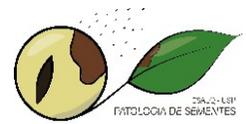


MICROORGANISMOS TRANSPORTADOS E TRANSMITIDOS PELAS SEMENTES

- * Bactérias
- * Vírus
- * Nematoides
- * **Fungos**

TERMINOLOGIA

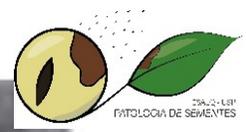
- **Transporte:** patógeno levado pela semente
Avaliação: Detecção nas sementes
- **Transmissão:** patógeno transmitido pela semente
Avaliação: Sintoma na plântula/planta
- **Associação:** a maneira como o patógeno é transportado pela semente
 - **Importância:** tomada de decisões (métodos, tratamentos)



FORMAS DE ASSOCIAÇÃO

- ***Contaminação concomitante:** estruturas do patógeno transportadas juntamente com o lote
- ***Contaminação:** estruturas do patógeno aderidas externamente
- ***Infecção:** estruturas nos tecidos mais internos

FORMAS DE ASSOCIAÇÃO



**Contaminação
concomitante**



Contaminação



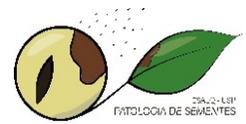
Contaminação



Infecção

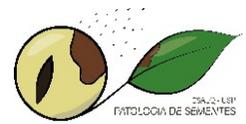


A) Escleródios de *S. sclerotiorum* junto de sementes de soja; B) Conídios de *A. zinniae* aderidos à semente de zínia; C) Crosta de oósporos de *P. manshurica* na superfície de sementes de soja; D) Embrião do trigo com hifas de *U. tritici* . [Fotos Manual de sanidade de sementes].



OBJETIVO DOS MÉTODOS

- Detectar os patógenos com segurança e rapidamente para aplicar em
 - * Quarentena de sementes
 - * No trabalho de obtenção de cultivares resistentes
 - * Certificação para comercialização
 - * Tratamento das sementes: necessidade, eficiência



REQUISITOS BÁSICOS

- * Sensibilidade
- * Reprodutibilidade
- * Economicidade
- * Rapidez de resultados

Equipamentos e materiais básicos

- * Câmara de incubação, estereomicroscópio, microscópio composto, placas, reagentes para meios de cultura, substratos, lâminas, etc.

MÉTODOS

Reunidos em 4 Grupos

1. Exame da Semente não incubada
 - * Método da lavagem e sedimentação
 - * Método da inspeção visual
 - * Método da contagem de embriões

MÉTODOS

2. Exame da semente após incubação

- * Método do Papel de Filtro e variações

- * Métodos do Sintoma em plântula

- * Método do Ágar

MÉTODOS

3. Testes biológicos, biofísicos ou bioquímicos

- * Método da inoculação em planta indicadora
- * Método do bacteriófago
- * Método da serologia (ELISA)
- * Microscopia eletrônica
- * Métodos moleculares

MÉTODOS

4. Inspeção de planta após o estágio inicial de crescimento

- * Método da planta em crescimento
- * Método do ensaio de campo
- * Inspeção do campo de produção de sementes

EXAME DAS SEMENTES NÃO INCUBADAS

Método da Semente Seca: análise visual da amostra de sementes

***Descolorações ou manchas no tegumento**

**Vírus do mosaico comum da soja
(Mancha Café)**



**Mancha púrpura -
Cercospora spp. (*kikuchii*)**



EXAME DAS SEMENTES NÃO INCUBADAS

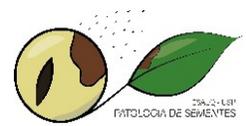
Método da Semente Seca: análise visual da amostra de sementes

*Estruturas do patógeno acompanhando o lote



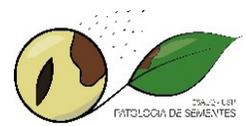
Escleródios de
S. sclerotiorum

Fotos Machado, J.C.



