

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS DO TRIGO¹

Julia Riscarolli², Ricardo Trezzi Casa³, Flávio Chupel Martins⁴

¹ Vinculado ao projeto “Caracterização biológica, bioquímica e molecular de bactérias fitopatogênicas do trigo”

² Acadêmica do Curso de Agronomia – CAV – Bolsista PIBIC/CNPq

³ Orientador, Departamento de Agronomia –CAV - ricardo.casa@udesc.br

⁴ Mestre em Produção Vegetal – PPGPV- CAV

A cultura do trigo no Brasil encontra-se na 15ª posição no ranking de produção mundial, com estimativa de cultivo de 7,7 milhões de toneladas de trigo para a safra 2022. Em relação a demanda total consumida pelo país, cerca de 50% do seu volume consumido é importado, principalmente da Argentina e Estados Unidos. Um fator climático, como o excesso de chuva, é uma das principais dificuldades para a produção de trigo, ocasionando condições favoráveis à ocorrência de doenças, sendo intensificado com o acúmulo de dias encobertos durante a estação de cultivo. Doenças secundárias, como as bacterioses, vêm ganhando visibilidade nas últimas safras, devido ao incremento de ocorrência, potencial de dano e a dificuldade de controle. No Brasil, assume-se a existência de duas bacterioses em folhas de trigo, a estria bacteriana, causada por *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* e o branqueamento ou queima da folha de trigo, causado pela espécie *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Esse trabalho teve como objetivo obter um levantamento de bacterioses em folhas de trigo em diferentes regiões do Brasil, via caracterização biológica, bioquímica e molecular. O trabalho foi realizado no laboratório de Fitopatologia da Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV/UDESC, em Lages-SC durante os anos de 2017 a 2022. Foi realizada a caracterização a partir dos isolados bacterianos obtidos de coletas de folhas em lavouras e áreas experimentais, nas safras de trigo dos anos de 2017 a 2022. As folhas com sintomas de lesões foliares foram prensadas em envelope de papel e encaminhadas ao laboratório. No laboratório, amostras de folhas sintomáticas foram selecionadas e cortadas, na região de transição do tecido sintomático e sadio da folha, sendo processadas seguindo o protocolo operacional padrão de isolamento. A desinfecção foi feita com álcool 70% e hipoclorito de sódio 1%. Na câmara de fluxo, os tecidos foram macerados em cadinho, com solução salina 0,75%, até a desestruturação total do limbo foliar e formação de uma suspensão. Com os utensílios esterilizados, foi feito o esgotamento em estrias da suspensão de placas de Petri contendo meio de cultura NA (Nutriente-Ágar). Em seguida as placas foram incubadas em estufa sob condição de escuro, com temperatura de 27 a 28°C por 48 h, repetindo-se o processo até obter um isolado puro. Para a caracterização biológica, dos isolados da amostra, foram obtidos isolados padrões, referidos como “Tipo”, para comparação durante os testes realizados. Foi feito o teste da patogenicidade, através do método de infiltração por seringa, onde são inoculados os isolados em plantas de trigo, de 3-4 folhas totalmente expandidas, cultivadas na casa de vegetação. A inoculação foi feita com seringa descartável pela pressurização do tecido e infiltração da suspensão no tecido das cultivares. As mesmas foram avaliadas pela presença ou ausência de tecido com sintomas de clorose e necrose, comparando-as com a testemunha. Os testes bioquímicos servem para auxiliar na identificação de espécies ou grupos de bactérias através da verificação das transformações químicas que ocorrem em um determinado substrato,

através da ação de enzimas de um dado microrganismo, sendo repetidos no mínimo 4 vezes para cada isolado. Teste de gram por KOH 3%, é feito para identificar bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas, para isso, depositou-se uma gota de solução de KOH 3% sobre uma lâmina, transferindo com alça de platina o crescimento bacteriano, se a preparação apresentar um aspecto viscoso é considerado bactéria gram-negativa. Teste para presença de oxidase, são realizadas em tiras para reação oxidase, bactérias positivas para oxidase se tornam violetas em contato com a fita reagente, esse teste visa comprovar a produção de enzima citocromo *o*-oxidase, as bactérias dos gêneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Clavibacter* são oxidase negativa. Entre esses testes feitos, se encontram também os de Fluorescência em meio de cultura B-King, sob luz ultravioleta que permite a detecção da síntese de pioverdina, sendo um pigmento produzido por algumas espécies *Pseudomonas*, teste de catalase, para detectar a presença ou ausência da enzima Catalase nas bactérias, teste de atividade pectolítica, para saber se elas possuem a capacidade de degradação do amido, provocando apodrecimento do tecido, crescimento YDC, as bactérias do gênero *Xanthomonas* tem crescimento pronunciado quando cultivadas em meio de cultura com Extrato de levedura-dextrose-carbonato de cálcio, teste para hidrólise de arginina, pois a hidrólise do aminoácido arginina é característica restrita de algumas bactérias, teste para produção de levana, que é um polissacarídeo produzido na capsula de algumas bactérias. Para os testes moleculares, extraiu-se o DNA com os kits de extração de DNA *Wizard® Genomic Purification* (Promega), seguindo as instruções do fabricante, teste PCR, Eletroforese em gel de agarose e sequenciamento gnômico e análise filogenética. As fitobactérias *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* prevalecem como os principais agentes etiológicos de bacterioses foliares em trigo no Brasil. Dos 275 isolados obtidos, 79 foram considerados patogênicos (Tabela 1), o que representa 28,7% de patogenicidade. Dos 79 isolados, apenas 30 foram caracterizados de forma bioquímica e molecular devido algumas dificuldades encontradas que levaram perdas dos resultados. Todos os isolados desse estudo se caracterizaram como gram-negativos e catalase positivos, resultado esperado para os gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas*. As fitobactérias *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* prevalecem como os principais agentes etiológicas de bacterioses foliares em trigo no Brasil. Comprovou-se a existência de outras fitobactérias infectando folhas de plantas de trigo no Brasil. Este é o primeiro relato de *Pantoea allii* e *P. ananatis* infectando plantas de trigo no Brasil. Os métodos moleculares são essenciais na caracterização de bactérias fitopatogênicas do trigo, sendo os métodos bioquímicos indicados para complementar a caracterização. As estratégias de controle para bactérias são restritas e a única que se demonstra viável é a resistência varietal. Porém, com histórico de poucos estudos recentes sobre a etiologia das bacterioses de trigo no Brasil, acaba por dificultar os programas de melhoramento nas estratégias a serem utilizadas para seleção de cultivares com maiores níveis de resistência.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*. Doenças foliares. *Xanthomonas*. *Pseudomonas*. Bacteriose.