboratory methods for works with plant and soil nematodes**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1970. p.23-33. (Technical Bulletin, 2).

SOARES, F.M.P.; VALARINI, P.J.; MENTEN, J.O.M. Meio semi-seletivo para detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente causal da mancha bacteriana pequena do tomateiro. **Revista Brasileira de Sementes**, 23, p. 21-26. 2001.

SOUTHEY, J. F. A gall forming nematode (*Anguina* sp.) parasitic on cocksfoot grass. **Plant Pathology**, 18, p.164-166. 1969.

TAYLOR RH, GROGAN RG, KIMBLE KA Transmission of *Tobacco mosaic virus* in tomato seed. **Phytopathology**, 51, p.837-842. 1961.

TENENTE, R.C.V. et al. Seed health testing for nematode detection and treatment of plant germplasm in Brazil. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.22, p.415-420, 1994.

TENENTE, R. C. V.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.. ITS Sequence of Populations of the Plant-Parasitic Nematode *Ditylenchus dipsaci*. **Nematologia Brasileira**, 24, n.1, p.83-86. 2000.

TENENTE, R. C. V.; VIANELLO, R. P.; PINHEIRO, F. P. Reprodução de *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filyqjev, 1936 em diferentes plantas hospedeiras do Brasil. **Nematologia Brasileira**, 24, n. 1, p.87-90. 2000.

TIHOHOD, D. Nematologia Agrícola. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1989. v. 1, 80 p.

TOSIC, M. SUTIC, D. PESIC, Z. Transmission of Tobacco Mosaic Virus through Pepper (*Capsicum annum* L.). **Seed**, 97, p. 1-96.1980.

VAN WINCKEL, A., GCYPENS, M. Inactivering van Tabakmosaiekvirus in de grond. **Parasitica**, 21, p.124-28. 1965.

WATERS, C.M.; BALKAN, H.A. An improved semi-selective medium for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. **Phytopathology**, 82, p.1072. (Abstract) 1992.

WETTER, C. 1988. *Pepper mild mottle virus*. In: Description of Plant Viruses. DPV name index n°. 330. Disponível em: <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=330&figno=06>. Acesso em: 21/01/2008.

WILLIFORD, R.E.; SCHAAD, N.W. Agar medium for selective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* from carrot seeds. **Phytopathology**, 74, p.1142. 1984.

ZAITLIN, M. 2000. *Tobacco mosaic virus* (TMV). Descriptions of Plant Viruses- DPV name Index. n° 370. Photo courtesy of Oscar Bradfute, Ohio State University. Disponível em: <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=370&figno=03>. Acesso em: 21/01/ 2008.

ÍNDICE REMISSIVO



PATÓGENO	HOSPEDEIRO	PÁGINA
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Zea mays</i>	85
<i>Alternaria alternata</i>	-	94
<i>Alternaria brassicae</i>	<i>Brassicae oleraceae</i>	46
<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>Brassicae oleraceae</i>	47
<i>Alternaria dauci</i>	<i>Daucus carota</i>	50
<i>Alternaria helianthi</i>	<i>Helianthus annuus</i>	62
<i>Alternaria macrospora</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	57
<i>Alternaria porri</i>	<i>Allium cepa</i>	45
<i>Alternaria radicina</i>	<i>Daucus carota</i>	51
<i>Alternaria ricini</i>	<i>Ricinus communis</i>	76
<i>Alternaria zinniae</i>	<i>Helianthus annuus</i>	63
<i>Amphobotrys ricini</i>	<i>Ricinus communis</i>	75
<i>Aphelenchoides bessey</i>	<i>Oryza sativa</i>	182
<i>Aphelenchoides</i> sp.	<i>Brachiaria spp.</i>	180
<i>Aphelenchoides</i> sp.	<i>Panicum maximum</i>	181
<i>Ascochyta pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	35
<i>Aspergillus candidus</i>	-	92
<i>Aspergillus flavus</i>	-	92
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	92
<i>Aspergillus glaucus</i>	-	92
<i>Bean common mosaic virus</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	173
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Triticum aestivum</i>	80
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	58
<i>Cercospora kikuchii</i>	<i>Glycine max</i>	52
<i>Chaetomium</i> sp.	-	95
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	96
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	112
<i>Colletotrichum gossypii</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	59
<i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	60

