

Detecção de bactérias em sementes

Temas abordados

- Como as bactérias são transmitidas por sementes?;
- Exemplos de bactérias transmitidas por sementes e mudas;
- Tratamentos de sementes;
- Principais métodos de isolamento e diagnose de bactérias.

**Qual a importância da
diagnose correta**



Importância quarentenária

- *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*



Figura 1. Distribuição geográfica de *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, que causa a murcha bacteriana ou a doença de Stewart no milho.



Epidemiologia da doença: Princípio da Exclusão



- Uso de sementes e mudas certificadas;
- 3 sementes infectadas em um lote de 10 mil (0,03%) pode resultar numa epidemia de podridão negra

**Como as bactérias
são transmitidas
por sementes**





Infecção bacteriana

Aberturas naturais->
estômatos,
hidatódios

Ferimentos,
injúria
mecânica



Xanthomonas
campestris pv.
campestris

Infecção bacteriana: sementes e mudas



- ‘*Seedborne bacteria*’;
- Transmitidas sob ou dentro das sementes;
- Podem permanecer em repouso até o plantio;
- Penetram através das paredes do ovário, pericarpo, tegumentos, feixes vasculares e pedúnculo até a vagem: *Xanthomonas*, *Pseudomonas*
- Encontradas no embrião: *Clavibacter michiganensis*

Infecção bacteriana: sementes e mudas



Nível intra-
embrionário

Nível
sistêmico até
a semente



Xanthomonas axonopodis
pv. *phaseoli* em vagem de
feijão

Tratamento de sementes

- *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* x milho: sulfato de cobre ou soluções comerciais por 15 minutos, soluções contendo antibióticos a 40°C a 47 °C por 1 h.
- *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* x crucíferas: água quente a 50°C por 25 a 30 min, é o tratamento mais eficaz para o controle da bactéria; couve-flor (50°C/ 15 min).
- *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* x feijão: água quente a 52°C por 20 min, ou 23 a 32 h a 60°C; uso do antibiótico estreptomicina para descontaminação externa



Produtos registrados

Acidovorax subsp. *citrulli* em melão

Agricultura **AGROFIT**
Sistema de Análises Fitopatológicas

Pragas | Ingredientes Ativos cons | Produtos Formulados | Produtos Técnicos | Relatórios

► Consulta de Praga/Doença

► Dados da Praga

Dados Gerais | Sobre a Praga | Fotografias | Produtos Indicados

Produto	Ingrediente Ativo(Grupo Químico)	Titular de Registro
Actigard	acibenzolar-S-metílico (benzotiadiazol)	Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. – São Paulo
Bion 500 WG	acibenzolar-S-metílico (benzotiadiazol)	Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. – São Paulo
Fegatex	cloreto de benzalcônio (amônio quaternário)	BR3 Tecnologia e Indústria Química e Farmacêuti
Kasumin	casugamicina (antibiótico)	UPL do Brasil Indústria e Comércio de Insumos A
Kocide WDG Bioactive	hidróxido de cobre (inorgânico)	Mitsui & Co (Brasil) S.A.
Redshield 750	óxido cuproso (inorgânico)	AMVAC do Brasil 3P Ltda.