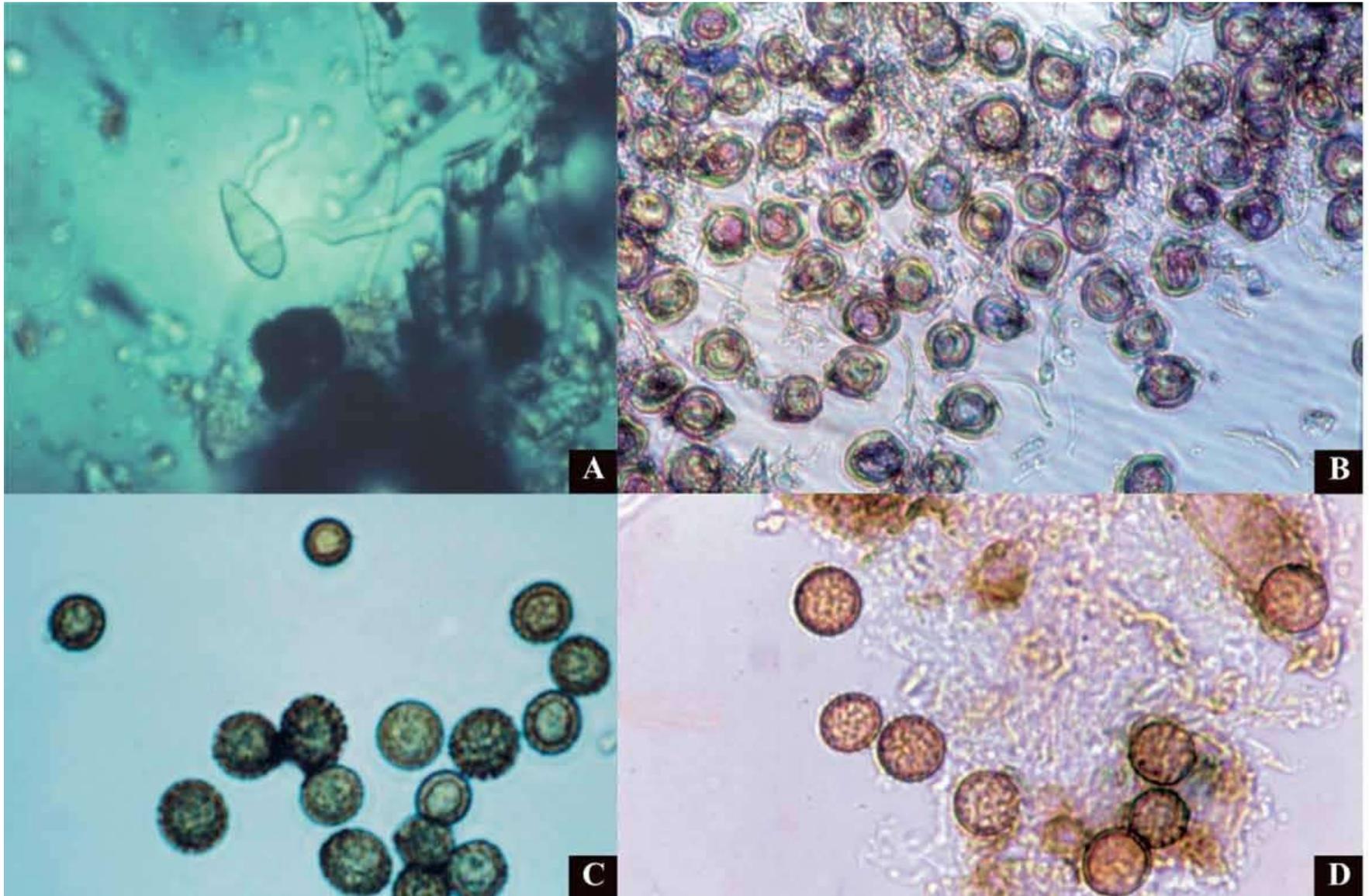
➤ Método da Lavagem das Sementes

- * Detecção de esporos aderidos à superfície das sementes
- * Indicado para fungos não detectados pelo método da incubação: *Peronospora manshurica*, *Ustilago avenae*, *U. hordei*
- * Outros fungos também podem ser detectados: *Pyricularia grisea*, *Fusarium spp.*, *Bipolaris spp.*, etc.



➤ **Método da Lavagem da Semente:**

- * Sementes imersas em água e agitadas;
- * Centrifugação da água de imersão;
- * Descarte do sobrenadante e ressuspensão do pelete
- * Identificação e quantificação dos esporos com auxílio de hemacitômetro



Esposos de *Pyricularia grisea* de sementes de arroz (A); oósporos de *Peronospora manshurica* de soja (B); *Tilletia caries* de trigo ©; clamidosporos de *Ustilago tritici*. Fotos: Dr. Mathur, Dr. McGee

