

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE E TÉCNICAS DE DETECÇÃO
DE BACTÉRIAS EM SEMENTES DE ARROZ**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cleidionara Pacheco

Santa Maria, RS, Brasil 2011

CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE E TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE BACTÉRIAS EM SEMENTES DE ARROZ

por

Cleidionara Pacheco

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria/RS (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil
2011

P116c Pacheco, Cleidionara
Caracterização da qualidade e técnicas de detecção de bactérias em sementes de arroz / por Cleidionara Pacheco. – 2011.
89 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Marlove Fátima Brião Muniz
Coorientador: Elena Blume
Coorientador: Nilson Lemos de Menezes
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, RS, 2011

1. Agronomia 2. Oriza sativa 3. Sementes de arroz 4. Qualidade das sementes 5. Bactérias I. Muniz, Marlove Fátima Brião II. Blume, Elena III. Menezes, Nilson Lemos de IV. Título.

CDU 633.18

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109
Biblioteca Central UFSM

© 2011

Todos os direitos autorais reservados a Cleidionara Pacheco. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser realizada com autorização por escrito do autor.

Endereço: Av. Roraima, Depto de Defesa Fitossanitária, prédio 42, sala 3225. Bairro Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900. Fone: (0xx) 55 9941-7463 - E-mail: cleidiagro@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE, E TÉCNICAS DE DETECÇÃO
DE BACTÉRIAS EM SEMENTES DE ARROZ**

elaborada por

Cleidionara Pacheco

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marlove Fátima Brião Muniz, Dra.
(Presidente/Orientadora) - UFSM

Nilson Lemos de Menezes, Dr. (UFSM)

Andréia Mara Rotta de Oliveira, Dra. (UERGS)

Santa Maria, 25 de fevereiro de 2011.

DEDICATÓRIA

*“À minha mãe **Jorema** por ser
um exemplo de coragem e superação;
e a meu pai **Albertino**
por ter dado o seu melhor.”*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Deus, pela vida, pela saúde e pelas oportunidades colocadas em meu caminho.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela formação adquirida e oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

Às empresas produtoras de sementes de arroz pela doação de amostras, sem as quais este trabalho não teria sido realizado.

À professora Dr^a. Marlove F. B. Muniz pela oportunidade, orientação e disponibilidade.

À Professora Dr^a. Elena Blume e ao Professor Dr. Nilson Lemos de Menezes, pela co-orientação deste trabalho.

À banca examinadora, Professora Dr^a. Andréia Mara Rotta de Oliveira. Professor Dr. Nilson Lemos de Menezes e Professora Dr^a. Lia Rejane Silveira Reininger - muito obrigada.

À minha família, em especial à minha mãe Jorema e a minha irmã Claudia, pela compreensão, incentivo, confiança, carinho, amor, por sempre acreditarem em mim e por serem a base de tudo que sou hoje – muito obrigada.

Aos colegas de laboratório: Marília Lazarotto, Graziela Piveta, Ricardo dos Santos, Geísa Finger, Marciéli Bovolini, Fábio Hamman, Miria Durigon, Jucéli Müller, Daniele Pedroso, Leonita Girardi, Ricardo Mezzomo, Leise Heckler, Tales Poletto, Diogo Lippert, Igor Poletto, pela convivência e auxílio nos trabalhos, e em especial a Cláudia B. Dutra, por ter sido meu “braço direito” na realização dos trabalhos, à Caciara G. Maciel, pela ajuda nos trabalhos e na parte estatística e à Paola M. Milanese pelas discussões sobre os trabalhos e ajuda na parte estatística. Meu muito obrigada.

À Maria Nevis Deconto Weber, laboratorista, não só pelo auxílio nos trabalhos, mas também pela compreensão, disponibilidade, conversas, risadas,

rodas de mate e principalmente por tornar o nosso laboratório um lugar melhor; um agradecimento especial.

Aos amigos presentes, que se tornaram a minha família: Cláudia B. Dutra, Paola M. Milanesi, Caciara G. Maciel, Marília Lazarotto, Maria N. D. Weber, muito obrigada pelas conversas, pelas risadas, pelo apoio e pelo carinho. Vocês moram no meu coração.

Aos amigos nem sempre presentes, mas que nem por isso se fizeram menos importantes: Graziela Piveta, Daiane de Mattos, Cristiane Pozzobon, Marisa Tomasi, Sidene G. Medeiros, Andriéli H. Bandeira, obrigada por fazerem parte do meu caminho.

À Victor Meireles Aires, pela compreensão, pelo incentivo, pela amizade, pelo carinho, pelo amor e por acreditar em mim – muito obrigada.

Aos funcionários, Fernando, Marizete e Angelita por todas as vezes que me auxiliaram quando precisei.

Aos que aqui não foram citados, mas por pensamentos ou ações fizeram parte deste percurso, obrigada.

Enfim, a todos, o meu
muito obrigada!

**“Com o tempo você aprende que...
... o que importa não é o que você tem
na vida, mas quem você tem na vida.
E que bons amigos são a família
que nos permitiram escolher...”
(William Shakespeare - O Menestrel)**

RESUMO GERAL

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE E TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE BACTÉRIAS EM SEMENTES DE ARROZ

AUTORA: CLEIDIONARA PACHECO
ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 25 de fevereiro de 2011.

Levando-se em consideração a importância da cultura do arroz, tanto no âmbito social como econômico, a relevância que os patógenos possuem no processo de desenvolvimento das culturas, os objetivos deste trabalho foram: caracterizar a qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de arroz, procedentes dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Goiás e Roraima; verificar a influência de diferentes níveis de contaminação, por fungos e bactérias, na qualidade fisiológica de sementes de arroz; testar o potencial patogênico das bactérias isoladas com relação às cultivares das quais foram provenientes; testar diferentes técnicas para o isolamento e desenvolvimento de bactérias em laboratório. Para avaliar a qualidade das sementes foi realizada a determinação do grau de umidade e aplicados os testes de germinação, primeira contagem de germinação, teste de frio, teste de sanidade ("Blotter Test"), além do teste de patogenicidade de bactérias, isoladas das sementes analisadas no "Blotter Test". Para a avaliação das técnicas de isolamento e desenvolvimento de bactérias utilizaram-se a combinação do método de extração lavado com os meios de cultivo PSA e Wakimoto e também a combinação do método de extração triturado com os meios de cultivo PSA e Wakimoto, avaliados nos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação com relação a número e tamanho de colônias bacterianas. De maneira geral, as amostras analisadas apresentam baixo vigor, boa capacidade de germinação, baixa incidência de fungos e, quando são analisadas conforme o seu Estado de origem, seguem o padrão do conjunto analisado. O teste de patogenicidade não apresentou nenhuma bactéria testada como sendo patogênica as plântulas de arroz as quais foram inoculadas. O meio de cultura PSA apresentou melhores resultados para a avaliação de tamanho e número de colônias ao longo do tempo, o período de incubação de 48 horas apresenta-se mais favorável para avaliação dos meios de cultura com relação ao número de colônias. O número de bactérias tende a estabilizar, e posteriormente, a diminuir ao longo do tempo. O método de extração triturado tende a ser mais eficiente, quando são avaliadas mais de uma amostra de sementes. As características das amostras de sementes influenciam nos resultados obtidos, independente do método de extração e do meio de cultivo utilizados.

Palavras-chave: *Oriza sativa*; qualidade de sementes; sanidade de sementes; bactérias; metodologias de detecção.

GENERAL ABSTRACT

Master of Science Dissertation
Graduate Program in Agronomy
Universidade Federal de Santa Maria – RS, Brazil

CHARACTERIZATION OF QUALITY AND TECHNIQUES FOR DETECTING OF BACTERIA IN RICE SEEDS

AUTHOR: CLEIDIONARA PACHECO
ADVISER: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ
Location and Date of Presentation: Santa Maria, february, 25 of 2011.

Taking into account the importance of rice, both in social and economic relevance that the pathogens are in the process of crop development objectives of this study was to characterize the physical, physiological and health of rice seeds, coming from the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Goiás, Roraima and verify the influence of different levels of contamination by bacteria and fungi on physiological quality of rice seeds, to test the pathogenic potential of isolates with different cultivars of which were derived; test different techniques for the isolation and growth of bacteria in the laboratory. To evaluate seed quality, tests were conducted moisture content, germination, first germination test, cold test, health testing (Blotter Test) beyond the test pathogenic bacteria were removed from their own seeds analyzed in the Blotter Test . For the evaluation of techniques for isolation and growth of bacteria we used the combined washed method of extraction with the PSA and Wakimoto culture media crushed method of extraction with PSA and Wakimoto culture media, evaluated the day 24, 48 and 72 hours of incubation with respect to number and size of bacterial colonies. In general, the samples have low vigor, good germination, low incidence of fungi and, when analyzed according to their state of origin, follow the standard set analyzed. The pathogenicity test showed no pathogenic bacteria tested as the rice seedlings were inoculated. The culture medium PSA is best used for the evaluation of colony size and number over time, the incubation period of 48 hours has become more favorable assessment of culture media on the number of colonies. The number of bacteria tends to stabilize and then decrease over time. The extraction method ground tends to be more efficient when they are evaluated over a sample of seeds. The characteristics of the seed samples influence the results, regardless of extraction method and the culture medium used.

Key words: *Oryza sativa*, seed quality, seed health, bacteria, detection methodologies.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1.** - Teor de água (%) de 70 amostras de sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros e submetidas à determinação do teor de água. Santa Maria, RS, 2010.....**51**
- Figura 3.2.** - Porcentagem de plântulas normais (% de germinação) de 70 amostras de sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros, submetidas ao teste de germinação. Santa Maria, RS, 2010.....**52**
- Figura 3.3.** - Porcentagem de plântulas normais de 70 amostras de sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros submetidas ao teste de primeira contagem de germinação. Santa Maria, RS, 2010.....**54**
- Figura 3.4.** - Porcentagem de plântulas normais de 70 amostras de sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros submetidas ao teste de frio. Santa Maria, RS, 2010.....**56**
- Figura 3.5.** - Número de amostras, de um total de 70 amostras de sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros, infectadas por fungos detectados pelo *Blotter Test*. Santa Maria, RS, 2010.....**58**
- Figura 4.1.** - Aspecto das colônias bacterianas crescidas no meio de cultura PSA. Santa Maria, RS, 2010. Cleidionara Pacheco, 2010.....**71**
- Figura 4.2.** - Coalescimento e “escorrimento” de colônias bacterianas. Santa Maria, RS, 2010. Cleidionara Pacheco, 2010.....**73**
- Figura 4.3.** – Número ($\times 10^{-4}/\text{mL}$) e tamanho de UFCs em relação ao tempo de incubação. Santa Maria, RS, 2010.....**76**
- Figura 4.4.** – Número ($\times 10^{-4}/\text{mL}$) de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) observadas nas amostras de sementes de arroz, em função dos métodos de extração. Santa Maria, RS, 2010.....**79**

Figura 4.5. - Número ($\times 10^{-4}$ /mL) de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) observadas nas amostras de sementes de arroz, em função dos métodos de extração lavado e sua associação com os meios de cultura de cultivo PSA e Wakimoto (WK). Santa Maria, RS, 2010.....**79**

Figura 4.6. – Número ($\times 10^{-4}$ /mL) de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) observadas nas amostras de sementes de arroz em função do método de extração triturado e sua associação com os meios de cultura de cultivo PSA e Wakimoto (WK). Santa Maria, RS, 2010.....**80**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1.** - Evolução da produção de arroz nos países do Mercosul, no período de 1999/2000 a 2009/2010. Fonte: FAO-<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>. Adaptado de SOSBAI, 2010.....**22**
- Tabela 3.1.** - Vigor (%) de sementes de 70 amostras sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros avaliadas pelo teste de primeira contagem de germinação e pelo teste de frio, aos 5 dias. Santa Maria, RS, 2010.....**57**
- Tabela 4.1.** – Número ($\times 10^{-4}/\text{mL}$) de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) observadas às 24, 48 e 72 horas em função do método de extração, do meio de cultura e da interação entre o método de extração e o meio de cultura utilizado para uma amostra de semente de arroz. Santa Maria, RS, 2010.....**72**
- Tabela 4.2.** - Tamanho de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) observadas às 24, 48 e 72 horas em função do método de extração, do meio de cultura e da interação entre o método de extração e o meio de cultura utilizado. Santa Maria, RS, 2010.....**74**
- Tabela 4.3.** – Número ($\times 10^{-4}/\text{mL}$) e tamanho de colônias observadas em função do método de extração, do meio de cultura e da amostra utilizada. Santa Maria, RS, 2010.....**77**

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1. - Quadro de amostras de sementes de arroz contendo código de identificação, cultivar, Estado de procedência e safra. Santa Maria, 2010.....	45, 46 e 47
Quadro 2.2. - Número da amostra de semente de arroz, número de bactérias amarelas e brancas utilizadas para o teste de patogenicidade. Santa Maria, 2010.....	50