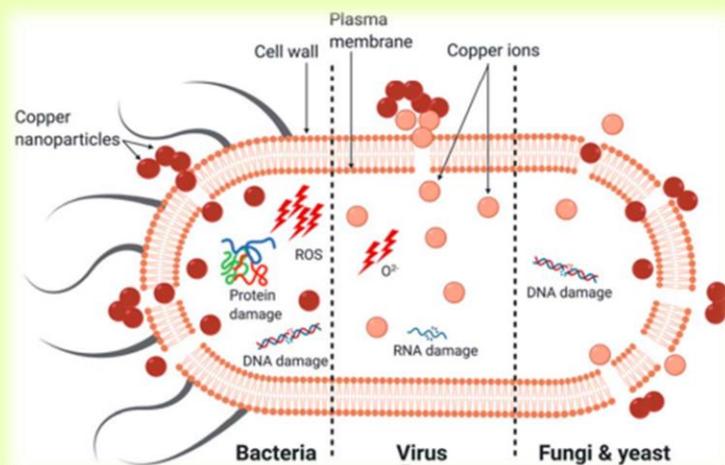
Qtd. Produtos: 6



Tratamento de sementes

Não elimina a
bactéria em
100% dos
casos

Pode afetar a
germinação e
o vigor da
semente



Plantio de
cultivares
resistentes e
manejo da
irrigação

Métodos de isolamento de bactérias



Etapas para diagnose de bactérias

Plaqueamento de sementes em meios específicos

Isolamento a partir de sementes ou mudas em meio de cultura

Escolha do método(s) de diagnose: acurácia, rapidez

Interpretação de resultados associando métodos

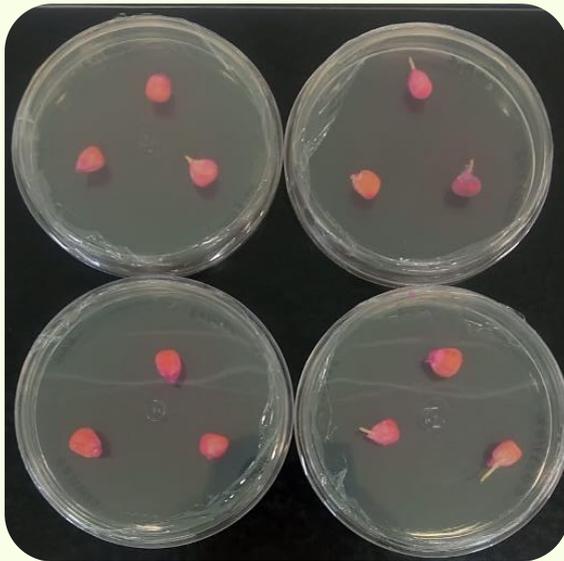


Plaqueamento em meio seletivo e semi-seletivo



- Número de sementes a ser analisada: depende da cultura ;
- Plaquear as sementes ou o extrato obtido pela sua imersão (água ou solução salina) em meios seletivos ou semi-seletivos ;
- Observar o crescimento de colônias bacterianas (típicas para meios seletivos) ;
- Confirmação dos resultados: testes bioquímicos, sorológicos (ELISA), moleculares (PCR) .

Plaqueamento em meio seletivo e semi-seletivo

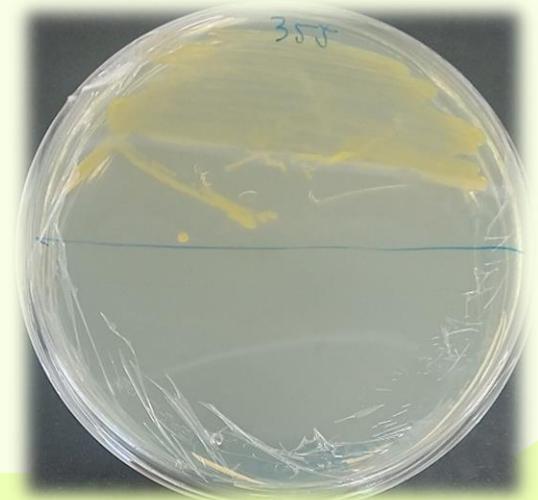
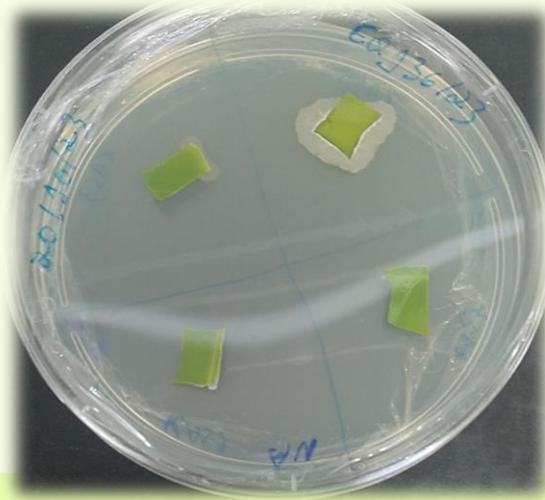
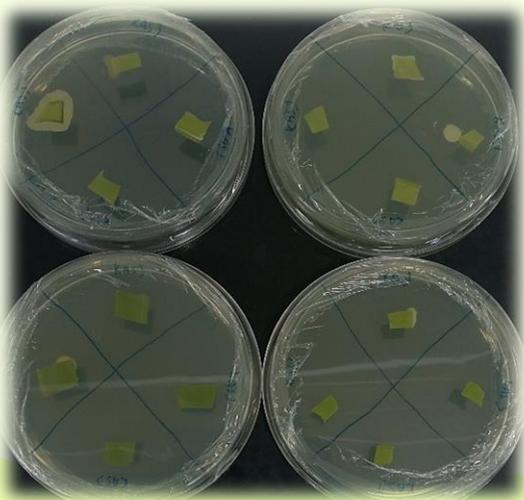


Plaqueamento de sementes em
meio de cultura Nutriente-ágar (NA)

Plaqueamento em meio seletivo e semi-seletivo



Isolamento de bactérias a partir de mudas *in vitro*

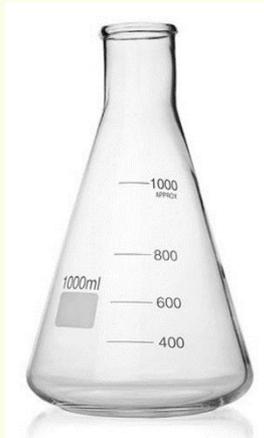


Plantio da sementes em substrato esterilizado



- Semear as sementes em substrato esterilizado (areia, solo, vermiculita) ;
- Incubar em câmara de crescimento a 25-28°C ;
- A avaliação é realizada a partir da emergência das plântulas, observando a ocorrência ou não de sintomas ;
- A taxa de infecção é calculada com base no número de plântulas emergidas;
- Isolamento da bactéria e sua posterior identificação.