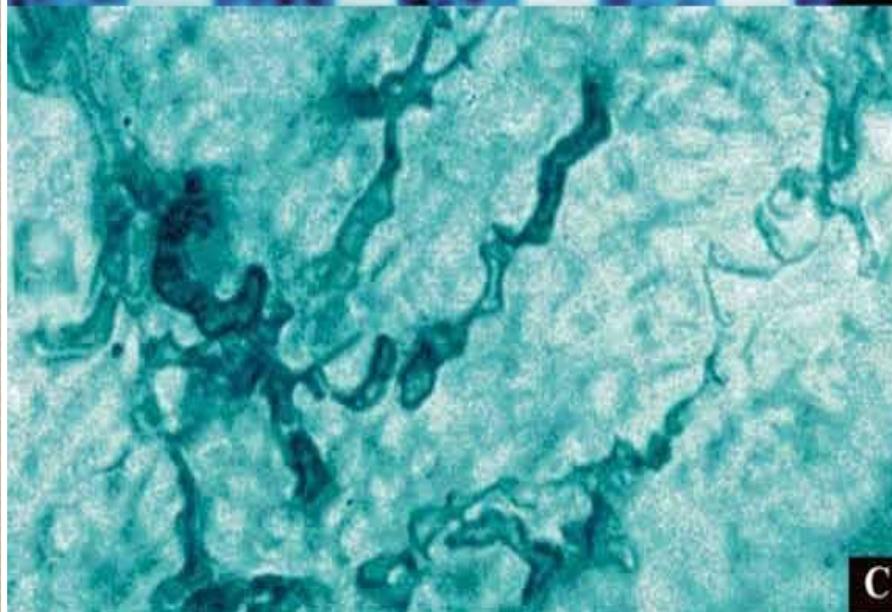
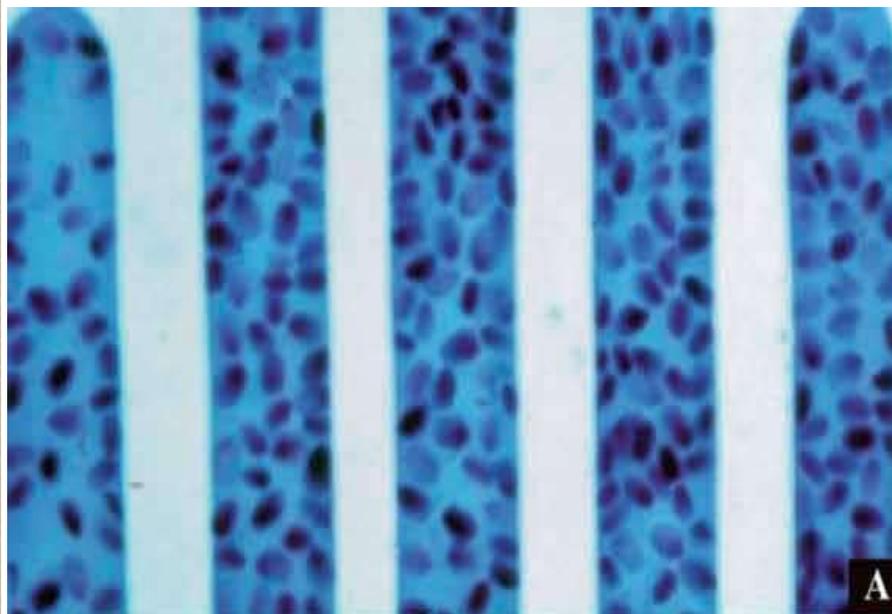
➤ Método da Contagem de Embriões

✓ Para fungos não detectados pela incubação das sementes: *Ustilago tritici*, *U. scitaminea*

*Extração dos embriões

*Clarificação e coloração dos embriões

*Observação de micélio nos embriões com o auxílio de microscópio estereoscópico e óptico



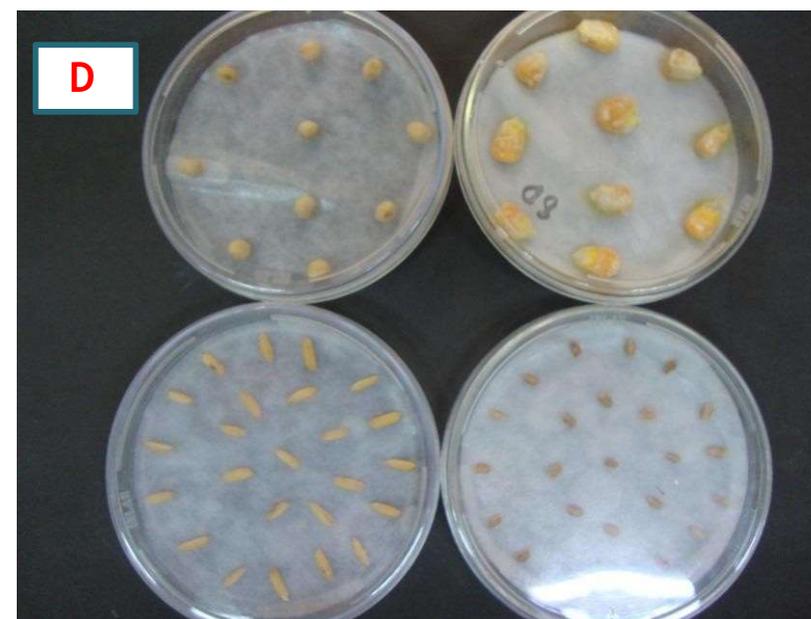
Hifas (B e C) de *Ustilago tritici*
em embriões (A) de trigo/cevada

Fotos: Machado, J.C.