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. – Formulação do meio de cultura NA.....	85
Anexo 2. – Formulação do meio de cultura PSA.	85
Anexo 3. – Formulação do meio de cultura Wakimoto.	85
Anexo 4. – Formulação do PBS Tampão.	85

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1 - Quadro de análise da variância para a variável número de UFCs em função dos métodos, dos meios de cultura utilizados e dos períodos de incubação.....	87
Apêndice 2 - Quadro de análise da variância para a variável tamanho de UFCs em função dos métodos de extração, dos meios de cultura utilizados e dos períodos de incubação.....	87
Apêndice 3 - Quadro de análise da variância para a variável número de UFCs em função dos tempos de incubação.....	87
Apêndice 4 - Quadro de análise da variância para a variável tamanho de UFCs em função dos tempos de incubação.....	88
Apêndice 5 - Quadro de análise da variância para a variável tamanho de UFCs em função dos métodos de extração, dos meios de cultura utilizados e das amostras utilizadas.....	88
Apêndice 6 - Quadro de análise da variância para a variável número de UFCs em função dos métodos de extração, dos meios de cultura utilizados e das amostras utilizadas.....	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
REFERÊNCIAS.....	36
CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, FÍSICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE ARROZ	41
3.1. Introdução.....	43
3.2. Material e métodos.....	45
3.2.1. Teor de água.....	47
3.2.2. Germinação.....	48
3.2.3. Primeira contagem de germinação.....	48
3.2.4. Teste de frio.....	48
3.2.5. Análise sanitária.....	48
3.2.6. Isolamento e teste de Gram de bactérias.....	49
3.2.7. Patogenicidade.....	49
3.3. Resultados e discussão.....	50
3.4. Conclusões.....	60
3.5. Referências.....	62
CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE SEMENTES DE ARROZ.....	64
4.1. Introdução.....	66
4.2. Material e métodos.....	67
4.2.1. Método de extração lavado.....	67
4.2.2. Método de extração triturado.....	68
4.2.3. Diluições seriadas.....	68

4.2.4. Plaqueamento da solução.....	69
4.2.5. Avaliação.....	69
4.2.5.1. Procedimento estatístico para a amostra individual (IRGA424).....	69
4.2.5.2. Procedimento estatístico para a comparação de diferentes amostras.....	70
4.3. Resultados e discussão.....	70
4.3.1. Comparação entre métodos de extração, meios de cultura e períodos de incubação para colônias bacterianas oriundas de sementes de arroz.....	71
4.3.1.2. Comparação entre métodos de extração, meios de cultura e diferentes amostras de sementes de arroz.....	76
4.4. Conclusões.....	80
4.5. Referências.....	82
ANEXOS.....	84
APÊNDICES.....	86

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz é uma excelente fonte de carboidratos, rico em proteínas, vitaminas, sais minerais e fibras e juntamente com o feijão, compõe uma das principais fontes de alimentação dos brasileiros. Em função disso, é uma cultura de primordial importância no país.

A maioria das lavouras de arroz encontra-se na região sul do país, sendo que o Estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor utilizando o sistema de cultivo irrigado. Em virtude da obtenção de novas cultivares, adaptadas aos sistemas de cultivo de sequeiro, o cultivo do arroz tem se estendido a novas regiões e Estados do Brasil, como Goiás, Mato Grosso, Roraima, entre outros.

Independentemente do sistema e da forma de cultivo a serem utilizados na produção de arroz, é preciso que se escolham sementes de boa qualidade para que haja sucesso na implantação das lavouras e estas alcancem uma boa produtividade. Quando se fala em qualidade, inclui-se neste termo não só a qualidade fisiológica, mas também a qualidade sanitária das sementes. Ambos os aspectos citados são importantes para que se tenham sementes consideradas aptas para semeadura.

No aspecto fisiológico, vale ressaltar a importância da germinação das sementes, sem a qual não há um bom estande de plantas na lavoura e conseqüentemente, não há a produção esperada. Além disso, o uso de sementes com baixa germinação aumenta os custos de implantação da lavoura, devido à necessidade de realizar ressemeadura, ou seja, voltar ao campo para colocar novas sementes onde a germinação foi falha.

Outros pontos ainda são importantes no aspecto fisiológico, como por exemplo, os parâmetros de vigor da semente. Os testes que avaliam o vigor das sementes submetem as mesmas às condições adversas, que se assemelham às condições que são encontradas no campo.

Uma semente sadia apresenta grande importância, pois a presença de patógenos pode afetar a germinação, fazendo com que essa nem germine, ou se germinar não emerja, mesmo que possua boa capacidade de germinação.

São vários os tipos de micro-organismos que podem estar associados às sementes, alguns destes podem ser patogênicos à planta, causando inúmeros danos desde o estabelecimento da cultura, até sua produtividade, já que alguns desses organismos, mesmo estando presentes desde a germinação, podem se manifestar apenas nas etapas posteriores de desenvolvimento da planta.

Dentre os micro-organismos causadores de doenças às plantas podem ser citados os fungos e as bactérias como principais representantes. Com relação às sementes, os fungos encontram-se associados às mesmas e podem causar o seu apodrecimento inviabilizando-as, além de utilizarem-nas como meio para disseminação de doenças a vários locais, onde não havia relatos de sua incidência. As bactérias podem causar sérios danos, porém, estes geralmente se manifestam durante o desenvolvimento da planta no campo, embora a semente também sirva de veículo para esse tipo de patógeno.

No Brasil existem alguns relatos de doenças causadas por bactérias que podem afetar a cultura do arroz durante o seu cultivo e, conseqüentemente, ocasionar perdas. Por serem ainda pouco significativas, ou seja, não terem o caráter de epidemia, ainda não lhes é dada a devida importância. Vale ressaltar que o risco da entrada de determinadas doenças endêmicas de outros países é grande, devido ao fato de os produtores utilizarem sementes oriundas de outros países ou de regiões de fronteira que não possuem a devida fiscalização, sendo estas uma fonte potencial da entrada de novos patógenos nas áreas de cultivo.

No Brasil a regulamentação de algumas pragas, estas em sua maioria, quarentenárias, é feita através da emissão de instruções normativas, que são utilizadas para fazer o controle da entrada no país de propágulos, sementes, mudas, colmos, estolões entre outros, garantindo assim que estes estejam livres deste tipo de praga. Porém é necessário que se façam inspeções, não apenas em sementes provenientes de outros países ou locais, por mais que se tenha uma fiscalização interna para que, dessa maneira, os danos e as perdas econômicas possam ser minimizados.

Embora se saiba da importância e das perdas que micro-organismos podem provocar nas culturas, os métodos para detecção dos mesmos em sementes não são utilizados de maneira efetiva e significativa.

Para que se tenha conhecimento da incidência de micro-organismos encontrados nas sementes é necessária a realização de testes para a detecção dos mesmos. Alguns testes são simples e considerados rápidos, porém outros são mais detalhados e requerem equipamentos especiais, além de pessoas treinadas especificamente para a sua realização. O tipo de técnica a ser utilizada para a detecção dos micro-organismos pode variar conforme a cultura analisada, o tipo de organismo, a associação deste organismo com a semente ou parte da planta

utilizada, o propágulo ou parte deste utilizada, além de se fazer uso de diferentes metodologias e equipamentos para que se possa realizar a detecção de maneira correta.

Embora existam inúmeras técnicas e metodologias sendo utilizadas para a detecção de patógenos, ainda não se possui uma padronização destas, tanto para uso em laboratórios de inspeção, quanto para uso em pesquisas, o que acaba por dificultar a implementação de avaliações que tenham um caráter nacional, onde se possa utilizar resultados obtidos em qualquer local como padrão de identificação da amostra.

Levando-se em consideração a importância da cultura do arroz, tanto no âmbito social como econômico, a relevância que os patógenos possuem no processo de desenvolvimento das culturas e todos os demais pontos abordados, os objetivos deste trabalho foram:

- caracterizar a qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de arroz, procedentes dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Goiás e Roraima;
- verificar a influência da contaminação, por fungos e bactérias, na qualidade fisiológica de sementes de arroz;
- testar o potencial patogênico das bactérias isoladas com relação às cultivares das quais foram provenientes;
- testar diferentes técnicas para extração, isolamento e desenvolvimento de bactérias em laboratório.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância sócio-econômica da cultura do arroz:

Sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas no mundo, o arroz é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana. É o segundo cereal mais cultivado, ocupando área aproximada de 158 milhões de hectares. A produção de cerca de 662 milhões de toneladas de grãos em casca corresponde a 29 % do total de grãos usados na alimentação humana (SOSBAI, 2010).

Aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia. A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo (ALONÇO, 2005). O consumo médio mundial de arroz é de 60 kg/pessoa/ano, na América Latina são consumidos, em média, 30 kg/pessoa/ano, destacando-se o Brasil como grande consumidor (45 kg/pessoa/ano) (SOSBAI, 2010).

O arroz constitui-se em alimento básico da maior parte da população brasileira, havendo a necessidade de se aumentar a produção de grãos para atender à crescente demanda decorrente do aumento populacional (FORNASIERI FILHO; FORNASIERI, 1993).

O arroz apresenta-se como a cultura com maior potencial de aumento de produção e responde pelo suprimento de 20 % das calorias mundialmente. Conseqüentemente desempenha papel estratégico na solução de questões de segurança alimentar. Apesar do grande volume produzido, o arroz é um produto com pequeno comércio internacional. Os 10 países maiores produtores são, em ordem decrescente: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Mianmar, Filipinas, Brasil e Japão (SOSBAI, 2010).

No ano agrícola 2003/04, a produção nacional deu um salto de quase 2,5 milhões de toneladas e superou a estimativa de consumo. A maior parte desse aumento de produção ocorreu nas Regiões Sul e Centro-Oeste, mais especificamente nos Estados do Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Goiás. O aumento de 27% na produção decorreu de aumento de 14% na área cultivada e também de aumento na produtividade média nacional, nessa safra favorecida por boas condições climáticas. Neste sentido, o Estado de Goiás vem adquirindo

importância no âmbito orizícola devido às crescentes produções apresentadas (EMBRAPA-CNPAF, 2006).

Com uma produção estimada em 12 milhões de toneladas na safra 2008/09 (IBGE, 2008), o Brasil se destaca como o maior produtor de arroz fora do continente Asiático. No período compreendido de março a setembro (ano agrícola), as exportações superaram significativamente as importações no mesmo período. O “superávit” na balança comercial do arroz, em 2008, alcançou, aproximadamente, 80 mil toneladas, ou um diferencial de 25% para as vendas externas. As exportações resultaram em um faturamento de US\$ 211,2 milhões (IRGA, 2008). Os altos índices de produtividade se devem aos avanços obtidos com o emprego de novas cultivares, resistentes a doenças causadas por fatores bióticos e abióticos e pelo emprego de técnicas de manejo do solo e cultivo.

O Brasil, com uma produção anual entre 11 e 13 milhões de toneladas de arroz nas últimas safras, participa com cerca de 82 % da produção do MERCOSUL, seguido pelo Uruguai, Argentina e, por último, o Paraguai, com menos de 1 % do total (Tabela 2.1.) (SOSBAI, 2010).

Tabela 2.1. – Evolução da produção de arroz nos países do MERCOSUL, no período de 1999/2000 a 2009/2010.

País/ Região	Produção por safra (mil toneladas)						
	1999/00	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10*
Brasil	11.090	13.193	11.527	11.080	12.060	12.602	11.357
Uruguai	1.209	1.215	1.146	1.200	1.300	1.286	1.149
Argentina	904	956	1.193	1.075	1.246	1.350	1.240
Paraguai	101	102	126	132	135	260	280
MERCOSUL	13.304	15.466	13.992	13.487	14.741	15.298	14.026

*Dados estimados.

Fonte: FAO - <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>. Adaptado de: SOSBAI, 2010.

O Rio Grande do Sul se destaca como o maior produtor nacional, sendo responsável por cerca de 61 % do total produzido no Brasil, seguido por Santa Catarina com produção em torno de 8 a 9 %. Esse grande volume produzido nos dois estados sulinos, totalizando cerca de 70 %, é considerado estabilizador para o

mercado brasileiro e garante o suprimento desse cereal à população brasileira. A quase totalidade do arroz produzido no RS e em SC apresenta grãos da classe longo-fino, com alta qualidade de cocção, características exigidas no mercado brasileiro, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Cerca de 12 % do arroz produzido no RS e 30% da produção de Santa Catarina são consumidos nos respectivos Estados e o restante é exportado para os demais centros consumidores (SOSBAI, 2010).