Detecção de bactérias em substrato e solo



10 g de substrato/ solo
+ 90 mL de solução
salina (agitação)

10^{-1}

1 mL



10^{-2}

1 mL



10^{-3}

1 mL



10^{-4}

1 mL



10^{-5}



0,1 mL



Incubação
28°C / 7 dias;
UFC / g solo

Métodos específicos



Suspender as sementes em solução salina sob agitação

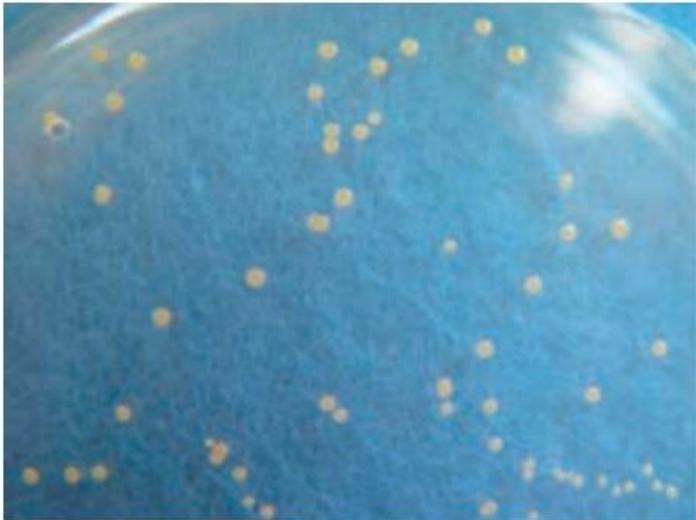


Pipetar a diluição em placas de meios seletivos escolhidos

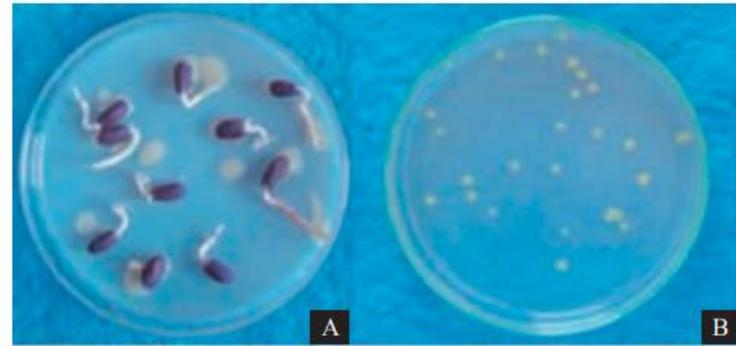
Preparar uma diluição seriada (1:10)



Métodos específicos



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



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

Métodos específicos



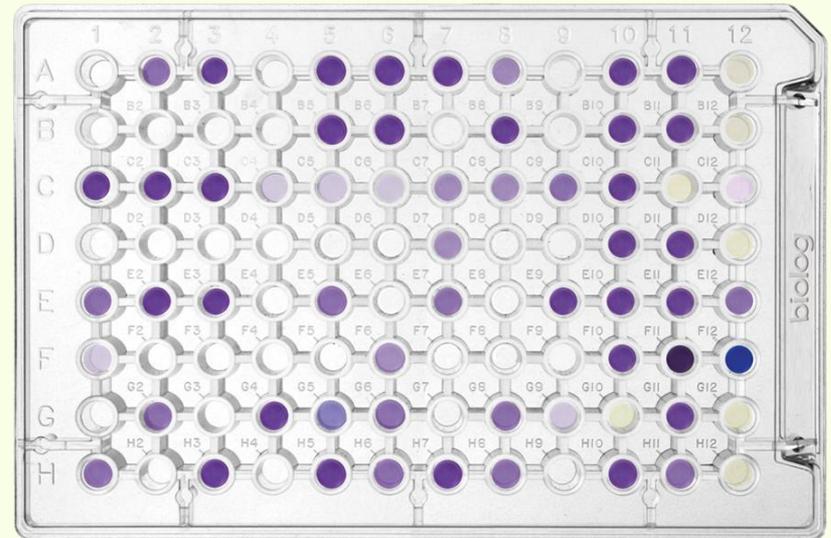
- Colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* formadas a partir de extratos de sementes de feijão naturalmente infectadas, 6 dias após o plaqueamento. A e B) meios de cultura semi-seletivos XCP1 e MT, respectivamente; C) meio de cultura não seletivo 523. Lavras – MG, 2005. (Foto Tebaldi, N.D.)

Métodos de diagnose de bactérias

Métodos bioquímicos



Biolog®



Métodos sorológicos-ELISA

Ligação proteína: (antígeno-anticorpo)

Rapidez e sensibilidade



Disponibilidade de kits comerciais para diversas bactérias

Métodos sorológicos-ELISA



Macerar
amostras



Ligação
antígeno-
anticorpo



Leitura da
absorbância

Métodos sorológicos-ELISA

Detecção de *Pantoea stewartii*

ELISA Reagent Set for *Pantoea stewartii* (Pstew)



[Click to view a larger image](#)

[Overview](#)

[Included Items](#)

[Technical Information](#)

[Documents](#)

This ELISA test is a qualitative serological assay for the detection of *Pantoea stewartii* (Pstew), the causal agent of Stewart's Wilt, in corn leaves and seed. Agdia's ELISA test for *Pantoea stewartii* provides an effective, lab-based method for phytosanitary assessment.

[Click here](#) for other product documents such as the [User Guide](#) or [Buffer Formulations](#).

Métodos sorológicos-ELISA

Detecção de *Acidovorax avenae subsp. citrulli*

ELISA Reagent Set for *Acidovorax avenae subsp. citrulli* (Aac)



[Click to view a larger image](#)

[Overview](#)

[Included Items](#)

[Technical Information](#)

[Documents](#)

Tech Note: [Extraction Buffer and Enzyme Conjugate Diluent Change](#)

Alternate Protocol: [Alternate Buffers](#)

This ELISA test is a qualitative serological assay for the detection of *Acidovorax avenae subsp. citrulli* (Aac), the causal agent of bacterial fruit blotch, in cucurbit leaves, fruit, bacterial cultures, and seedlings. Aac is divided into two distinct groups. Group I strains are associated with non-watermelon plants while Group II strains are associated with watermelon plants.