<i>Colletotrichum graminicola</i>	<i>Sorghum</i> sp.	77
<i>Colletotrichum graminicola</i>	<i>Zea mays</i>	86
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	69
<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Glycine max</i>	53
<i>Curtobacterium flaccunfasciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	119
<i>Curvularia</i> sp.	-	97
<i>Didymella bryoniae</i>	<i>Cucumis melo</i>	49
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	<i>Allium cepa</i>	183
<i>Ditylenchus</i> sp.	<i>Brachiaria spp.</i>	180
<i>Ditylenchus</i> sp.	<i>Panicum maximum</i>	181
<i>Drechslera oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	64
<i>Drechslera sorghicola</i>	<i>Sorghum</i> sp.	78
<i>Drechslera tritici-repentis</i>	<i>Triticum aestivum</i>	81
<i>Drechslera turcica</i>	<i>Sorghum</i> sp.	78
<i>Drechslera turcica</i>	<i>Zea mays</i>	87
<i>Epicoccum purpurascens</i>	-	97
<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	82
<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Zea mays</i>	88
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	61
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	71
<i>Fusarium semitectum</i>	<i>Glycine max</i>	54
<i>Fusarium solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	71
<i>Fusarium sub-glutinans</i>	<i>Sorghum</i> sp.	78
<i>Fusarium sub-glutinans</i>	<i>Zea mays</i>	89
<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Sorghum</i> sp.	78
<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Zea mays</i>	88
<i>Gerlachia oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	65
<i>Heterodera glycines</i>	<i>Glycine max</i>	178
<i>Lettuce mosaic virus</i>	<i>Lactuca sativa</i>	166
<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Glycine max</i>	55

<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	72
<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Sorghum</i> sp.	79
<i>Nigrospora</i> sp.	-	98
<i>Penicillium</i> sp.	-	92
<i>Pepper mild mottle virus</i>	<i>Capsicum</i> spp.	153
<i>Periconia</i> sp.	-	101
<i>Peronospora manshurica</i>	<i>Glycine max</i>	32
<i>Phaeoisariopsis griseola</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	70
<i>Phoma sorghina</i>	<i>Oryza sativa</i>	66
<i>Phoma sorghina</i>	<i>Sorghum</i> sp.	79
<i>Phomopsis sojae</i>	<i>Glycine max</i>	55
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	114
<i>Pyricularia grisea</i>	<i>Triticum aestivum</i>	83
<i>Pyricularia oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	67
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Glycine max</i>	56
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	61
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Oryza sativa</i>	67
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	73
<i>Rhizopus stolonifer</i>	-	71
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Brassicae oleraceae</i>	48
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Glycine max</i>	56
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	29
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Helianthus annuus</i>	63
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Lactuca sativa</i>	63
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	74
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Pisum sativum</i>	74
<i>Squash mosaic virus</i>	<i>Cucurbita</i> spp.	161
<i>Stagonospora nodorum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	84
<i>Stenocarpella macrospora</i>	<i>Zea mays</i>	91
<i>Stenocarpella maydis</i>	<i>Zea mays</i>	90
<i>Tilletia caries</i>	<i>Triticum aestivum</i>	32

Tobamovirus	<i>Capsicum</i> sp.	152
Tobamovirus (TMV, ToMV)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	170
<i>Trichoconiella padwickii</i>	<i>Oryza sativa</i>	68
<i>Trichoderma</i> sp	-	100
<i>Trichotecium</i> sp	-	101
<i>Ustilago tritici</i>	<i>Triticum aestivum</i>	44
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	109
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	119
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>Brassicae oleraceae</i>	104
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	117
<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	<i>Daucus carota</i>	106

HOSPEDEIRO	PATÓGENO	PÁGINA
-	<i>Alternaria alternata</i>	94
-	<i>Aspergillus candidus</i>	92
-	<i>Aspergillus flavus</i>	92
-	<i>Aspergillus ochraceus</i>	92
-	<i>Aspergillus glaucus</i>	92
-	<i>Chaetomium</i> sp.	95
-	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	96
-	<i>Curvularia</i> sp.	97
-	<i>Epicoccum purpurascens</i>	97
-	<i>Nigrospora</i> sp.	98
-	<i>Penicillium</i> sp.	92
-	<i>Periconia</i> sp.	101
-	<i>Rhizopus stolonifer</i>	71
-	<i>Trichoderma</i> sp	100
-	<i>Trichotecium</i> sp	101
<i>Allium cepa</i>	<i>Alternaria porri</i>	45