No Rio Grande do Sul o arroz é produzido em 133 municípios localizados na metade sul do Estado, onde 232 mil pessoas vivem direta ou indiretamente da exploração dessa cultura. O setor agroindustrial opera, atualmente, com 350 indústrias de beneficiamento e responde por quase 50 % do beneficiamento do arroz no País. Segundo o levantamento efetuado pelo IRGA (2006), 18,5 mil pessoas participaram da produção da safra 2004/05, sendo 11,9 mil produtores e 6,6 mil parceiros ou proprietários de terra. O tamanho médio das lavouras era de 144,7 ha, com cerca de 60 % da área cultivada em terras arrendadas (SOSBAI, 2010).

No Estado de Santa Catarina, a produção de arroz na última década cresceu 42%, passando de 613 mil para 871,6 mil toneladas. A área de cultivo aumentou de 109,6 mil ha (1991/92) para 126,1 mil ha em 2000/01 (crescimento de 15,1%), e a produtividade média ultrapassou os 5.600 kg ha⁻¹ da safra 1991/92 para, atualmente, atingir 6.900 kg ha⁻¹ (EMBRAPA - CNPAF, 2008a).

Em Santa Catarina, o cultivo de arroz é realizado totalmente no sistema pré-germinado, alcançando uma produtividade ao redor de 7.000 kg ha⁻¹, em uma área de 126 mil ha. O Estado ocupa o segundo lugar na produção de arroz irrigado, com cerca de 800 mil toneladas anuais (EMBRAPA - CNPAF, 2008a).

Em Santa Catarina o arroz é produzido em 142 municípios, concentrados no Litoral ou próximo (Região do Baixo e Médio Vale do Itajaí), com 92 % da área, e no Alto Vale do Itajaí, com 8 % da área. Na safra 2008/09 havia 8.499 agricultores produzindo arroz irrigado em 11,23 mil propriedades, sendo 32 % delas arrendadas. Trata-se de pequenas propriedades, com área média de 13,3 ha. O setor agroindustrial operou com 66 indústrias de beneficiamento, concentradas nas Regiões de Araranguá (30) e Criciúma (18), com capacidade para beneficiar 1.500 mil t/ano de arroz em casca, bem superior à produção estadual, o que o leva a importar arroz em casca de outros estados, principalmente do Rio Grande do Sul. O

principal produto originário das indústrias catarinenses é o arroz parboilizado (SOSBAI, 2010).

Comumente denominado de arroz de terras altas ou cultivo de terras altas, o cultivo de sequeiro necessita do uso de cultivares específicas e com características de adaptação ao seu sistema de cultivo e manejo. A cultivar da Embrapa mais cultivada em terras altas é a BRS Sertaneja, que tem como características, a precocidade, grãos longo finos, plantas vigorosas, com porte médio, folhas largas e mediana resistência ao acamamento. A BRS Sertaneja possui uma ampla capacidade de adaptação, com bom comportamento nos Estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Rondônia, Pará, Roraima, Maranhão, Piauí e Tocantins. Apesar da preferência dos produtores pela Sertaneja, tem aumentado a área semeada com as cultivares BRS Monarca e BRS Pepita, lançadas recentemente. A Monarca se destaca em áreas de recuperação de pastagem e áreas degradadas, enquanto que a Pepita em cultivo sob irrigação com pivô central, principalmente no estado de Goiás. (EMBRAPA CNPTT, 2010).

2.2. Qualidade de sementes

A lavoura de arroz têm se destacado, principalmente, pela modernização no que se refere à introdução de novas variedades de maior potencial produtivo, manejo e gerenciamento, que acrescentaram rentabilidade a esta cultura. Um ponto fundamental desta modernização é o rápido desenvolvimento nas pesquisas com relação a novas cultivares, o que faz com que haja um grande avanço na qualidade das sementes. A semente, do ponto de vista agrônomo, é o insumo que dá origem a um novo cultivo e da qual, em função de suas características e da maneira como é utilizada, dependem os resultados da nova safra (MENON et al., 1993).

A qualidade da semente de arroz é um dos principais fatores que influenciam a população inicial de plantas. Além de propiciar estabelecimento mais rápido e uniforme da lavoura, o uso de sementes de alta qualidade, por garantir a população de plantas desejada, aumenta a eficiência de uso de fertilizantes e corretivos e reduz os prejuízos causados pela competição com plantas daninhas. A utilização de sementes de qualidade é pré-requisito fundamental para obtenção de lavouras com alta produtividade de grãos e sustentabilidade, especialmente nas semeaduras realizadas no início do período recomendado (SOSBAI, 2010).

A semente é o veículo que leva ao agricultor todo o potencial genético de uma nova e superior cultivar. A qualidade da semente é de fundamental importância para o agricultor, porque somente sementes de elevado nível de qualidade propiciam a maximização da ação dos demais insumos e fatores de produção empregados na lavoura (CARRARO, 2001).

Considera-se uma semente de alta qualidade aquela de espécies e cultivares livres de sementes de plantas daninhas e outras espécies, com elevada capacidade germinativa e vigor, adequadamente tratadas, com grau de umidade adequado e de boa aparência geral, para que se possa obter homogeneidade de população, ausência de moléstias transmissíveis por sementes, elevado vigor das plantas e, conseqüentemente, maior quantidade e qualidade (AOSA, 1983).

A qualidade da semente é o somatório de todos os atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que afetam a sua capacidade de originar plantas de alta produtividade (SANTOS et al., 2000a). A qualidade fisiológica da semente significa sua capacidade para desenvolver funções vitais, abrangendo germinação, vigor e longevidade (POPINIGIS, 1985).

A qualidade fisiológica é, rotineiramente, avaliada pelo teste padrão de germinação, que supre condições favoráveis de umidade e temperatura, permitindo expressar o potencial máximo de um lote em produzir plântulas normais. Entretanto, esse teste pode ser pouco eficiente para indicar o desempenho no campo, onde as condições nem sempre são ideais (ISELY, 1957). Em função disto, desenvolveu-se o conceito de vigor e, conseqüentemente, diversos testes têm sido propostos para avaliar de forma mais precisa a qualidade fisiológica (MCDONALD JÚNIOR, 1975). Alguns são de fácil execução, baixo custo e rápidos, embora nem sempre completamente padronizados em suas metodologias.

Juntamente com a germinação, o vigor é o fator que determina um rápido e uniforme estabelecimento da população de plântulas no campo, sendo considerado o atributo de qualidade que melhor expressa o desempenho da semente. O vigor tem por objetivo distinguir os níveis de qualidade fisiológica das sementes, que não são possíveis de detectar pelos testes de germinação (KRYZANOWSKY e FRANÇA NETO, 1999).

Com o uso de uma série de testes padronizados e o exame detalhado das amostras, que permitem um maior grau de segurança na comparação dos

resultados, deve-se realizar a avaliação da qualidade de sementes (MARCOS FILHO et al., 1987).

A viabilidade é avaliada inicialmente pelo teste de germinação. Este teste diz respeito à capacidade das sementes darem origem a plântulas normais em condições ideais, condições as quais, garantem a expressão total do potencial da semente. Por ser realizado em condições controladas em laboratório. O conceito de vigor foi desenvolvido e com ele, novos testes que são de grande utilidade no monitoramento da qualidade de sementes (PASQUALLI, 2005).

O vigor das sementes é o primeiro componente da qualidade que apresenta sinais de deterioração, posteriormente ocorre uma redução na germinação ou na produção de plântulas normais e então ocorre a morte da semente (FERGUSON, 1995).

Existem inúmeros testes recomendados para avaliar o vigor das sementes. O teste de frio é um dos testes utilizados para avaliar a qualidade dos lotes de sementes de arroz. A exposição das sementes a fatores adversos de temperatura e umidade constitui-se no princípio básico deste teste. Em seus primórdios, este teste utilizava como substrato o solo, porém pela necessidade de padronização do mesmo, houve o surgimento do uso alternativo do rolo de papel, a partir do qual pode se perceber diferenças de vigor em sementes provenientes de diferentes beneficiamentos, além de apresentar uma boa correlação com a emergência em campo (PETERS, 1992).

2.3. Qualidade sanitária de sementes

A qualidade sanitária das sementes é consequência da ação integrada de uma série de fatores, que ocorrem durante todo o processo de produção. É uma característica que deve ser avaliada, uma vez que a associação de patógenos às sementes pode implicar em redução do rendimento e comprometimento da qualidade das mesmas (MACHADO, 1988).

A cultura do arroz é afetada por doenças durante todo seu ciclo, as quais reduzem a produtividade e a qualidade dos grãos. Os fungos são os principais organismos patogênicos que podem se associar às sementes de arroz, abrangendo aproximadamente 50 espécies já relatadas (EMBRAPA-CNPAF, 2008b).

As sementes são atacadas por patógenos no campo e nas operações subsequentes (colheita, secagem e beneficiamento), o que afeta a sua qualidade e reduz sua capacidade germinativa. A interferência dos patógenos associados às sementes pode promover redução da população de plantas, debilitação das plantas e desenvolvimento de epidemias. O estudo da associação de fungos encontrados em maior número e frequência sobre sementes e a avaliação do seu potencial patogênico é de fundamental importância, pois pode fornecer subsídios para modelos epidemiológicos, produção de mudas e armazenamento de sementes (SANTOS et al., 2000b).

Deste modo, vem sendo reconhecida, de forma crescente, a importância dos problemas fitossanitários (ARAÚJO e ROSSETO, 1987). Além dos aspectos de transmissão e suas consequências epidemiológicas, a presença de certos patógenos nas sementes pode resultar em efeitos diretos, como redução do potencial germinativo, do vigor, da emergência, do período de armazenamento e até do rendimento (ITO e TANAKA, 1993).

Sementes com fungos associados podem ser responsáveis pela transmissão de doenças para a parte aérea e sistema radicular da planta. (LUCCA FILHO, 1995). Os fitopatógenos podem estar associados às sementes tanto na sua superfície, quanto em seu interior. Eles se apresentam nas mais variadas formas de propagação, desde o esporo até estruturas de resistência, micélios e outras estruturas específicas dos diversos grupos de fungos, bactérias, nematóides e vírus (SANTOS et al., 2000b).

Os patógenos, presentes nas sementes, tornam-se ativos tão logo encontrem condições favoráveis, podendo não só atacar a semente, mas também a plântula, quando essa estiver emergindo do solo. Em ambos os casos, pode-se ter perdas na população de plantas. Para recuperar esta falha, pode ser necessária uma nova semeadura, visando obter uma população normal. Estes processos, além de serem mais onerosos, contribuem para o desenvolvimento de um alto potencial de inóculo inicial, para as plantas no estágio adulto ou na época da maturação (SANTOS et al., 2000b).

É necessário que se utilizem meios de detecção mais específicos para bactérias, pois estas podem não apresentar sintomas específicos que podem ser confundidos com outras doenças ou desbalanços nutricionais. O uso de meios seletivos para a detecção de bactérias está sendo, a cada dia, mais ampliado

(KLEMENT et al., 1990), utilizando-se a semeio direto de sementes ou técnicas de extração.

Alguns patógenos não afetam a semente ou a emissão de plântulas, mas a infectam de forma sistêmica, reduzindo seu vigor e só manifestando sintomas mais tarde. Às vezes, produzem lesões nos cotilédones, onde o patógeno esporula, produzindo inóculo secundário, o qual irá infectar as plantas originárias de sementes saudáveis. Assim, uma semente infectada dá origem a uma planta doente, que por sua vez, contamina as outras saudáveis (LUZ, 1993).

É importante considerar que as sementes são potenciais disseminadoras de pragas e moléstias de uma região para outra, exigindo muita atenção e cuidados por parte do produtor. Além disso, a associação patógeno-semente é responsável por uma série de danos que podem implicar em maiores gastos para o produtor.

2.4. Detecção de fungos e bactérias

Com relação ao controle de qualidade de sementes, o teste de sanidade é utilizado para definir o perfil de qualidade de um lote, juntamente com outros testes que indicam as condições de germinabilidade, vigor, pureza física e identidade genética (BRASIL, 2009).

Estudos para avaliar a qualidade sanitária das sementes são geralmente conduzidos em ambientes com umidade e temperaturas muito favoráveis aos fungos saprófitas. A presença destes micro-organismos muitas vezes, mascara os resultados obtidos, pois estes influenciam na morte das sementes, o que não se sabe se é devido a algum problema fisiológico ou a incidência dos fungos (ALFENAS e MAFIA, 2007).

Para cada teste pode existir um ou mais métodos, que para serem desenvolvidos baseiam-se em diferentes princípios e fundamentos. A opção de escolha por um ou por outro método irá depender, em princípio, do objetivo do teste. É oportuno salientar que um mesmo agente patogênico pode ser detectado por diferentes métodos, havendo diferenças entre eles em relação à sensibilidade, custos, complexidade de execução, e objetivos do teste (BRASIL, 2009).

O agrupamento dos fungos pode ser feito com base na natureza de parasitismo destes organismos, biotróficos e necrotróficos. A classificação taxonômica clássica e moderna torna-se também de grande valor. 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. 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 (BRASIL, 2009).

A detecção de bactérias em sementes é um passo primordial para o controle em face de uma série de implicações epidemiológicas (NEERGAARD, 1979).