If you would prefer to add a field-deployable assay to your testing toolkit, please check out Agdia's [Aac ImmunoStrips®](#).

[Click here](#) for other product documents such as the [User Guide](#) or [Buffer Formulations](#).

Métodos sorológicos-ELISA

Detecção de *Erwinia amylovora*- ImmunoStrip®

ImmunoStrip® for *Erwinia amylovora* (Ea)



 [Click to view a larger image](#)

[Overview](#)

[Included Items](#)

[Technical Information](#)

[Documents](#)

The *Erwinia amylovora* (Ea) ImmunoStrip® is used to detect the presence of Ea, the causal agent of Fire Blight, in apple and pear trees. ImmunoStrips® are the perfect screening tool for use in the field, greenhouse, and the lab.

[Click here](#) for other product documents such as the [User Guide](#) or [Validation Report](#).



Métodos moleculares

Extração de
DNA das
bactérias



Busca na
literatura por
primers
específicos



Análise de
resultados em
gel ou por
sequenciamento



Extração de DNA

- Cultivo da bactéria em meio de cultura;
- Adição da cultura bacteriana em água livre de nucleases.



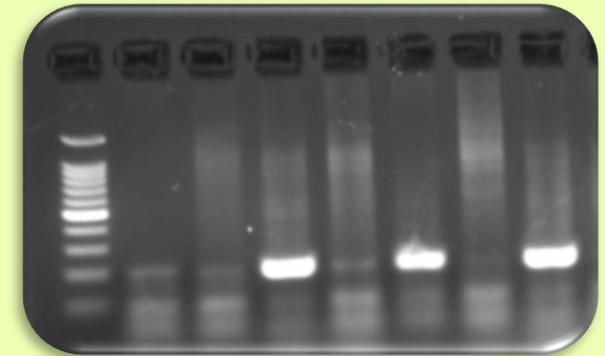
Aquecimento a 95°C por 5 min



Kits específicos de extração

Diagnose molecular : PCR

```
TCAGGCACTCAGCCAACCTGGCCAGACGCTGGAGCCACAAGAAAGACAAGAAAG  
ATGACAAAAGGGAAAAACAAGGATGTCACGGGCTGGTTCAGGTGAGAAAACAGT  
GGCAGCTGTACGAAGGACAAGGACGTAATGCTGGTTCATGGGAAAAATTTGG  
CCGCGCTTTTCGAAGATAACAAGAAGATGCACTGCCACGGTGAAAGGAAATGT  
GATACTCGACATTGATCACTTGCTGGAGTATAAGCCGGATCAATTGAGTTGTATA  
CACACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCCTTGGTTCAACCAAGTAAAAACAAGATA  
TGATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTGTAATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGA  
TTGAAAATGGCAGTCACCCGACATTAACGGAATATGGGTTATGATGGACGGGAAT  
GAGCAGGTTGAATATCCTTTGAAACCAATAGTTGAAAATGCAAGCCAACGCTGCG  
ACAAAATATGCATCATTTTTAGATGCAGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGC  
AGAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTGCTCGAAACTTACGGGATAGGAGTT  
TGGCAGCATATGCTTTCGACTTTTACGAAGTCAATCCAAAACCCGGAAGAGCC  
CGCGAAGCTGTTGCCAGATGAAAGCAGCAGCCCTTAGCAATGTTTCTCAAGGT  
GTTTGGCCTTGAGAAATGTTGCCACCACTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTG
```