EXAME DAS SEMENTES INCUBADAS

➤ Método do Papel de Filtro

- *3 folhas de papel de filtro
- *Embebidas em água destilada
- *Placa de Petri de 9cm (ou outro recipiente)
- *10 ou 25 sementes / placa
- *Incubação → $T = 20 \pm 2^{\circ}\text{C}$
 - Luz alternada (12h/12h)
 - 7 / 10 / 14 dias



Figuras A e B **colocação** de 3 folhas de papel de filtro + água destilada; Figuras C e D - **deposição** das sementes de forma equidistante



Câmara de incubação com medidas e condições do ambiente padronizadas:

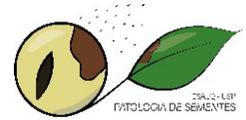
***Temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz alternada (12/12)**



Mariana Colli

**Avaliando sanidade
de sementes de
soja, após 7 dias de
incubação**

Variações do método do PF

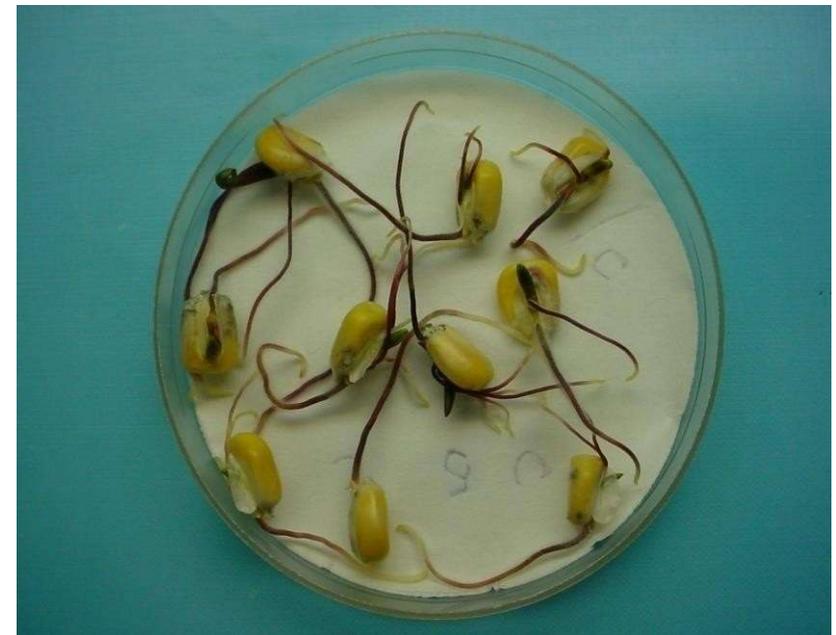


✓ Papel de filtro com Congelamento

*Após instalação → 24h na câmara de incubação → 24h no "freezer" (-20°C) → câmara de incubação até completar tempo necessário



P.F. com congelamento



P.F. sem congelamento

Variações do método do PF



✓ Papel de filtro com Restrição hídrica

*Restritores: NaCl ou KCl ou Manitol colocados na água de embebição do papel de filtro

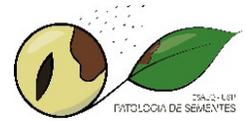


P.F. com
restritores



P.F. com água destilada

Variações do método do PF



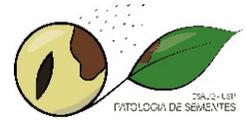
✓ Papel de filtro com Assepsia

*Sementes são submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio a 1%, por 3-5 min.



Sementes de algodão, amendoim ou de qualquer outra espécie que apresente crescimento excessivo de *Rhizopus* sp.