As bactérias podem sobreviver nas sementes, como latente, em baixas populações tendo sua multiplicação paralisada. A semente infectada pode ou não exibir sintomas, sendo que, na maioria das vezes não os apresenta. Neste caso, se as sementes forem postas para germinar em substrato esterilizado 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. Para a diferenciação em nível de gênero são adotadas características micro-biológicas, morfológicas, bioquímicas, de crescimento e moleculares (BRASIL, 2009).

Embora existam várias técnicas para detecção e quantificação de bactérias fitopatogênicas em sementes, algumas são onerosas e exigem equipamentos sofisticados e/ou pessoal especificamente treinado, como é o caso do uso de bacteriófagos, de imunofluorescência, de sorologia ou de sondas de DNA (SCHAAD, 1987; KLEMENT et al., 1990). Outras, menos dispendiosas, exigem muito espaço físico disponível e a obtenção de resultados é demorada: plantio direto, cultivo de sementes em meio semi-sólido, inoculação de extrato de sementes em plantas suscetíveis, etc. (SCHAAD, 1987).

O uso de meios seletivos está sendo, a cada dia, mais ampliado (KLEMENT et al., 1990), utilizando-se o semeio direto de sementes ou técnicas de extração e de enriquecimento. Entretanto a escolha da metodologia a ser utilizada é função de inúmeros fatores e para cada sistema biológico e objetivo do estudo, a metodologia deve ser adaptada (SCHAAD, 1987).

Meios seletivos permitem determinar a porcentagem de sementes infectadas, quantificar populações em sementes, bem como em solos e em restos culturais.

Possuem vantagens de serem de fácil execução e de rápida obtenção de resultados (KLEMENT et al., 1990).

Inúmeras são as maneiras para que se possa realizar a detecção de fungos e bactérias em sementes, porém algumas ainda possuem a necessidade de adequação a determinadas culturas ou a determinados patógenos, o que indica que há, ainda, a necessidade da realização constante de novas pesquisas nessa área.

2.5. Fungos em arroz

A produtividade da cultura do arroz é afetada por diversos fatores, onde as doenças fúngicas são responsáveis por vários danos, aproximadamente 20 e 50%, na produtividade das lavouras de arroz no Rio Grande do Sul. Muitos fungos podem estar associados às sementes, sendo um veículo de disseminação de patógenos para novas áreas de plantio. Sementes de arroz constituem importante fonte de inóculo primário, os quais podem introduzir em uma região novas raças fisiológicas e/ou novos isolados com diferente especialização patogênica (BALARDIN e BORIN, 2001).

As sementes de arroz podem ser atacadas por fungos durante o cultivo no campo ou após a colheita durante o período de armazenamento. Desta forma, tem-se os fungos considerados de campo e os de armazenamento. Os principais fungos de campo que diminuem a qualidade dos grãos e sementes de arroz são *Pyricularia grisea*, *Drechslera oryzae*, *Gerlachia oryzae* e *Phoma* sp.; estes fungos tendem a diminuir e até mesmo desaparecer durante o processo de beneficiamento do arroz. Os fungos de armazenamento, que proliferam em maior intensidade nas sementes no período de pós-colheita são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* principais responsáveis pela deterioração dos grãos armazenados. Os principais danos causados pelos fungos são: diminuição do poder germinativo das sementes, descoloração e manchas nos grãos, aquecimento e emboloramento, alterações da composição química dos grãos, produção de toxinas e perdas da matéria seca (CORNÉLIO et al., 2006).

Aspergillus spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp., são fungos responsáveis por causarem podridões em sementes. Segundo BEDENDO (1995) estes fungos são favorecidos quando o teor de água na semente encontra-se em torno de 25%.

Os fungos *Alternaria* spp., *Phoma* spp., *Bipolaris* spp. e *Fusarium* spp. podem causar manchas das glumas ou mancha dos grãos. Segundo FUNK e KEMPF (2008) essa doença ocorre nas lavouras gaúchas que são semeadas mais tardiamente, embora surja com menor frequência em lavouras semeadas nas demais épocas; além de causar esterilidade de espiguetas, ocorre a depreciação visual do produto colhido, em função do escurecimento dos grãos antes do beneficiamento. Caso esta doença ocorra em associação com temperaturas baixas, pode ocorrer uma porcentagem maior de esterilidade e de grãos manchado após o beneficiamento. *Alternaria padwickii*, embora seja considerado um patógeno fraco e que não causa grandes danos com relação à sanidade e germinação das sementes, tem sido encontrado com bastante frequência na região do Estado de Minas Gerais associado a outros fungos como *Helminthosporium* spp., *Helminthosporium oryzae*, *Alternaria tenuis* e *Curvularia lunata* (TANAKA, 1986). Esta espécie de fungo do gênero *Alternaria* pode causar mancha nas folhas conhecidas como mancha circular ou mancha de *Alternaria*. Conforme FUNK e KEMPF (2008), esta doença se estabelece em temperaturas entre 26 e 28°C e é disseminada principalmente via sementes infestadas, solo e restos culturais.

Bipolaris spp. também é conhecido como causador da mancha marrom ou mancha parda em arroz. Nesta doença, o fungo pode causar lesões nas folhas e nos grãos e seus sintomas vão depender da suscetibilidade das cultivares; na emergência ocorrem os maiores danos devido à morte de plantas pequenas, o que irá contribuir para a redução da densidade de plantas na lavoura (FUNK e KEMPF, 2008). Segundo estes autores, a doença se inicia pela germinação dos esporos que estão contidos nas sementes, o que pode reduzir a germinação ou ocasionar a morte de plântulas; posteriormente ocorre o ataque nas folhas, no colmo e nos grãos, o que irá resultar numa nova infestação das sementes.

Rhizoctonia spp. pode causar mancha e queima das bainhas, em ambas as doenças os sintomas ocorrem na bainha das folhas e no colmo, em ataques severo podem ocorrer queimas parciais ou totais das folhas o que pode culminar no acamamento de plantas; a disseminação deste patógeno se dá através do solo e restos culturais o que pode ocasionar um ataque já na emergência das plantas (FUNK e KEMPF, 2008).

2.6. Bactérias fitopatogênicas

As bactérias são organismos microscópicos, unicelulares, que possuem parede celular. Não possuem núcleo verdadeiro como o de organismos superiores, separado do restante dos outros componentes celulares por uma membrana, e seu material genético, um DNA circular de fita simples, se localiza diretamente no citoplasma da célula. Além desse DNA, possuem os plasmídeos, DNAs extra-cromossômicos, que controlam certas características exibidas por estes organismos (ALMEIDA, 2006).

As bactérias fitopatogênicas estão distribuídas em vários gêneros, espécies e subespécies, separadas entre si por características culturais, bioquímicas, fisiológicas e sorológicas. Recentemente, o emprego de técnicas moleculares promoveu profundas mudanças na taxonomia das bactérias fitopatogênicas. Atualmente, são reconhecidos 26 gêneros de bactérias fitopatogênicas, sendo que representantes de muitos desses gêneros (incluindo espécies, subespécies e patovares) já foram assinalados em nosso país. Alguns desses patógenos são responsáveis por graves prejuízos econômicos, chegando a constituir fator limitante à exploração comercial de diversas culturas de importância econômica. Entretanto, diversas doenças de etiologia bacteriana e importantes economicamente, que ocorrem em outros países, ainda não foram observadas no Brasil e sua introdução em áreas indenes constitui uma ameaça real (ALMEIDA, 2001).

A grande maioria das bactérias fitopatogênicas são parasitas facultativos, possuindo mecanismos versáteis de sobrevivência fora da planta hospedeira. A partir da penetração nas raízes, a bactéria multiplica-se nos espaços intercelulares das células do córtex, invade o parênquima vascular chegando aos vasos do protoxilema através da degradação da parede celular (WALLIS e TRUTER, 1978). Uma vez estabelecida a bactéria no tecido vegetal, ocorre o aparecimento da doença ou contrariamente, seu reconhecimento pela planta hospedeira, expressão de mecanismos de defesa específicos ou de uma resposta hipersensível, com consequente falha no estabelecimento da bactéria no tecido da planta (OUCHI, 1983; GROSS e CODY, 1985; MCKHANN e HIRSCH, 1994, MELLOR e COLLINGE, 1995).

As interações estabelecidas entre a bactéria e a planta é que vão especificar a patogenicidade. E a partir disto, a planta apresentará diferentes sintomas ou

diferentes reações ao contato com a bactéria. Desta forma, a capacidade patogênica das bactérias apresenta-se como uma fonte de estudo.

Em condições favoráveis, doenças bacterianas podem ser responsáveis por grandes prejuízos, chegando em alguns casos a serem limitantes à exploração econômica de plantas. Além disso, os sintomas ocasionados por bactérias fitopatogênicas também podem ser causa de impedimento de exportações, além de servirem de porta de entrada a outros organismos patogênicos (ALMEIDA, 2006).

2.7. Bactérias fitopatogênicas em arroz

Inúmeras bactérias podem utilizar a semente como meio de sobrevivência ou de dispersão, em vista disto, a detecção de bactérias em sementes é um passo primordial para o controle em face de uma série de implicações epidemiológicas (NEERGAARD, 1979).

A bactéria *Burkholderia glumae*, anteriormente conhecida como *Pseudomonas glumae* é uma bactéria aeróbia, Gram negativa, o que provoca a doença conhecida como podridão bacteriana da panícula de arroz, que se expressa na planta como uma podridão da bainha, descoloração e esterilidade dos grãos. O patógeno causador da doença, inicialmente coloniza a folha bandeira invadindo as espiguetas na época da floração causando, posteriormente, a deterioração da semente. A bactéria pode se disseminar através de sementes, solo e plantas daninhas hospedeiras no campo. O processo de infecção depende de susceptibilidade varietal, a quantidade de inóculo e dos fatores climáticos, que desempenham um papel importante na incidência e severidade da doença. Esta doença se desenvolve em condições de alta temperatura, principalmente à noite, alta umidade e chuvas frequentes. O período mais suscetível à infecção é durante a emergência da panícula, o sintoma pode ser percebido três dias após a floração e vai aumentando sua incidência e severidade até a fase de grão leitoso e pastoso (PRADO, 2010).

A espécie *Xanthomonas oryzae* inclui dois patovares: *oryzae* e *orizicola*, os quais são responsáveis, respectivamente, pelas doenças denominadas queima bacteriana e estria bacteriana. Estes patógenos são reconhecidos mundialmente como os agentes causadores das enfermidades bacterianas mais importantes que afetam a cultura do arroz (SWINGS et al., 1990). *X.oryzae* pv.*oryzae* e *X.oryzae*

pv.oryzicola são patógenos estreitamente relacionados, associados e transmitidos pela semente, e têm como principal hospedeiro o arroz (OEPP/EPPO, 2006a; OEPP/EPPO, 2006b). O aparecimento de sintomas distintos em plantas infectadas por estes dois patovares se deve as diferenças no processo de infecção. *X. oryzae pv. oryzae* infecta o hospedeiro através de aberturas naturais como os hidatódios ou de ferimentos e coloniza os vasos do xilema, onde se multiplica e se dissemina de forma sistêmica, resultando na necrose repentina das folhas e no aparecimento do sintoma conhecido como crestamento ou queima bacteriana (GNANAMANICKAM et al., 1999; AKHTAR et al.,2008). *X. oryzae pv. oryzicola* ao contrário de *X. oryzae pv. oryzae* não é sistêmica, infecta a planta através dos estômatos dos tecidos do parênquima das folhas, causando estrias internervais, iniciam translúcidas, que vão se tornando escuras com o passar do tempo. Nessa fase é difícil distinguir os sintomas daqueles causados por *X. oryzae pv. oryzae* (XIE e MIEW, 1998; NIÑO-LIU et al., 2006). O aparecimento dos sintomas em qualquer fase de desenvolvimento da planta é favorecido por temperaturas acima de 28°C e umidade alta, o que facilita a ocorrência dessas doenças em países de clima tropical e subtropical, principalmente em sistemas de cultivo irrigado (GOTO, 1992). Em estudos de análise de risco de pragas, MARTINS e OLIVEIRA (2007) alertaram para o risco de estabelecimento de *X. oryzae pv. oryzae* no Brasil. Segundo os autores, o patógeno tem elevado potencial de adaptação em zonas de clima temperado e tropicais do país, em especial na região sul, que tem por tradição o cultivo de arroz em sistema irrigado e na região norte onde o arroz é cultivado em áreas alagadas, sem necessidade de irrigação.