<i>Allium cepa</i>	<i>Ditylenchus dipsaci</i>	183
<i>Brachiaria spp.</i>	<i>Aphelenchoides sp.</i>	180
<i>Brachiaria spp.</i>	<i>Ditylenchus sp.</i>	180
<i>Brassicaceae oleraceae</i>	<i>Alternaria brassicae</i>	46
<i>Brassicaceae oleraceae</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>	47
<i>Brassicaceae oleraceae</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	48
<i>Brassicaceae oleraceae</i>	<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	104
<i>Capsicum sp.</i>	Tobamovirus	152
<i>Capsicum spp.</i>	<i>Pepper mild mottle virus</i>	153
<i>Cucumis melo</i>	<i>Didymella bryoniae</i>	49
<i>Cucurbita spp.</i>	<i>Squash mosaic virus</i>	161
<i>Daucus carota</i>	<i>Alternaria dauci</i>	50
<i>Daucus carota</i>	<i>Alternaria radicina</i>	51
<i>Daucus carota</i>	<i>Xanthomonas hortorum pv. carotae</i>	106
<i>Glycine max</i>	<i>Cercospora kikuchii</i>	52
<i>Glycine max</i>	<i>Colletotrichum truncatum</i>	53
<i>Glycine max</i>	<i>Fusarium semitectum</i>	54
<i>Glycine max</i>	<i>Heterodera glycines</i>	178
<i>Glycine max</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	55
<i>Glycine max</i>	<i>Peronospora manshurica</i>	32
<i>Glycine max</i>	<i>Phomopsis sojae</i>	55
<i>Glycine max</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	56
<i>Glycine max</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	56
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Alternaria macrospora</i>	57
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Botryodiplodia theobromae</i>	58
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Colletotrichum gossypii</i>	59
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Colletotrichum gossypii var. cephalosporioides</i>	60
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	61
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	61
<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	29

<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	109
<i>Helianthus annuus</i>	<i>Alternaria helianthi</i>	62
<i>Helianthus annuus</i>	<i>Alternaria zinniae</i>	63
<i>Helianthus annuus</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	63
<i>Lactuca sativa</i>	<i>Lettuce mosaic virus</i>	166
<i>Lactuca sativa</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	63
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	112
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	114
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tobamovirus (TMV, ToMV)	170
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	117
<i>Oryza sativa</i>	<i>Aphelenchoides bessey</i>	182
<i>Oryza sativa</i>	<i>Drechslera oryzae</i>	64
<i>Oryza sativa</i>	<i>Gerlachia oryzae</i>	65
<i>Oryza sativa</i>	<i>Phoma sorghina</i>	66
<i>Oryza sativa</i>	<i>Pyricularia oryzae</i>	67
<i>Oryza sativa</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	67
<i>Oryza sativa</i>	<i>Trichoconiella padwickii</i>	68
<i>Panicum maximum</i>	<i>Aphelenchoides</i> sp.	181
<i>Panicum maximum</i>	<i>Ditylenchus</i> sp.	181
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Bean common mosaic virus</i>	173
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	69
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Curtobacterium flaccunfasciens</i>	119
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>	71
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Fusarium solani</i>	71
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	72
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Phaeoisariopsis griseola</i>	70
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	73
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	74
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	119

<i>Pisum sativum</i>	<i>Ascochyta pisi</i>	35
<i>Pisum sativum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	74
<i>Ricinus communis</i>	<i>Alternaria ricini</i>	76
<i>Ricinus communis</i>	<i>Amphobotrys ricini</i>	75
<i>Sorghum</i> sp.	<i>Colletotrichum graminicola</i>	77
<i>Sorghum</i> sp.	<i>Drechslera sorghicola</i>	78
<i>Sorghum</i> sp.	<i>Drechslera turcica</i>	78
<i>Sorghum</i> sp.	<i>Fusarium sub-glutinans</i>	78
<i>Sorghum</i> sp.	<i>Fusarium verticillioides</i>	78
<i>Sorghum</i> sp.	<i>Macrophomina phaseolina</i>	79
<i>Sorghum</i> sp.	<i>Phoma sorghina</i>	79
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	80
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Drechslera tritici-repentis</i>	81
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	82
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Pyricularia grisea</i>	83
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Stagonospora nodorum</i>	84
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Tilletia caries</i>	32
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Ustilago tritici</i>	44
<i>Zea mays</i>	<i>Acremonium strictum</i>	85
<i>Zea mays</i>	<i>Colletotrichum graminicola</i>	86
<i>Zea mays</i>	<i>Drechslera turcica</i>	87
<i>Zea mays</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	88
<i>Zea mays</i>	<i>Fusarium sub-glutinans</i>	89
<i>Zea mays</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	88
<i>Zea mays</i>	<i>Stenocarpella macrospora</i>	91
<i>Zea mays</i>	<i>Stenocarpella maydis</i>	90

ISBN 978-85-99851-64-7



9 788599 851647 >



Secretaria de
Defesa Agropecuária

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