Variações do método do PF



✓Papel de filtro com modificação nas condições de incubação

→ $T = 10^{\circ} C$

→ Escuro contínuo

→ 14 dias

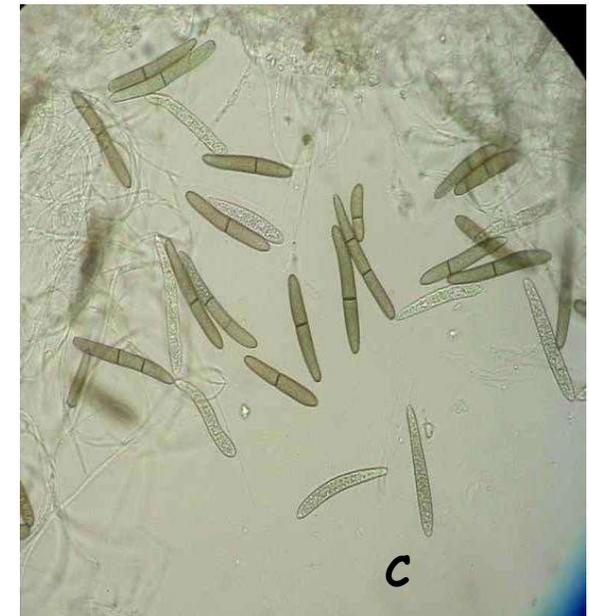
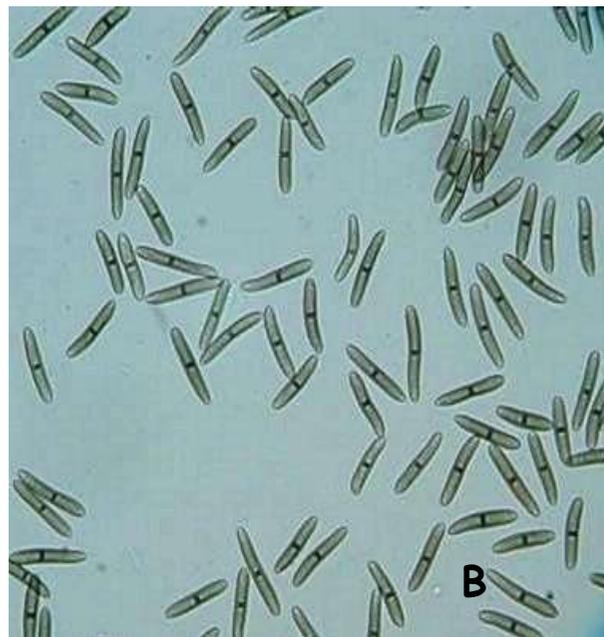


Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*

Variações do método do PF

✓ Papel de filtro com modificação no tempo de incubação

* Após instalação → 14 dias ou mais



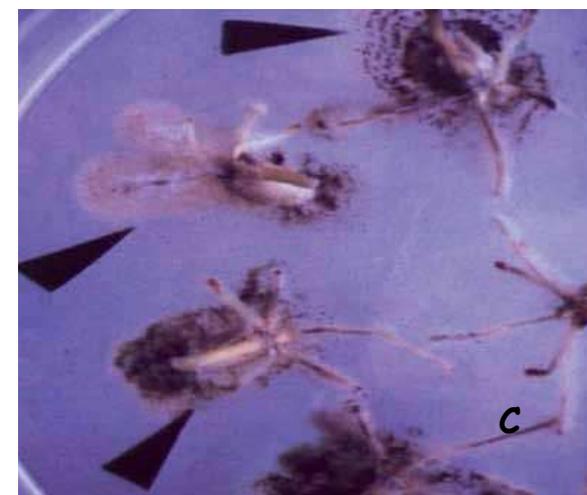
Micélio e "cirros" de *Stenocarpella* sp. (A); conídios de *S. maydis* (B) e *S. macrospora* (C) - Fotos: M.H.D.Moraes

➤ Método do Ágar

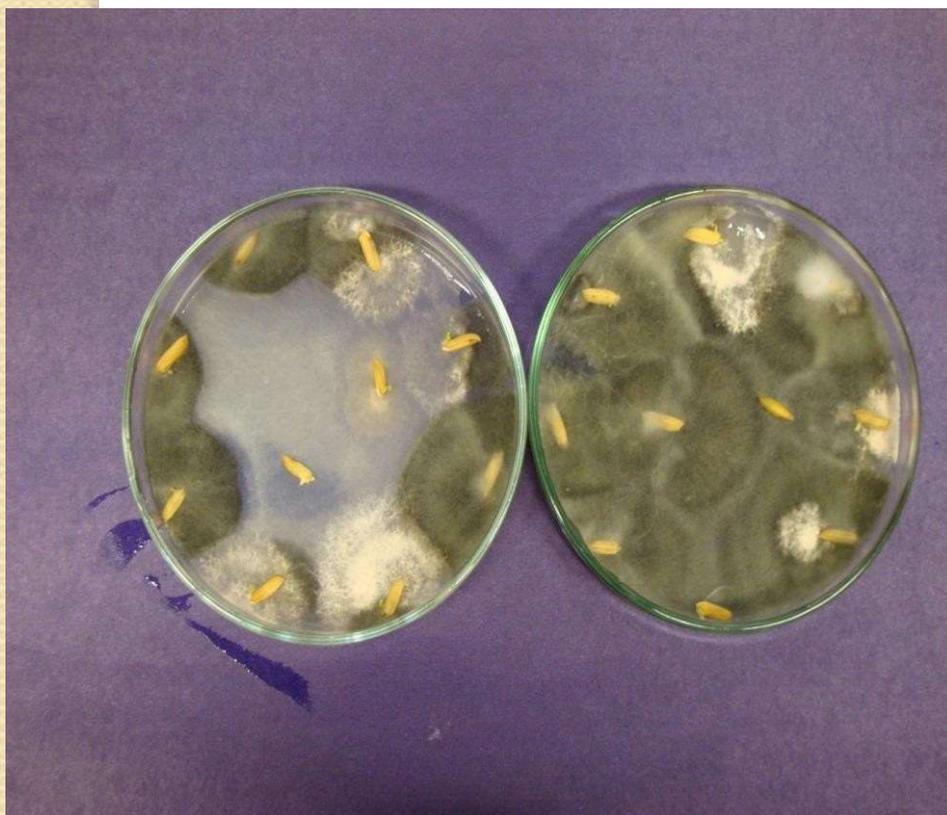
*Meio BDA (batata-dextrose-ágar)

Assepsia das sementes e incubação nas mesmas condições que o PF

Avaliação a olho nú pelas características da colônia e/ou modificações no meio



Ascochyta pisi (A), *Phomopsis* sp.(B); *Stagonospora nodorum* (C)- Fotos J.C. Machado (UFLA); Dr. D. MacGee (USA) e Dr. S.B. Mathur (Dinamarca).