Uma doença bacteriana do arroz, "podridão do pé bacteriana", foi encontrado no Japão em julho de 1977. Ela foi caracterizada por uma deterioração marrom escuro dos afilhos. Nos estágios iniciais da doença, a podridão da bainha marrom parecia se espalhar a partir das regiões da lígula. As lesões estenderam-se rapidamente para nós, colmos e, finalmente, coroas. Perfilhos vizinhos da mesma coroa foram invadidos sistemicamente, causando sintomas de podridão do pé. Ocorria o desenvolvimento de uma podridão mole, com um odor desagradável, em tecidos jovens de perfilhos infectados. No estágio avançado, muitas mudas ficam deterioradas, de modo que todas as plantas doentes podem ser removidas facilmente com um leve puxão. A síndrome foi semelhante aos danos causados pela broca do colmo do arroz ou o sintoma "kresek" da mancha foliar bacteriana. As

características fenotípicas da bactéria encontrada nas sementes de arroz foram muito semelhantes as de uma patovar de *Erwinia chrysanthemi* encontrada no milho (GOTO,1979).

No outono de 2008, uma nova doença bacteriana de arroz foi observada em arrozais perto de Hangzhou, província de Zhejiang, na China. A doença causou uma forte descoloração nos grãos de arroz na cv. Zhong zhe-lhe 1 (*Oryza sativa* L.). Isso ocorria frequentemente no florescimento precoce de arroz híbrido. Inicialmente, lesões aquosas e oxidadas apareciam no lema ou na palea e posteriormente, estas ficavam amarronzadas. Um maior número de grãos imaturos e chochos foram observados nas panículas colhidas. Não foi observado exsudação bacteriana. Dez isolados foram recuperados a partir de oito amostras de grãos de arroz descoloridos. Seis isolados foram selecionados para a identificação. Eles foram semelhantes aos da estirpe de referência de *Pantoea ananatis* (sinônimo *Erwinia uredovora*). Este patógeno também provoca queima das folhas e decadência do bulbo da cebola. Este é o primeiro relato de descoloração em arroz causada por *P. ananatis* na China (YAN et al, 2010).

Estas, entre outras bactérias, podem atacar a cultura do arroz e lhe causar vários danos e perdas, em virtude disto, é necessário que se intensifiquem os estudos de identificação e isolamento de bactérias em sementes de arroz.

2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR , M. A. et al. Comparison of methods of Inoculation of *Xanthomonas Oryzae* pv. *oryzae* in rice cultivars **Pakistan Journal of Botany**, v 40 (5) p.2171-2175, 2008.

ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa. Ed. UFV, 382 p, 2007.

ALONÇO, A.S. **Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil**. Sistemas de Produção, 2005. Disponível em: <<http://www..cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 21/10/2010.

ALMEIDA, I.M.G. de. Bactérias fitopatogênicas exógenas. **Palestra**. Biológico, São Paulo, v.63, n.1/2, p.45-47, jan./dez., 2001.

ALMEIDA, I.M.G. de. Importância de bactérias fitopatogênicas em plantas ornamentais e seu controle. **Palestra**. XIV Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico - Plantas Ornamentais, Pariquera-Açu – SP, 6 e 7 de abril de 2006.

ARAÚJO, E., ROSSETO, E.A. Doenças e injúrias de sementes. In: SOAVE, J.C., WETZEL, M.M.V.S. (eds.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill/ ABRATES-COPASEM, p.146-163,1987.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA. **Seed vigour testing handbook**. Lincoln: AOSA, 93p, 1983.

BALARDIN, R. S.; BORIN, R. C. **Doenças na cultura do arroz irrigado**. Santa Maria: UFSM, 48 p, 2001.

BEDENDO, I.P. Podridão em órgãos de reserva. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. Vol 1, 3ª Ed., São Paulo, 919p., 1995

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, 200 p, 2009.

CARRARO, I.M. Semente: insumo nobre. **Seed News**, Pelotas, n.5, p. 34-35, 2001.

CORNÉLIO, V.M.O, et al.; FUNGOS ASSOCIADOS A GRÃOS DE ARROZ, In: Congresso Brasileiro da Cadeia Produtiva de Arroz (2 .: 2006 : Brasília, DF). **Anais** [do] 2º Congresso Brasileiro da Cadeia Produtiva de Arroz / VIII Reunião Nacional

de Pesquisa de Arroz – Renapa, Brasília, DF, 26 a 28 de abril de 2006. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ARROZ E FEIJÃO - EMBRAPA-CNPAF: **Cultivo de arroz de terras altas no Estado do Mato Grosso (2006)**: importância econômica. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/index.htm>>. Acesso em 15/10/2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ARROZ E FEIJÃO - EMBRAPA-CNPAF: **Participação dos principais Estados produtores de arroz no Brasil (2008a)**. Disponível em:

<http://www.cnpaf.embrapa.br/apps/socioeconomia/docs/arroz/produtores_arroz.htm>. Acesso em 15/10/2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – CENTRO NACIONAL DE PESQUISA EM ARROZ E FEIJÃO - EMBRAPA-CNPAF: **Pragas e doenças do arroz (2008b)**. Disponível em:

<<http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/pragasedoenças/index.htm>>. Acesso em 15/10/2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA - EMBRAPA Cnptt: Cultivo de arroz em terras altas conta com tecnologias da Embrapa (2010). **Planeta arroz: Notícias**, Cachoeira do Sul, Rio Grande do Sul, 11 de novembro de 2010. Disponível em:

<http://www.planetaarroz.com.br/site/noticias_detalhe.php?idNoticia=8226>. Acesso em: 11/11/2010.

FERGUSON, J.N. Aintroduction to seed vigour testing. In: SEED VIGOUR TESTING SEMINAR,1995,Copenhagen. **Proceedings...**Zürich: Internacional Seed Testing Association, p. 1-9,1995.

FORNASIERI FILHO, D., FORNASIERI, J. L. **Manual da cultura do arroz**. Jaboticabal: FUNEP, 221 p., 1993.

FUNK,G.D.; KEMPF. D. Doenças do arroz irrigado no Rio Grande do Sul, **Boletim Técnico nº5**, Instituto Rio-Grandense do Arroz- IRGA, Divisão de Pesquisa, 38p., 2008.

GNANAMANICKAM, S.S. et al. An overview of bacterial blight disease of rice and strategies for its management. **Current Science**. v77, p.1435-1443. 1999.

GOTO, M. Bacterial foot rot of rice caused by a strain of *Erwinia chrysanthemi*. **Phytopathology**. V.69, N.3, P.213-216. 1979.

GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. Academic Press Inc., San Diego, California (US).1992

GROSS, D.C.; CODY, Y.S. Mechanisms of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.31, p.403-410, 1985.

INSTITUTO RIO GRANDENSE DE ARROZ IRRIGADO – IRGA. **Importação e exportações brasileiras de arroz (2008)**. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br/index.php?action=dados_safra_detalhes&cod_dica=57>. Acesso em 20/10/2010.

ISELY, D. Vigor tests. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, East Lansing, v.4, p. 176-182,1957.

ITO, M.F.; TANAKA, M.A.S. **Soja: principais doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides**. Campinas. Fundação Cargill. (Série Técnica, 186). 1993.

KLEMENT, Z.; RULDOPH, K., SANDS, D.C. (Eds.). **Methods in Phytobacteriology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1990.

KRYZANOWSKY, F., FRANÇA NETO, J. Vigor de sementes. **Seed News**, Pelotas, n.11, p.20-24. 1999.

LUCCA FILHO, O.A. **Curso de tecnologia de sementes**. Brasília: ABEAS, 53p, 1995.

LUZ, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças das plantas. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 33-70, 1993.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras: ESAL/FAEPE, 107p, 1988.

MARCOS FILHO, J.; CICERO, S. M.; SILVA, W. R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: FEALQ, 230 p, 1987.

MARTINS, O.M.; OLIVEIRA, M.R.V. Pest risk analysis on the agent of bacterial blight of rice, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. In: **International Plant Protection Congress**, 16., 2007. Glasgow. Congress Proceedings...Glasgow: BCPC, p.566-567. 2007.

MCDONALD JUNIOR, M. B. A review and evaluation of seed vigor tests. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, East Lansing, v.65, p.109-139, 1975.

MCKHANN, H.I.; HIRSCH, A.M. Does *Rhizobium* avoid the host response? In: DANGL, J.I., ed. **Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals**, Berlin: Springer-Verlag, p.139-162, 1994.

MELLOR, R.B.; COLLINGE, D.B. A simple model based on known plant defence reactions is sufficient to explain most aspects of nodulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.46, p.1-18, 1995.

MENON, J.C.M.; et al. Avaliação da qualidade física e fisiológica da semente de soja produzida no estado do Paraná na safra 1989/901. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 15, n.2, p. 203-208, 1993.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Mac Millan Press, 839p, 1979.

NIÑO-LIU, D. O., et. al., *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. **Molecular Plant Pathology**. v.7, p.303-324. 2006.

OEPP/EPPO. **Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae***. (2006a) <http://www.eppo.org/QUARANTINE/> (Acesso em 12/11/2010).

OEPP/EPPO. **Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola***. (2006b) Disponível em: <http://www.eppo.org/QUARANTINE/> (Acesso em 12/11/2010).

OUCHI, S. Inducion of resistance or susceptibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.21, p.289-315, 1983.

PASQUALLI, L.L. **Qualidade de sementes de arroz irrigado submetidas a diferentes temperaturas na secagem estacionária**. 48f, 2005. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, RS, 2005.

PETERS, A.C. **Avaliação de testes de vigor em sementes de arroz (cv BR IRGA 414) e suas relações com a emergência a campo**. 44f , 1992. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1992.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 289p, 1985.

PRADO, G. **Patólogo colombiano sugiere medidas para manejo bacteria en arroz**, 2010. Disponível em:

<http://www.idiaf.org.do/noticias/detallemain.php?recordID=1042> Acesso em: 17/11/2010

SANTOS, M. R.; et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de genótipos de soja colhidas em três regiões de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília, v.22, n.2, p. 62-71, 2000a.

SANTOS, A. F.; GRIGOLETTI Jr., A; AUER, C. G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Floresta**, v. 30, p. 119-128, 2000b.

SCHAAD, N.W. Use and limitations of methods of detect seed-borne bacteria. In: **Seed Pathology International Advanced Course**. Passo Fundo,RS, v.1, p.324-32. 1987.

SOSBAI – Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Reunião técnica da cultura do arroz irrigado, 11 a 13 de agosto de 2010, Bento Gonçalves, RS. – Porto Alegre: SOSBAI,2010.

SWINGS, J. et al. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Isiyama 1922) sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.40, p.301–311. 1990

TANAKA, M. A. de S. Fungos associados a sementes de arroz com descoloração de grãos em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 8, n. 2, p. 85-90, 1986

XIE, G. L.,; MEW, T. W. A leaf inoculation method for detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* from rice seed. **Plant Disease**. v.82, p1007-1011. 1998.

WALLIS, F.M.; TRUTER, S.J. Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. **Physiological Plant Pathology**, v.13, p.307-317, 1978.

YAN, H. et al. Grain Discoloration of Rice Caused by *Pantoea ananatis* (synonym *Erwinia uredovora*) in China. **Plant Disease**. V. 94, N. 4 P. 482, 2010.

CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA, FÍSICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE ARROZ

RESUMO

O arroz é cultivado em todos os Estados brasileiros, sendo que em alguns, é uma das principais fontes de renda da exploração agrícola. Para se identificar de maneira completa a qualidade de sementes se faz necessário o uso de um conjunto de testes que abranjam a parte fisiológica, a parte física, e também o vigor para que se possa caracterizar as amostras de sementes. A produtividade da cultura do arroz é afetada por vários fatores, dentre eles podem ser citadas as doenças fúngicas. Uma ampla gama de fungos pode utilizar as sementes como veículo de sobrevivência e disseminação. Além dos fungos, bactérias também apresentam-se como uma fonte causadora de doenças que pode ocasionar perdas na cultura do arroz. As bactérias, assim como os fungos podem utilizar as sementes como forma de sobrevivência e disseminação. Objetivou-se com este trabalho caracterizar a qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de arroz procedentes de diferentes Estados produtores do Brasil e verificar a influência da contaminação, por fungos, na qualidade fisiológica de sementes de arroz e indicar o nível de patogenicidade das bactérias oriundas das sementes analisadas. Para avaliar a qualidade das sementes foi determinado o teor de água e foram realizados os testes de germinação, primeira contagem de germinação, teste de frio, teste de sanidade (*Blotter Test*) além do teste de patogenicidade de bactérias que foram retiradas das próprias sementes analisadas no *Blotter Test*. De maneira geral, as amostras analisadas apresentam baixo vigor, boa capacidade de germinação, baixa incidência de fungos e, quando são analisadas conforme o seu Estado de origem, seguem o padrão do conjunto analisado. O teste de patogenicidade não apresentou nenhuma bactéria testada como sendo patogênica as plântulas de arroz.

Palavras-chave: *Oryza sativa*, qualidade de sementes, patogenicidade de bactérias.