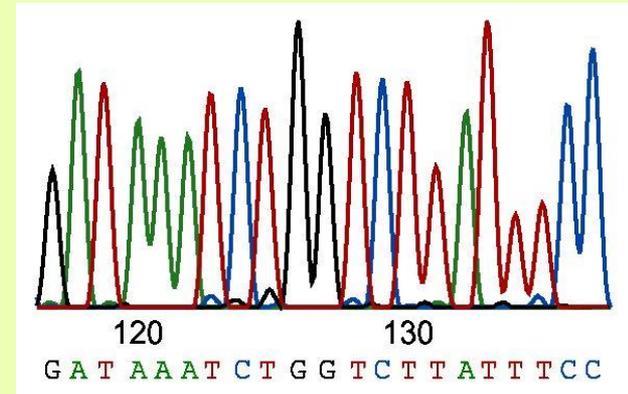
Primers
específicos
para a
bactéria

Reação em
termociclador

Análise em
gel de
agarose

Diagnose molecular: Sequenciamento

```
TCAGGCACTCAGCCAACCTGGCAGACGCTGGAGCCACAAGAAAGACAAGAAAG  
ATGACAAAGGGAAAAACAAGGATGTCACGGGCTGGTTGAGGTGAGAAAAACAGT  
GGCAGCTGTACGAAGGACAAGGACGTAATGCTGGTTCTCATGGGAAAAATTGTG  
CCGCGCTTTTCGAAGATAACAAGAAGATGCACTGCCACGGGTGAAAGGAAATGT  
GATACTCGACATTGATCACTTGCTGGAGTATAAGCCGGATCAAATGAGTTGTATAA  
CACACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCCTTGGTTCAACCAAGTTAAAAAGAAATA  
TGATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTGTAATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGCA  
TTGAAATGGCAGTCACCCGACATTAACGGAATATGGGTTATGATGGACGGGAAT  
GAGCAGGTTGAATATCCTTTGAAACCAATAGTTGAAATGCAAGCCAACGCTGGC  
ACAAATAATGCATCATTTTTTCAGATGCAGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGC  
AGAGGCACCATACATGCCGAGGTATGGTTGCTTCGAAACTTACGGGATAGGAGTT  
TGGCAGGATATGCTTTCGACTTTTACGAAGTCAATTCAAAACCCGGAAAGAGCC  
CGCGAAGCTGTTGCCAGATGAAAGCAGCAGCCCTTAGCAATGTTTCTCAAGGTT  
GTTTGGCCTTGATGGAATGTTGCCACCCTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTG
```



Primers
universais
para a
bactéria

Reação em
termociclador

Envio para
sequenciamento

Diagnose molecular: Sequenciamiento- BLASTn

[← Edit Search](#)

[Save Search](#)

[Search Summary ▾](#)

[? How to read this report?](#)

[▶ BLAST Help Videos](#)

[↶ Back to Traditional Results Page](#)

Job Title	Nucleotide Sequence
RID	N9K1R1RB013 <small>Search expires on 11-16 20:48 pm</small> Download All ▾
Program	BLASTN ? Citation ▾
Database	nt See details ▾
Query ID	lcl Query_127781
Description	None
Molecule type	dna
Query Length	1480
Other reports	Distance tree of results MSA viewer ?

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity

to

E value

to

Query Coverage

to

Filter

Reset

Descriptions

[Graphic Summary](#)

[Alignments](#)

[Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments

[Download ▾](#)

[Select columns ▾](#)

Show [?](#)

select all 100 sequences selected

[GenBank](#)

[Graphics](#)

[Distance tree of results](#)

[MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Pantoea stewartii subsp. stewartii strain KT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pantoea stewart...	2734	2734	100%	0.0	100.00%	1480	OR616756.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pantoea stewartii isolate RON18713 chromosome, complete genome	Pantoea stewartii	2728	18995	100%	0.0	99.93%	4334600	CP116285.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pantoea stewartii strain HR3-48 chromosome, complete genome	Pantoea stewartii	2728	19006	100%	0.0	99.93%	4439845	CP099540.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pantoea stewartii strain ZJ-FGZX1 chromosome, complete genome	Pantoea stewartii	2717	18071	100%	0.0	99.80%	4550072	CP049115.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Pantoea sp. strain M2PF 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pantoea sp.	2715	2715	100%	0.0	99.80%	1483	QM048982.1