***Bipolaris oryzae* em sementes pelo método do BDA. Fotos: M.H.D. Moraes**

*Meio NEON - Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum*

Incubação a 18-20°C por 5-7 dias



Halo amarelo ao redor da semente portadora de *Aspergillus* sp.



Halo amarelo ao redor da semente portadora de *S.sclerotiorum*

Fotos: J.C. Machado / UFLA

➤ Detecção de bactérias em meio semi-seletivo

- * Extração da bactéria em água esterilizada ou solução salina



*Número de sementes variável com a cultura

*Imersão em água, solução salina ou tampão

*24h em geladeira

- * Repicagem para meio semi-seletivo (depende da espécie alvo)
- * Incubação a 28°C por 72 h

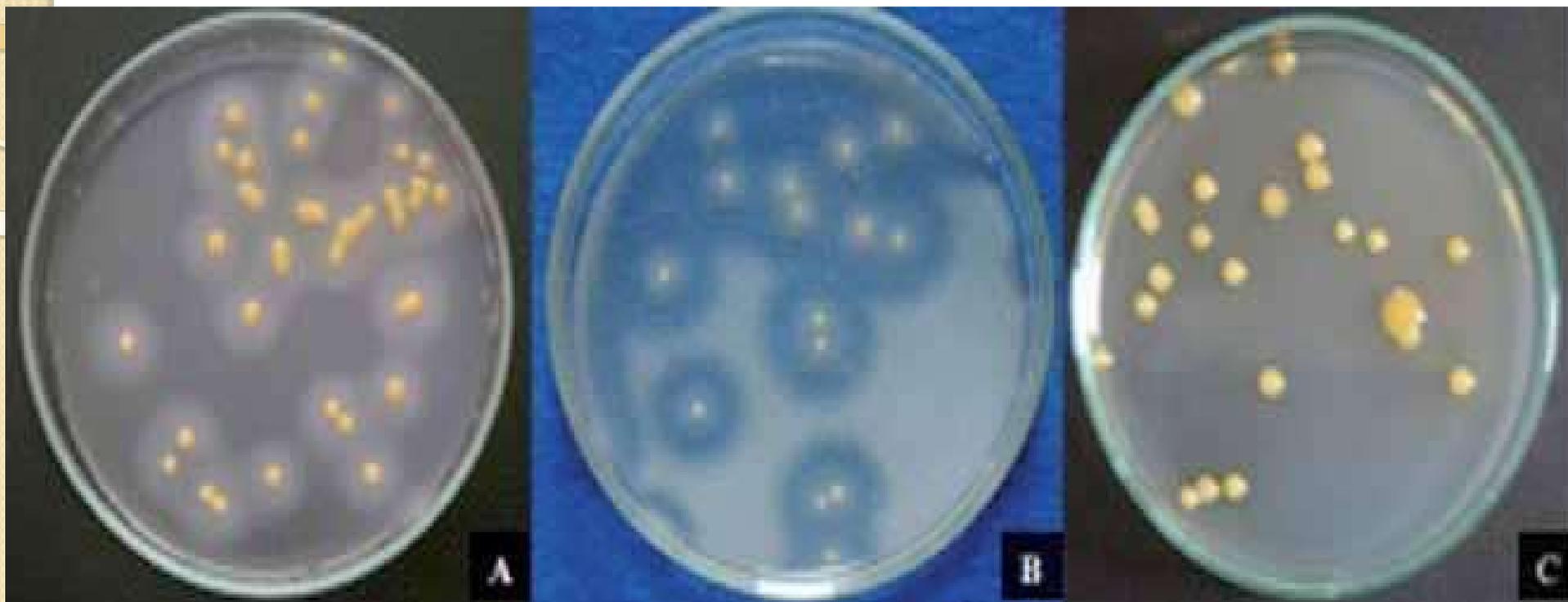
Características das colônias e modificações no meio semi-seletivo



Xanthomonas axonopodis
pv. *malvacearum*



Curtobacterium flaccumfaciens
pv. *flaccumfaciens*



Colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em três diferentes meios de cultura: A e B - semi-seletivos XCP1 e MT, respectivamente, e C - 523, não seletivo. Foto: Tebaldi, ND