PHYSIOLOGICAL, PHYSICAL AND HEALTH CHARACTERIZATION OF RICE (*Oryza sativa*) SEEDS

ABSTRACT

The rice is grown in all Brazilian states, and in some it is a major source of farm income. In order to fully identify the seed quality it is necessary to use a set of tests covering the physiological part, the physical part, and also the force so that we can characterize the seed samples. The rice productivity is affected by various factors, they can be handed references to fungal diseases. A wide range of fungi can use the seeds as a means of survival and spread. In addition to fungi, bacteria also appear as a root cause of diseases that can cause losses in rice. Bacteria, like fungi, can use the seeds as a means of survival and spread. The objective of this study is to characterize the physical, physiological and health quality of rice seeds from different producing states of Brazil and the influence of different levels of contamination by fungi on physiological quality of rice seeds and by testing indicate the level of pathogenicity of pathogenic bacteria from analyzed seeds. To evaluate seed quality tests were conducted moisture content, germination, first germination test, cold test, health testing (Blotter Test) beyond the test pathogenic bacteria were removed from their own seeds analyzed in the Blotter Test. In general, the samples have low vigor, good germination, low incidence of fungi and, when analyzed according to their state of origin, follow the standard set analyzed. The pathogenicity test showed no bacteria tested as pathogenic to rice seedlings were inoculated.

Key words: *Oryza sativa*, seed quality, pathogenic bacteria.

3.1. Introdução

O arroz apresenta grande importância na alimentação da população brasileira e, em função disto, o seu cultivo passou a ser largamente difundido. É cultivado em todos os Estados brasileiros, sendo que em alguns, é uma das principais fontes de renda da exploração agrícola.

A cultura do arroz se adapta a diferentes condições de clima, e possui grande potencial para ampliação de sua produção e contribuir para o combate à fome, pois fornece 20% de energia e 15% da proteína necessárias ao homem.

Para se identificar de maneira completa a qualidade de sementes se faz necessário o uso de um conjunto de testes que abranjam a parte fisiológica, como germinação, a parte física, como o teor de água, e também o vigor, como o teste de frio e primeira contagem, para que se possa caracterizar as amostras de sementes.

A qualidade fisiológica de sementes é um dos fatores considerados para que se obtenham sementes de maior qualidade. A análise deste fator é fundamental e muito valioso em um programa de produção de sementes. Uma semente com boas características fisiológicas tende a influenciar positivamente na formação de plantas com capacidade de desenvolvimento.

A determinação do teor de água, juntamente com o teste de pureza são os testes mais utilizados nos laboratórios de análises para descrever a qualidade física da semente. Através dele podem ser identificadas as condições de armazenamento além da condição física da semente.

A germinação, a pureza e a sanidade são critérios de qualidade que são comumente avaliados nos laboratórios de análise de sementes. Estes parâmetros são de grande importância para avaliar a qualidade de sementes, porém também se faz necessário a manifestação da capacidade das sementes emergirem no campo. Devido a esta necessidade, o vigor de sementes passou a ser utilizado como critério para avaliar a qualidade quando se faz referência ao desempenho das sementes no campo.

O teste de germinação é o mais utilizado para medir a viabilidade e estimar o potencial de emergência a campo. Porém, este teste é realizado em condições ideais nos laboratórios, o que dificilmente irá acontecer em nível de campo, isso pode fazer com que haja uma super estimativa da emergência, pois o vigor das sementes é composto por mais fatores do que a sua viabilidade.

O termo vigor de sementes, embora seja antigo, passou a ser fator importante na qualidade de sementes há poucas décadas. Este passou a fazer parte da qualidade de sementes a partir dos estudos dos seus efeitos sobre a emergência e o comportamento das sementes no campo.

Desde então, não apenas o teste de germinação, mas também testes de vigor, para que se possa ter uma visão mais ampla do potencial da semente.

A produtividade da cultura do arroz é afetada por vários fatores, dentre eles podem ser citadas as doenças fúngicas que são responsáveis por perdas de 20 a 50% na produtividade das lavouras de arroz no Rio Grande do Sul. Uma ampla gama de fungos pode utilizar as sementes como veículo de sobrevivência e disseminação. Sementes contaminadas por fungos podem ser fonte importante de inóculo primário, ou seja, introduzir em áreas, antes isentas, patógenos muitas vezes especializados em um tipo diferenciado de patogenicidade. (BALARDIN e BORIN, 2001).

As sementes de arroz podem ser atacadas por fungos durante seu cultivo no campo ou após sua colheita, durante o armazenamento. Os principais fungos de campo que diminuem a qualidade dos grãos e sementes de arroz são *Pyricularia grisea*, *Drechslera oryzae*, *Gerlachia oryzae* e *Phoma* sp.. Os fungos de armazenamento, que proliferam em maior intensidade nas sementes durante o armazenamento são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, responsáveis pela deterioração das sementes armazenadas. Os principais danos causados pelos fungos são: diminuição do poder germinativo das sementes, descoloração e manchas nos grãos, aquecimento e emboloramento, alterações da composição química dos grãos, produção de toxinas e perdas da matéria seca.

Além dos fungos, bactérias também apresentam-se como uma fonte causadora de doenças que podem ocasionar perdas na cultura do arroz. Doenças como crestamento bacteriano, a estria da folha, podridão da raiz, podridão do grão ou da panícula e podridão parda da bainha são doenças que ocorrem nessa cultura e são causadas por bactérias. As bactérias, assim como os fungos podem utilizar as sementes como forma de sobrevivência e disseminação.

Avaliando-se a importância da qualidade fisiológica e física, do vigor e da sanidade de sementes, este trabalho teve como objetivos caracterizar a qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de arroz procedentes dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Goiás e Roraima e verificar a influência da

contaminação, por fungos, na qualidade fisiológica de sementes de arroz e verificar a patogenicidade dos isolados bacterianos oriundos das sementes analisadas.

3.2. Material e métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minusi do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM.

Foram utilizadas sementes de arroz de diferentes cultivares e locais, obtidas de produtores de semente. No Quadro 2.1 constam os códigos numéricos (pelos quais as amostras foram denominadas), a cultivar, a procedência e a safra da qual as mesmas são provenientes.

CÓDIGO DA AMOSTRA	CULTIVAR	ESTADO DE PROCEDÊNCIA	SAFRA
1	PUITÁ INTA CL	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
2	IRGA 424	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
3	PUITÁ INTA CL	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
4	PUITÁ INTA CL	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
5	IRGA 424	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
6	PUITÁ INTA CL	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
7	IRGA 424	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
8	PUITÁ INTA CL	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
9	PUITÁ INTA CL	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
10	PUITÁ INTA CL	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
11	BRS 7 TAIM	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
12	IRGA 417 - S1	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
13	IRGA 423	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
14	IRGA 409	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
15	IRGA 424	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
16	PUITÁ INTA CL	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
17	IRGA 417	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
18	IRGA 417	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
19	BR IRGA 409	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
20	PUITÁ INTA CL	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
21	IRGA 424	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
22	EPAGRI 108	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009

Quadro 2.1. - Quadro de amostras de sementes de arroz contendo código de identificação, cultivar, Estado de procedência e safra. Santa Maria, 2010.

23	IRGA 417	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
24	PUITÁ INTA CL	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
25	IRGA 418	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
26	EPAGRI 114	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
27	IRGA 422 CL	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
28	IRGA 417	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
29	MONARCA	GOIÁS	2007/2008
30	SERTANEJA	GOIÁS	2007/2008
31	BONANÇA	GOIÁS	2007/2008
32	PRIMAVERA	GOIÁS	2007/2008
33	EPAGRI	SANTA CATARINA	2008/2009
34	IRGA 422	RIO GRANDE DO SUL	2008/2009
35	PEPITA	GOIÁS	2007/2008
36	AVAXI CL*	RORAIMA	2007/2008
37	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
38	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
39	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
40	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
41	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
42	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
43	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
44	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
45	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
46	SCS BRS TIOTAKA	SANTA CATARINA	2008/2009
47	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
48	SCS BRS TIOTAKA	SANTA CATARINA	2008/2009
49	SCS BRS TIOTAKA	SANTA CATARINA	2008/2009
50	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
51	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
52	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
53	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
54	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
55	SCS 114 ANDOSAN	SANTA CATARINA	2008/2009
56	EPAGRI 115	SANTA CATARINA	2008/2009
57	EPAGRI 114	SANTA CATARINA	2008/2009
58	EPAGRI 109	SANTA CATARINA	2008/2009
59	EPAGRI 108	SANTA CATARINA	2008/2009
60	EPAGRI 113	SANTA CATARINA	2008/2009
61	SC 114	SANTA CATARINA	2008/2009
62	SC 108	SANTA CATARINA	2008/2009
63	SC 112	SANTA CATARINA	2008/2009

Quadro 2.1. – Continuação... Quadro de amostras de sementes de arroz contendo código de identificação, cultivar, Estado de procedência e safra. Santa Maria, 2010.

64	BRS 113	SANTA CATARINA	2008/2009
65	SC 109	SANTA CATARINA	2008/2009
66	EPAGRI 115	SANTA CATARINA	2008/2009
67	SCS 114	SANTA CATARINA	2008/2009
68	EPAGRI 118	SANTA CATARINA	2008/2009
69	SCS 112	SANTA CATARINA	2008/2009
70	SCS- BRS TIOTAKA	SANTA CATARINA	2008/2009

*Cultivar tratada com 2,5 litros de Vitavax Thiran[®].t⁻¹ de semente.

Quadro 2.1. – Continuação... Quadro de amostras de sementes de arroz contendo código de identificação, cultivar, Estado de procedência e safra. Santa Maria, 2010.

Foram analisadas setenta (70) amostras. Destas, trinta e cinco (35) eram procedentes do Estado de Santa Catarina, vinte e nove (29) do Rio Grande do Sul, cinco (5) de Goiás e uma (1) de Roraima. Algumas amostras eram da mesma cultivar, mesma safra e do mesmo local de produção, porém eram oriundas de diferentes produtores, o que pode ocasionar diferenças nos testes em função da diferença no manejo da cultura e também pelo micro-clima na área de produção. Como do Estado de Roraima havia apenas uma amostra, esta foi usada como comparativo com as demais quando fez-se a estratificação por Estado.

Após o recebimento das sementes, as amostras foram submetidas à avaliação de qualidade física, fisiológica e sanitária através dos seguintes testes e determinações:

3.2.1. Teor de água

O teor de água das sementes foi determinado com base no peso úmido, pelo método de estufa a alta temperatura, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Utilizaram-se duas sub-amostras de 5g de peso úmido de sementes, colocadas em estufa a uma temperatura constante de 105 °C, com oscilações possíveis de $\pm 3^{\circ}$ C, durante um período de 24 horas. Após esse período, as sub-amostras secas foram pesadas. O resultado final foi expresso pela média aritmética em porcentagens das sub-amostras. O teor de água da semente foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\% U = \frac{100 (P - p)}{P - t}$$

Onde: **P** = peso úmido da semente + peso do recipiente; **p** = peso seco da semente + peso do recipiente; **t** = tara (peso do recipiente).

3.2.2. Germinação

O teste de germinação foi conduzido com 200 sementes, distribuídas em quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram semeadas em rolo de papel filtro, umedecido com água destilada e esterilizada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Posteriormente, os rolos foram acondicionados em sacos plásticos e levados para câmaras do tipo BOD (Biological Oxygen Density) a uma temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas de luz. As contagens foram realizadas aos cinco e aos 14 dias após a semeadura, segundo os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

3.2.3. Primeira contagem de germinação

O teste de primeira contagem foi realizado conjuntamente com o teste de germinação, constituindo o registro da porcentagem de plântulas normais verificadas na primeira contagem do teste de germinação, realizada conforme as Regras para Análise de Sementes (2009), aos cinco dias.

3.2.4. Teste de frio

O teste de frio foi realizado com quatro repetições de 50 sementes, semeadas em rolo de papel filtro, umedecido com água destilada e esterilizada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Em seguida, os rolos foram acondicionados em sacos plásticos, permanecendo por cinco dias em câmara à temperatura constante de 10°C . Após esse período, os mesmos foram transferidos para o germinador ($20\text{-}30^{\circ}\text{C}$) onde permaneceram por mais sete dias, os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais.

3.2.5. Análise sanitária

O teste de sanidade foi realizado através do método do papel filtro ou *Blotter Test*. Utilizou-se uma amostra de 200 sementes de cada amostra, divididas em quatro repetições de 50 cada, colocadas em caixas plásticas do tipo "gerbox",

previamente desinfestadas com álcool e hipoclorito de sódio (1%) por um minuto, sob duas folhas de papel filtro umedecidas com água destilada e esterilizada. As sementes foram incubadas a 25°C, com 12 horas de regime de luz, durante 24 horas. Em seguida, para a inibição da germinação, foram submetidas ao método do congelamento por 24 horas. Após esse procedimento, foram então incubadas a 25°C por cinco dias, com 12 horas de regime de luz conforme metodologia proposta por Brasil (2009). As avaliações foram realizadas com o auxílio de microscópio estereoscópico e óptico para observação das estruturas morfológicas dos fungos, os quais foram identificados em nível de gênero, com o auxílio da bibliografia especializada de Barnett e Hunter (1998), determinando-se a porcentagem de sementes infestadas por fungos.