Estudo de caso: importância quarentenária

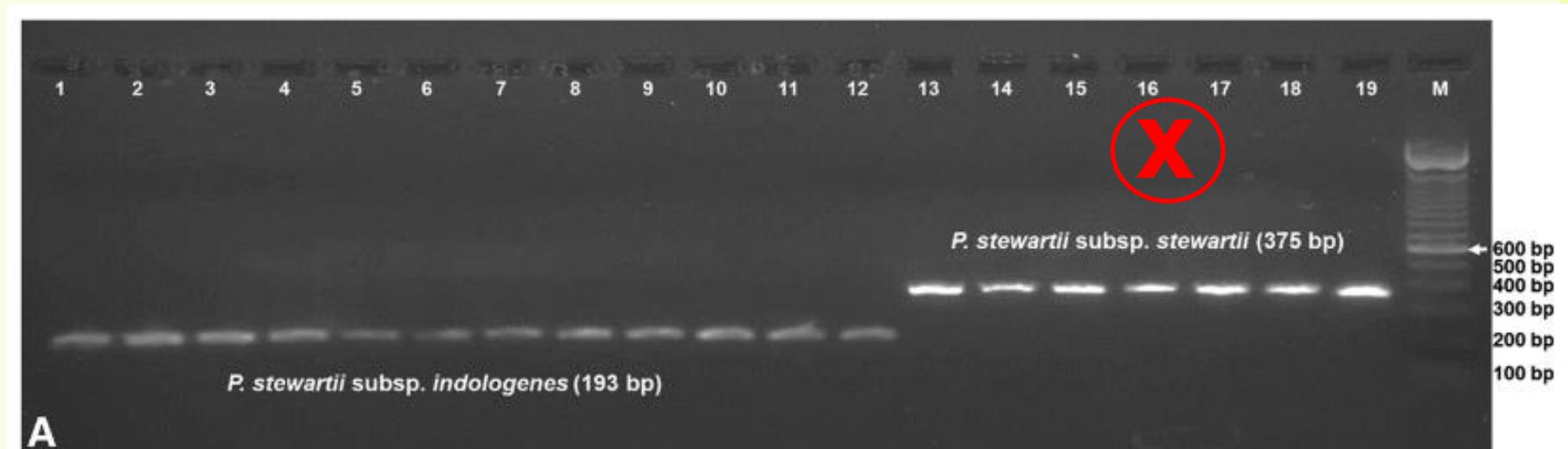


Pantoea stewartii
subsp. *indologenes*



Pantoea stewartii
subsp. *stewartii*

Estudo de caso: importância quarentenária



CONCLUSÕES

Bactérias sobrevivem nas sementes de forma latente

Sementes infectadas podem ou não apresentar sintomas

Escolha do método de detecção, meio de cultura e plantio

Importância quarentenária, epidemiológica e viveiro

O ideal é associar mais de um método de diagnose

Sorológicos, bioquímicos e moleculares

DÚVIDAS





Importância e Procedimentos de uma Estação Quarentenária



Quarentena Vegetal





Quarentena e Legislação Fitossanitária

- **Quarentena vegetal:** atividades destinadas para prevenir a introdução e/ou disseminação de pragas agrícolas quarentenárias ou para assegurar seu controle oficial
- **Estação quarentenária:** local de alta segurança onde é realizada a quarentena do tipo pós-entrada
- O **MAPA** cadastra e credencia estações quarentenárias
- **As instruções normativas** do Ministério da Agricultura em vigor regulamentam a lista de pragas quarentenárias ausentes

Quarentena e legislação fitossanitária



DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

Publicado em: 31/08/2018 | Edição: 169 | Seção: 1 | Página: 7

Órgão: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Gabinete do Ministro

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 45, DE 22 DE AGOSTO DE 2018

Art. 1º Ficam estabelecidas regras e procedimentos para elaboração, atualização e divulgação das listas de Pragas Quarentenárias Ausentes, Pragas Quarentenárias Presentes e Pragas Não Quarentenárias Regulamentadas.

Art. 2º Para efeito desta Instrução Normativa, entende-se por:

I - Praga Quarentenária Ausente - PQA: praga de importância econômica potencial para uma área em perigo, que não esteja presente no território nacional;



DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

Publicado em: 25/08/2016 | Edição: 164 | Seção: 1 | Página: 8

Órgão: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/GABINETE DO MINISTRO

INSTRUÇÃO NORMATIVA NO 29, DE 24 DE AGOSTO DE 2016

Art.1º Fica estabelecida a norma técnica para a estrutura, credenciamento e operação de Estação Quarentenária de artigo regulamentado, na forma desta Instrução Normativa, e aprovados os formulários constantes dos seguintes Anexos:



Certificado de Qualidade em Biossegurança- CQB

Constitui-se no credenciamento que a CTNBio concede às instituições (Estações quarentenárias) para desenvolver projetos e atividades com Organismos Geneticamente Modificados (**OGM**) e seus derivados.

CIBio - Comissão Interna de Biossegurança

OGM regulado – Controlado pela CTNBio

OGM desregulado- Semelhante ao
convencional



RISCO BIOLÓGICO

ORGANISMO: _____

CLASSE DE RISCO: _____

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: _____

TELEFONE PARA CONTATO: _____

**PROIBIDA A ENTRADA DE PESSOAS
NÃO AUTORIZADAS**

Distribuição das estações quarentenárias



Especialidades exigidas pelo MAPA na estação quarentenária

Virologia



Acarologia e
Entomologia



Nematologia



Bacteriologia



Micologia



Plantas
infestantes



Requisitos de importação

PI-

Permissão ou de
Importação
(MAPA)