➤ Métodos do Sintoma em Plântula

Transmissão

➤ Rolo de Germinação:

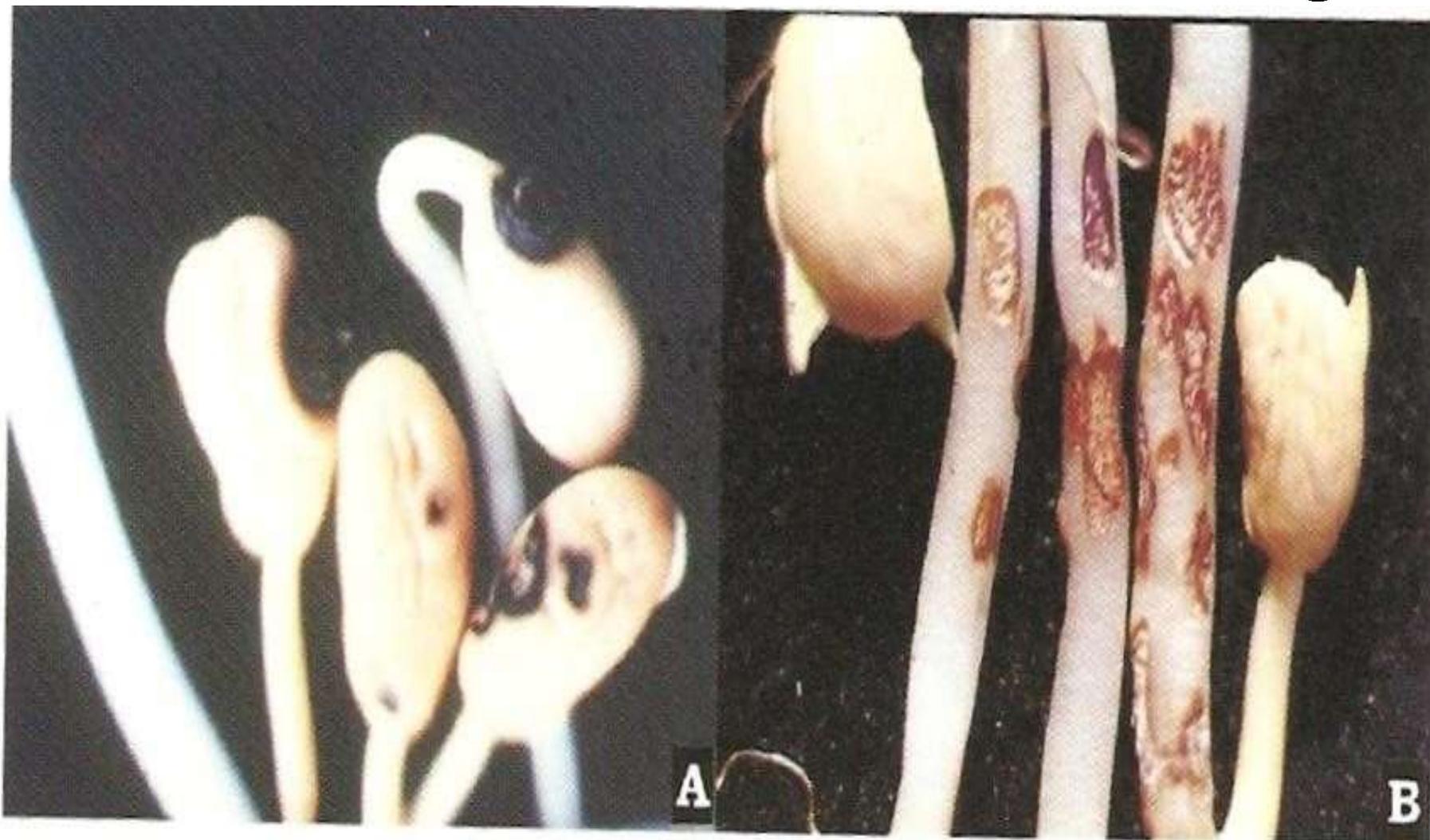
- ✓ Detecção de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani*
- * Três folhas de papel de germinação embebidas em água destilada
- * Colocar os rolos em saco plástico e vedar
- * Incubação → $T = 20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ → 7 dias
- * Observação de sintomas



Duas folhas de papel de germinação + 50 ou 25 sementes + uma folha

Incubação: 7 dias sob luz alternada e $t=20\pm 2^{\circ}\text{C}$





Sintomas de *Colletotrichum lindemuthianum* (A) e *Rhizoctonia solani* (B) em plântulas de feijão - Fotos: Machado, J.C.



Sementes mortas com micélio e esclerócios de *Sclerotinia sclerotiorum*; plântula com sintoma.