3.2.6. Isolamento e teste de Gram para bactérias

Durante as avaliações do *Blotter Test* foram isoladas bactérias que apresentaram exsudação nas sementes. As bactérias apresentavam coloração esbranquiçada e amarelada. Estas bactérias foram isoladas em meio de cultura NA (Anexo 1) e incubadas pelo período de 24 horas para seu crescimento.

Após este período de incubação foi realizado o teste de Gram pelo método de Ryce (SUSLOW et al., 1982), que consiste na transferência, de maneira asséptica, com um palito de dente esterilizado uma porção da colônia bacteriana para uma gota de solução de KOH (3%), em uma lâmina limpa, flambada e esfriada ao ar; após 15 segundos de agitação circular, pode-se observar os resultados.

A partir do teste de Gram foram selecionadas bactérias que eram Gram-negativas, o que é uma característica comum a grande maioria das bactérias fitopatogênicas. Estas bactérias foram colocadas em tubos Ependorff contendo 1 mL meio NA (Anexo 1) e armazenadas em refrigerador (4°C) para posterior teste de patogenicidade.

3.2.7. Patogenicidade

De todas as bactérias isoladas, foram escolhidas aquelas oriundas de amostras de sementes que apresentaram germinação superior a 80% (Quadro 2.2) e então realizou-se o teste de patogenicidade de maneira direta, ou seja, as bactérias foram inoculadas em plântulas das sementes das quais foram isoladas. A

inoculação foi realizada através da técnica do palito, onde plântulas de arroz com 15 dias foram inoculadas através do contato com as bactérias pela introdução de um palito de dente estéril, que foi contaminado com bactérias, em seu colo. As plântulas foram mantidas em condições ambiente (temperatura, umidade e fotoperíodo).

Número da amostra	Número de bactérias amarelas	Número de bactérias brancas	Total
5	2	0	2
7	2	0	2
9	2	0	2
14	0	1	1
16	0	1	1
17	1	0	1
25	2	0	2
28	2	0	2
33	0	2	2
44	1	2	3
47	1	0	1
48	0	1	1
50	1	0	1
60	1	2	3
70	4	1	5

Quadro 2.2. - Número da amostra de semente de arroz, número de bactérias amarelas e brancas utilizadas para o teste de patogenicidade. Santa Maria, 2010.

Foram realizadas avaliações diárias, por um período de 20 dias após a inoculação, observando-se a presença de lesões ou sintomas de doenças bacterianas, como murcha ou podridão por exemplo. Utilizaram-se quatro repetições de 10 plântulas para cada combinação de amostra + bactéria utilizada, bem como para cada testemunha.

Não foi realizada a análise da variância e nem teste de médias pois o objetivo desse estudo foi apenas caracterizar e não qualificar as amostras com relação aos fatores analisados.

3.3. Resultados e discussão

Os valores de teor de água (Figura 3.1.) variaram de 6,2 a 12,5%, pode-se observar ainda que a maioria das amostras, 48 das 70 analisadas, encontram-se

com o teor de água entre 10 e 12%. Das 36 amostras originárias de Santa Catarina, 27 apresentam teor de água entre 10 e 11,7% e as restantes (9) apresentaram teor de água de 6,2 a 9%. Das amostras do Rio Grande do Sul (29), 24 tiveram teor de água entre 10 e 12,2% e cinco amostras tiveram resultados inferiores a esta porcentagem. Todas as amostras do Estado de Goiás (5) tiveram teor de água superior a 10% e a amostra do Estado de Roraima (1) teve sua umidade detectada em 9,2%.

Segundo CARVALHO (1994) a umidades das sementes deve-se situar entre 11 e 13% e teores de água acima de 13% são considerados elevados e inadequados para o armazenamento de sementes. Para MARCHEZAN et al. (2001) umidades elevadas em sementes apresentam-se como um dos principais fatores que corroboram para a deterioração das sementes, pois o metabolismo é ativado e consequentemente, aumenta a respiração das sementes, favorecendo a ação de micro-organismos.

Algumas amostras (18) apresentaram umidade inferior a 10%, supõe-se que estes valores sejam em decorrência das condições de armazenamento aos quais as sementes foram submetidas. Os teores de água (11-12,5%) encontrados em grande parte das amostras, (31), são compatíveis com a preservação das sementes durante o armazenamento.

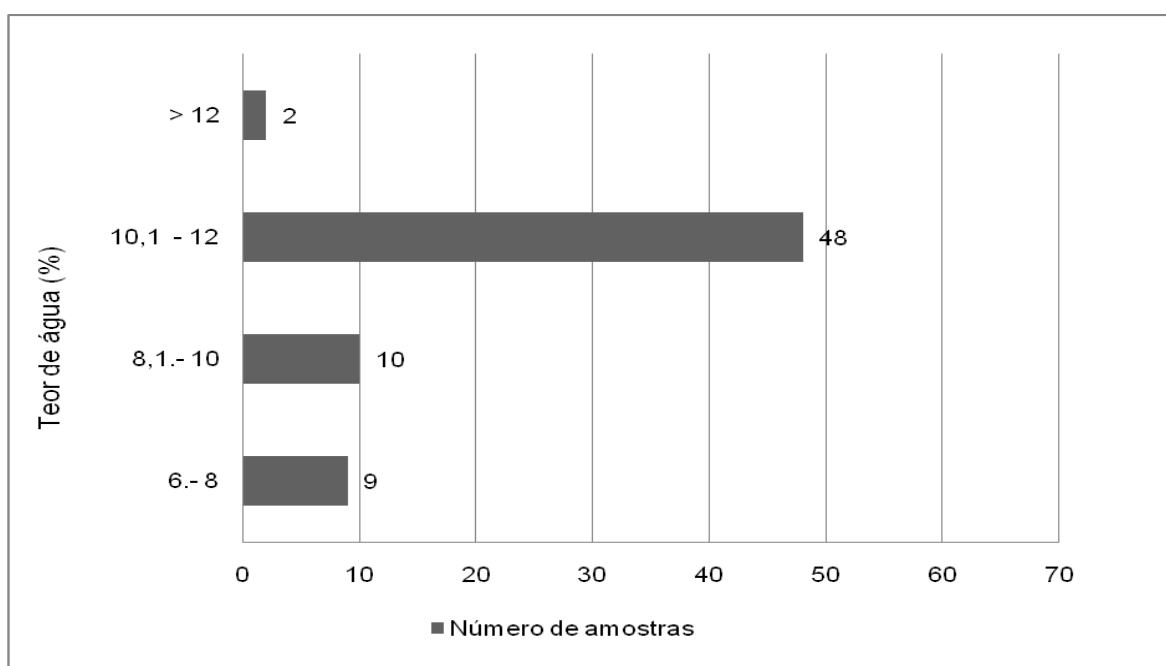


Figura 3.1-Teor de água (%) de 70 amostras de sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros e submetidas a determinação do teor de água. Santa Maria, RS, 2010.

Na Figura 3.2. encontram-se os valores obtidos no teste de germinação de 70 amostras de sementes de arroz utilizadas neste trabalho. Os dados encontram-se expressos em porcentagem de plântulas normais obtidas no teste de germinação.

O teste de germinação tem como objetivo determinar o potencial máximo de germinação de um lote de sementes, o qual pode ser usado para comparar a qualidade de diferentes lotes e também estimar o valor para semeadura em campo (BRASIL, 2009).

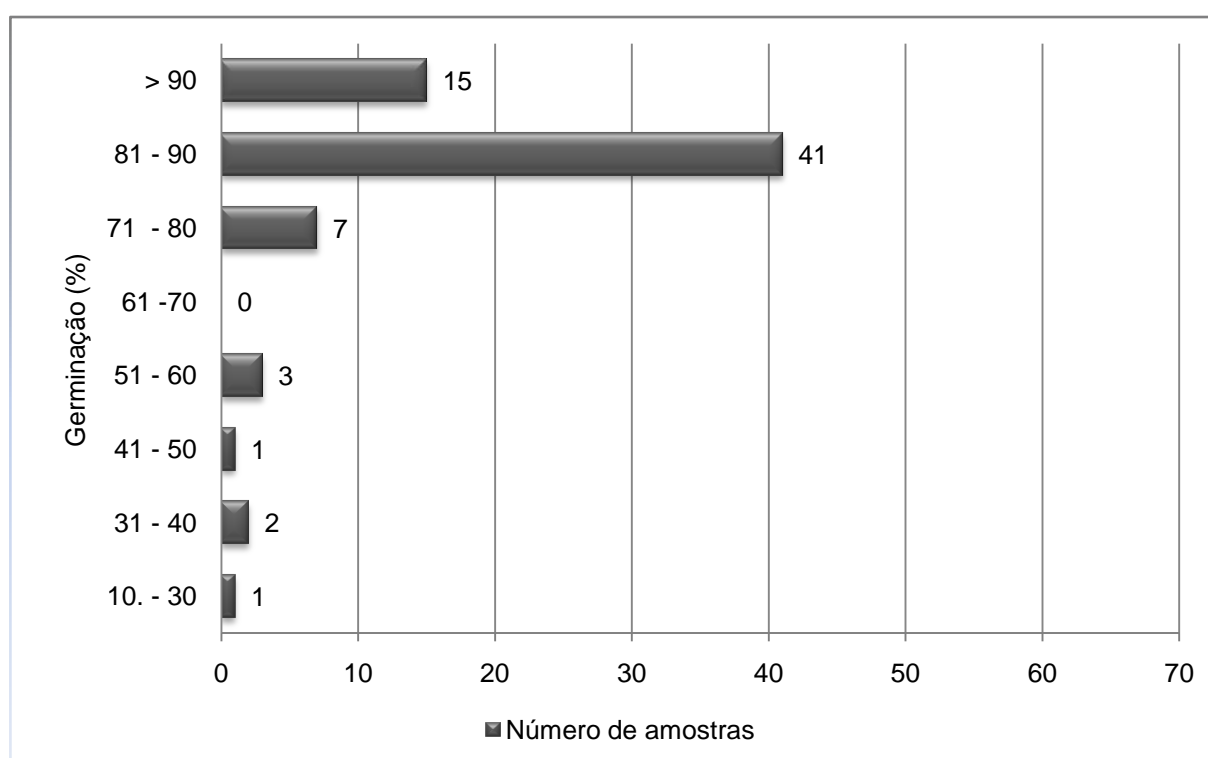


Figura 3.2. - Porcentagem de plântulas normais (% de germinação) de 70 amostras de sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros, submetidas ao teste de germinação. Santa Maria, RS, 2010.

Pode-se observar que a maioria das amostras (58) encontram-se com porcentagens de germinação acima de 80%, o que é um dos requisitos necessários para que uma amostra seja considerada própria para utilização como semente, sendo este, o limite mínimo de germinação, aceito para comercialização de sementes no Estado do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 1998).

Das amostras do Rio Grande do Sul, 26 apresentaram porcentagens de germinação superiores ou iguais a 80%, o mesmo ocorreu com as amostras de

Santa Catarina, onde 28 apresentaram este mesmo resultado. As amostras de Goiás apresentaram germinação muito baixa, todas inferiores a 10%, o que pode ser justificado pelo fato de estas amostras serem de uma safra anterior as demais analisadas e conseqüentemente terem ficado armazenadas por um período maior de tempo o que fez com que suas sementes perdessem a viabilidade e se tornassem impróprias para a semeadura. A amostra de Roraima obteve a maior porcentagem de germinação (98%); esta era a única que possuía tratamento com fungicida, e no teste de sanidade, como será visto posteriormente, não foi detectada a presença de nenhum gênero fungico, o que pode, ter colaborado para seu alto índice de germinação.

A maioria das amostras (51) apresentou um teor de água que mantinha a qualidade da semente durante o seu armazenamento (10-12,5%) e os resultados encontrados no teste de germinação confirmam este dado, ou seja, as amostras que obtiveram valores de umidade dentro dos parâmetros considerados satisfatórios não tiveram seu poder germinativo afetado.

As amostras do Estado de Goiás, embora tivessem seus níveis de umidade dentro dos considerados satisfatórios, apresentaram baixíssima germinação, porém este fato deve estar ligado ao maior período de armazenamento que esta sofreu quando comparada com as demais amostras. Quando a determinação do teor de água foi realizado os valores encontrados para estas amostras foram entre 10 e 12%, estas amostras podem ter sofrido oscilações durante todo o seu período de armazenamento, o que pode ter intensificado a degradação de seus componentes e metabólitos.

Na Figura 3.3. estão os valores obtidos, em porcentagem, da primeira contagem da germinação. Para POPINIGIS (1977), no teste de germinação sementes deterioradas podem conseguir originar plântulas, mesmo não vigorosas, mas que contribuem para o resultado final. Com base nisto observa-se uma quantidade bem menor de amostras (8) com vigor acima de 80%, o que indica que as plântulas oriundas da maioria das amostras terão um menor vigor, embora sejam plântulas normais.