DAT-

Declaração
Agropecuária de
Trânsito internacional

LPCO-

Licença, Permissão,
Certificado e Outros
Documentos

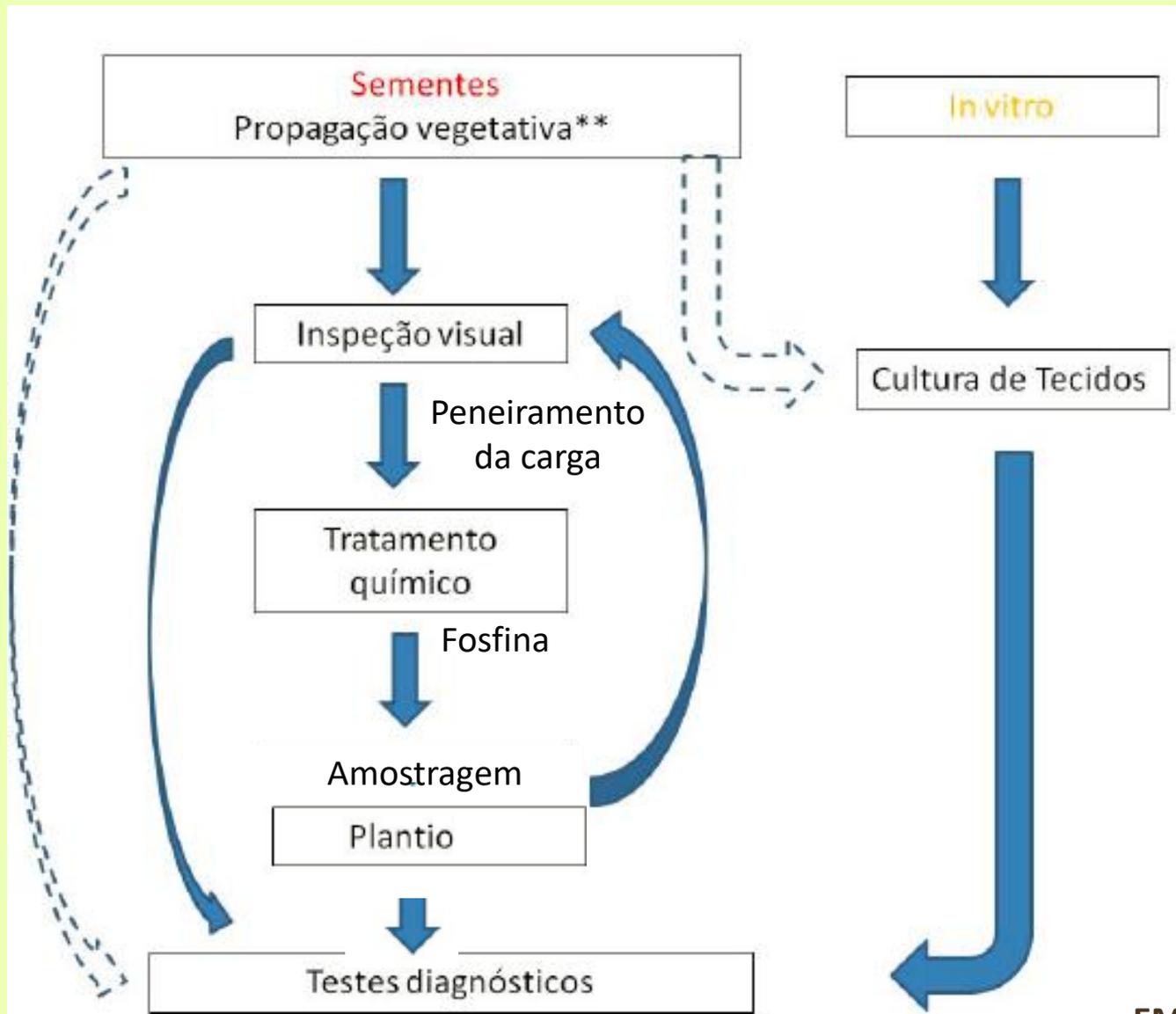
CF-

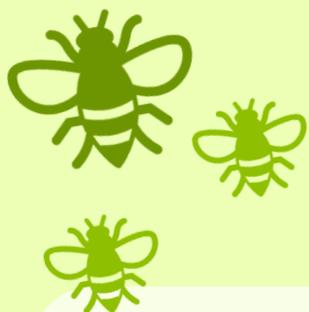
Certificado
Fitossanitário

PQ-

Prescrição de
Quarentena

Fluxograma após a entrada



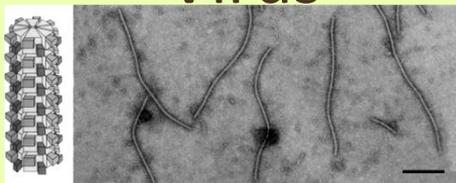


O que é uma praga?

Conceito aplicável a qualquer espécie, raça ou biótipo de planta, animal ou agente patogênico que danifica plantas ou produtos vegetais

EMBRAPA (2003)

Vírus



Bactérias



Fungos



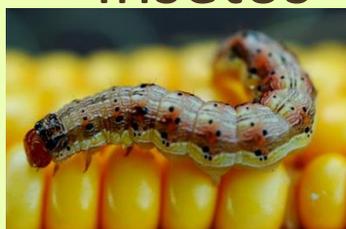
Nematoides



Ácaros



Insetos



Sementes infestantes



Análises fitossanitárias quarentenárias

Plantas infestantes



Peneiramento manual



Análise visual de infestantes no lote



Separar torrões de solo no lote

Análises fitossanitárias quarentenárias

Insetos e Ácaros



Fumigação com fosfina (Expurgo)