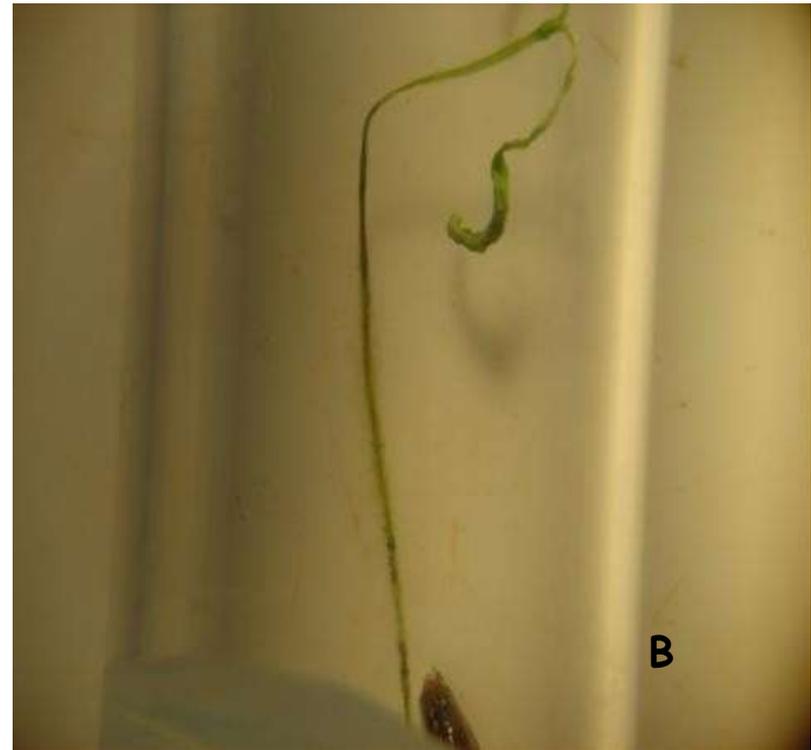
➤ Tubo de Ensaio



- * Assepsia das sementes com hipoclorito de sódio a 1% (três minutos)
- * Uma semente / tubo de ensaio contendo ágar-água
- * Incubação por 14 dias em câmara - $T=20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e luz alternada



Plântula de salsa sadia após 14 dias de incubação (A)



Com sintoma de *Alternaria radicina*/
Stemphylum radicum (B)



Plântulas de coentro saudáveis (A) e com sintoma causado por *Alternaria dauci* (B)

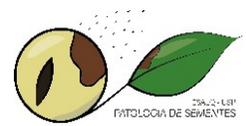


➤ Outros substratos que podem ser utilizados para observação dos sintomas em plântulas

- * Método do tijolo moído
- * Método da areia
- * Método do solo padronizado

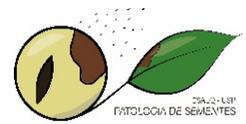
* Incubação:

- ✓ Tempo, temperatura e luz dependem da cultura e do patógeno alvo, podendo ser de 2 a 4 semanas, T=10 a 20°C e luz alternada ou escuro contínuo



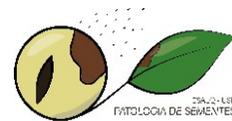
➤ Métodos para patógenos detectados apenas em plantas mais desenvolvidas, especialmente vírus e bactérias

- * Método do sintoma em plantas em crescimento: ambiente com controle de temperatura e umidade relativa
- * Método de ensaios a campo
- * Método da inspeção de campos de produção de sementes



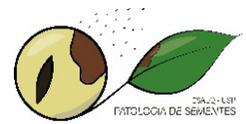
➤ Análises através de Bioensaios ou Procedimentos Bioquímicos

- * Inoculação de plantas indicadoras
- * Método da placa de fago
- * Métodos serológicos
- * Técnicas moleculares



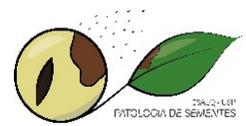
**MÉTODOS RECOMENDADOS
PELO MANUAL DE ANÁLISE
SANITÁRIA DE SEMENTES
MAPA, 2009**

**Anexo do Capítulo 9 das Regras para
Análise de Sementes**



➤ MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE FUNGOS

- * Papel de Filtro e suas modificações
- * Substrato Agarizado
- * Métodos do sintoma em plântulas
- * Técnicas moleculares



➤ MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS

- * Semeadura direta em substrato esterilizado: observação de sintomas, isolamento e identificação
- * Inoculação em plantas suscetíveis
- * Plaqueamento em meio seletivo e / ou semi-seletivo - sementes ou extrato
 - ✓ Testes complementares para confirmação: bioquímicos, de patogenicidade, PCR, ELISA, etc.

➤ MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE VÍRUS

* Testes biológicos - sintomas em plântulas/plantas

* Teste sorológico DAS-ELISA

* **Diagnose através de PCR**

Escolha do Método

- Espécie vegetal
- Patógenos Alvo- Richardson, M.J., 1990
- Estrutura do Laboratório
- Pessoal Capacitado