Análise visual de
presença de
insetos vivos

Análises fitossanitárias quarentenárias

Nematoides



Trituração
das
sementes



Método de
Baerman
modificado



Identificação
de nematoides
na amostra



Análises fitossanitárias quarentenárias

Fungos



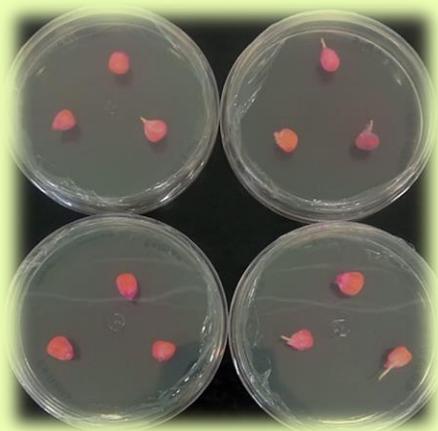
“Blotter test” em gerbox



Identificação de fungos na amostra

Análises fitossanitárias quarentenárias

Bactérias



Plaqueamento de sementes em meio de cultura nutriente-ágar



Identificação da bactéria por meio de sequenciamento de DNA



Análises fitossanitárias quarentenárias

Vírus



Coleta de folhas para
extração de RNA do vírus



Identificação do vírus por
meio de análises
moleculares e sorológicas

Análises fitossanitárias quarentenárias

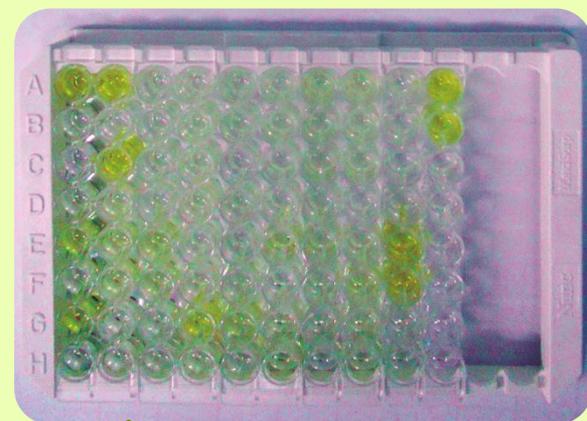
Vírus Teste de ELISA



Macerar amostras
vegetais



Ligação antígeno-
anticorpo



Análise de
resultado positivo

Análises fitossanitárias quarentenárias

Vírus Teste molecular-PCR

>ZYMV-RN

```
TCAGGCCACTCAGCCAACTGTGGCAGACGCTGGAGCCACAAAAGACAAAAGAAAG  
ATGACAAAAGGGAAAAACAAGGATGTCACGGGCTCTGGTTCAGGTGAGAAAAACAGT  
GGCAGCTGTCACGAAGGACAAGGACGTGAATGCTGGTTCATGGGAAAATTGTG  
CCGCGTCTTTGAAAGATAACAAAAGATGCTCACTGCCACGCGTAAAAGGAAATGT  
GATACTCGACATTGATCAGCTTGGTGGAGTATAAGCCGGATCAAATTGAGTTGTATAA  
CACACGAGCGTCTCATCAGCAATTCGCCTCTTGGTCAACCAAGTTAAAAAGAAATA  
TGATCTGAATGAGCAACAGATGGGAGTTGTAATGAATGGTTTCATGGTTTGGTGCA  
TTGAAAATGGCACGTCACCCGACATTAACGGAATATGGGTATGATGGACGGGAAT  
GAGCAGGTTGAATATCCTTTGAAACCAATAGTTGAAAATGCAAAGCCACGCTGCG  
ACAAAATATGCATCATTTTTAGATGACGCGGAGGCATATATAGAGATGAGAAATGC  
AGAGGCACCACATGCCGAGGTATGGTTGCTCGAAACTTACGGGATAGGAGTT  
TGGCACGATATGCTTTGCACTTTTACGAAGTCAATTCAAAACCTCCGGAAGAGCC  
CGCGAAGCTGTTGCGCAGATGAAAGCAGCAGCCCTTAGCAATGTTTCTCAAGGTT  
GTTTGGCCTTGATGGAATGTTGCCACCCTAGCGAAGACACTGAACGGCACACTG
```



Primers específicos
para o vírus de
interesse

Reação de PCR em
termociclador

Análise de
resultado
positivo

Quarentena livre de pragas



Aprovação e
liberação pelo
MAPA

Elaboração de
boletins
fitossanitários

Envio para a
empresa
contratante
no Brasil





Detecção de pragas quarentenárias

Comunicado
oficial ao
MAPA

Elaboração de
boletins
fitossanitários

Destruição da
carga na
estação
quarentenária





CONCLUSÕES

Importação
de material
vegetal

Aumento do
banco de
germosplasma

Acarretar
introdução de
pragas

Formação de
pessoas
capacitadas
nesta área

Controle de
pragas para a
Agricultura

Importância
das estações
quarentenárias

Bibliografia

Procedimentos e métodos utilizados no intercâmbio e quarentena de germoplasma vegetal. Marinho, V. L. (et. al.). 2003. 40p. – (Documentos; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102-0110; n.103)

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009. 399 p.

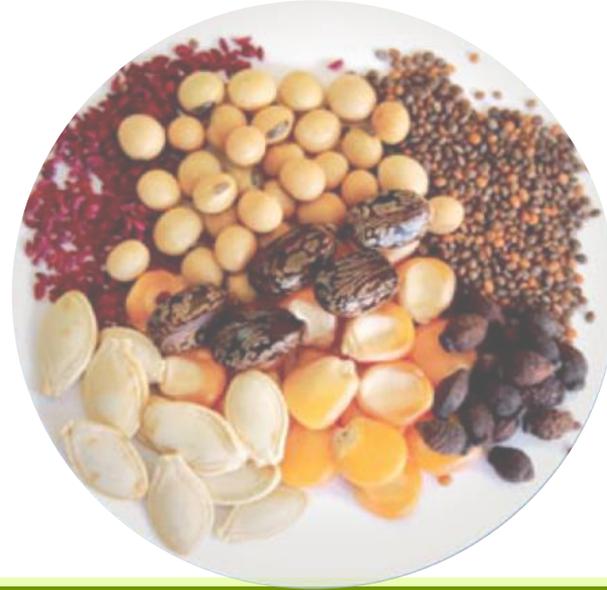
Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. BERGAMIN FILHO, A.; KITAJIMA, E. W. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 4. ed., v.1, cap.1, p. 3-17, 2011.

Doenças bacterianas. BERIAN, L.O.S., and OCCHIENA, E.M. In: BRANDÃO FILHO, J.U.T., FREITAS, P.S.L., BERIAN, L.O.S., and GOTO, R., comps. Hortaliças-fruto [online]. Maringá: EDUEM, 2018, pp. 209-240. ISBN: 978-65-86383-01-0. <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0008>

Manual de análise sanitária de sementes. MAPA 2009. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/manual-de-analise-sanitaria-de-sementes>

DÚVIDAS





OBRIGADA!

bibianolillian@gmail.com