Das amostras do Rio Grande do Sul, 7 apresentaram resultado superior a 80% na primeira contagem de germinação, o que ocorreu com apenas uma das amostras de Santa Catarina. Todas as amostras de Goiás apresentaram valores inferiores a 50% e a amostra de Roraima apresentou uma taxa de 68%. Quando

estratificadas, as amostras seguem o mesmo padrão do conjunto analisado, desta maneira, detectou-se que, independentemente da procedência das amostras, o vigor da maioria, quando avaliado pelo teste de primeira contagem de germinação, encontrava-se baixo.

MENEZES e SILVEIRA (1995) trabalhando com sementes de arroz detectaram que uma maior quantidade de plântulas normais na primeira contagem de germinação não determina uma maior germinação final, pois a manifestação do vigor individual das sementes se dá de uma forma variável nos lotes com qualidade baixa ou intermediária, desta maneira, o período de duração do teste de germinação favorece a expressão máxima do potencial, mesmo para sementes que apresentem menor vigor.

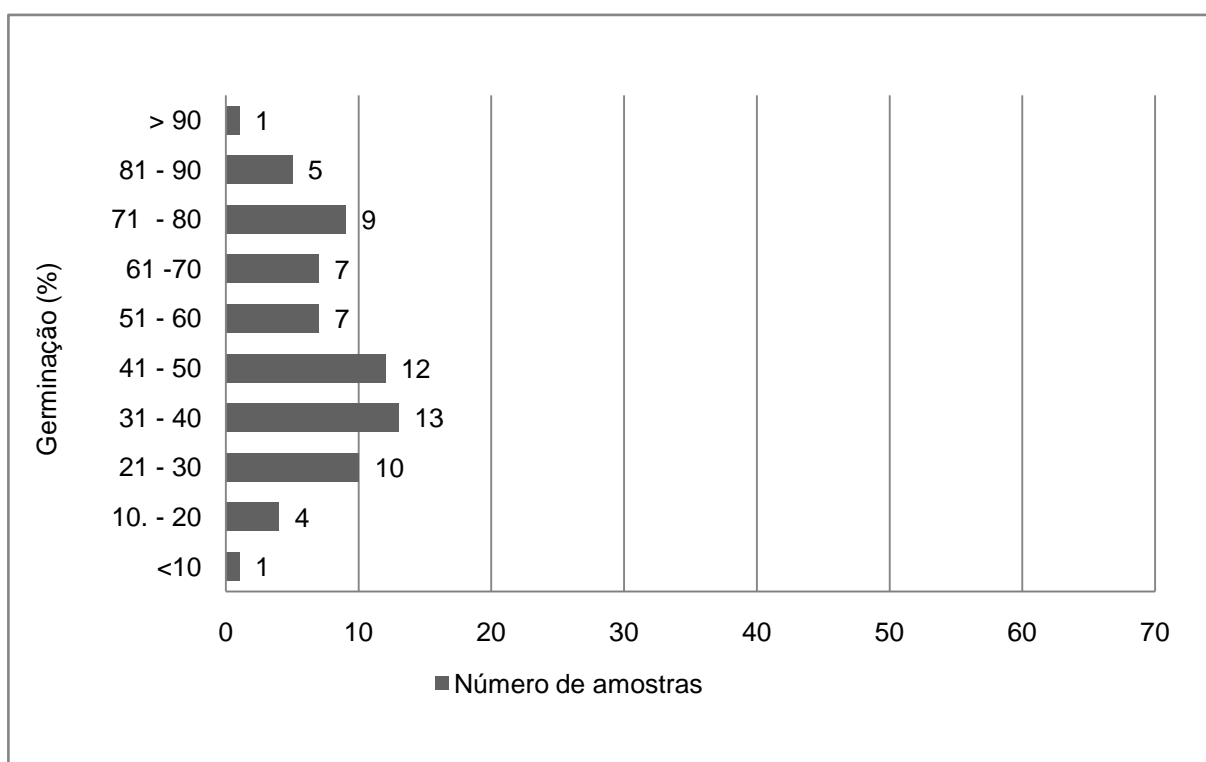


Figura 3.3. - Porcentagem de plântulas normais de 70 amostras de sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros submetidas ao teste de primeira contagem de germinação. Santa Maria, RS, 2010.

Na Figura 3.4. estão os dados médios obtidos para germinação das 70 amostras de sementes de arroz submetidas ao teste de frio. A maioria das amostras (62) possui resultado inferior a 80%. Quando separadas por seus Estados de

origem, as amostras, assim como no teste de primeira contagem da germinação, seguem a característica das amostras analisadas no conjunto, onde para o Rio Grande do Sul, seis amostras apresentam valores de germinação igual ou superior a 80%, o que também foi detectado em duas amostras de Santa Catarina. As amostras de Goiás apresentaram valores inferiores a 30% e a amostra de Roraima 50%. O teste de frio, assim como o teste de primeira contagem de germinação, é um teste utilizado para avaliar o vigor das sementes. Ambos os testes tiveram a capacidade de identificar o nível de vigor das sementes, já que seus resultados apresentaram-se de maneira similar embora as amostras que obtiveram maior vigor em um teste não sejam as mesmas que apresentaram estes resultados no outro.

De forma geral, quando os resultados do teste de frio se aproximam dos obtidos no teste de germinação, há grande possibilidade desse lote apresentar capacidade para germinar sob ampla variação de condições de conteúdo de água e temperatura do solo (CICERO e VIEIRA, 1994). Foi também demonstrado por THRONEBERRY e SMITH (1955), que os danos ocasionados às sementes durante o processo de secagem eram mais facilmente evidenciados pelo teste de frio. O teste de frio tem sido utilizado, principalmente para sementes de milho; porém, seu uso para outras espécies como soja, feijão, algodão e ervilha tem aumentado significativamente, principalmente nos Estados Unidos e Europa (AOSA, 1983). Além dessas espécies citadas, o teste pode ser utilizado para outras, embora em alguns casos possa ser necessária a adaptação da metodologia para atender as características de cada espécie (CICERO e VIEIRA, 1994).

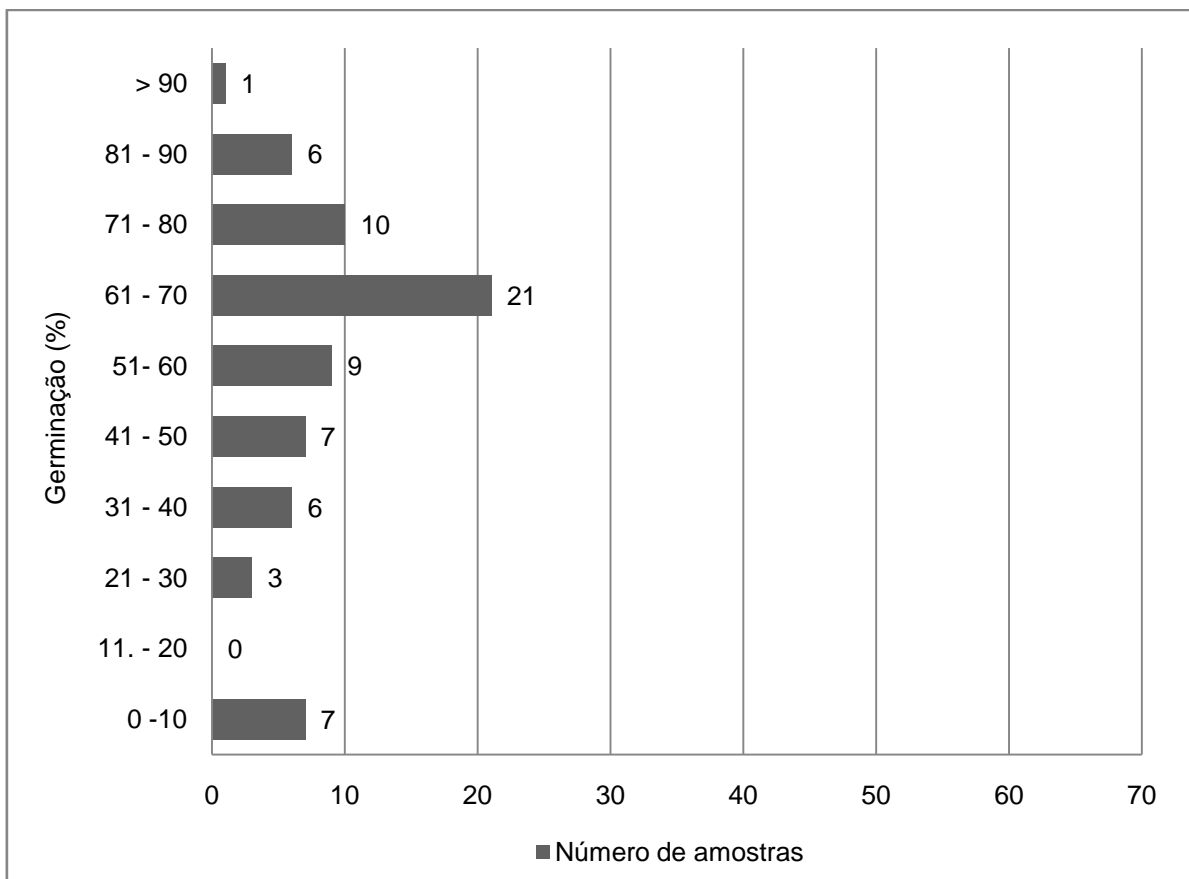


Figura 3.4. - Porcentagem de plântulas normais de 70 amostras de sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros submetidas ao teste de frio. Santa Maria, RS, 2010.

Observa-se na Tabela 3.1. a estratificação das amostras conforme seu vigor, avaliado pelo teste de primeira contagem e de frio, realizados aos 5 dias. Foi criada uma escala, onde: vigor muito alto, corresponde as amostras que apresentam germinação acima de 90% nos testes (>90%); vigor alto, corresponde as amostras com germinação acima de 80% até 90% (81-90%); vigor médio, seriam amostras que apresentam germinação entre 71 e 80% (71-80%); vigor baixo, para amostras que apresentam germinação entre 61 e 70% (61-70%) e vigor muito baixo, para amostras que possuem germinação abaixo de 60% (<60%).

Pelos resultados expostos verifica-se que a maioria das amostras apresentaram níveis de vigor entre médio e muito baixo; apesar destes resultados, no gráfico de germinação (Figura 3.2.) estes resultados não apresentaram concordância, o que indica que mesmo as sementes possuindo um vigor não muito elevado tem a capacidade de originar plântulas normais.

Tabela 3.1. - Vigor (%) de sementes de 70 amostras sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros avaliadas pelo teste de primeira contagem de germinação e pelo teste de frio, realizados aos 5 dias. Santa Maria, RS, 2010.

Vigor (%)	Primeira contagem		Teste de frio	
	Número de amostras	% de amostras	Número de amostras	% de amostras
Muito alto	1	1,4	1	1,4
Alto	5	7,2	6	8,6
Médio	9	12,8	10	14,3
Baixo	5	7,2	21	30
Muito baixo	50	71,4	32	45,7
Total de amostras	70	100	70	100

A qualidade sanitária das sementes também terá influência sobre o vigor e a emergência das plântulas. Desta forma o uso de testes de sanidade se faz necessário para que se possa verificar a qualidade das sementes. Durante a análise sanitária realizada através do *Blotter Test* foram identificados os seguintes fungos: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Bipolaris* spp., *Botrytis* spp., *Cladosporium* spp., *Chaetomium* spp., *Phoma* spp., *Trichoderma* spp., *Epicoccum* spp., *Trichotecium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp., *Helminthosporium* spp., *Tilletia* spp., *Curvularia* spp. e *Paecilomyces* spp..

Na Figura 3.5. estão representados os fungos e o número de amostras associadas com cada um destes. Os fungos *Botrytis* spp., *Cladosporium* spp., *Chaetomium* spp., *Trichoderma* spp., *Epicoccum* spp., *Helminthosporium* spp., *Tilletia* spp., *Curvularia* spp. e *Paecilomyces* spp., apresentaram porcentagem de incidência inferiores a 10% e estiveram presentes em menos de 15% das amostras (10), sendo representados como outros na Figura 3.5..

Quarenta e duas das 70 amostras apresentaram incidência de todos fungos inferior a 10%. A amostra do Estado de Roraima era tratada com fungicida e devido a isto não apresentou incidência de nenhum fungo. Quando separadas por Estados, as amostras seguem o mesmo padrão do conjunto de amostras, onde a maioria apresenta a incidência de fungos inferior a 10%, este padrão somente não é seguido para as amostras do estado de Santa Catarina, quando houve a incidência de *Rhizoctonia* spp., em quase metade das amostras (16). Nesse caso a incidência foi superior a 10%.

Os fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* spp., são responsáveis por causarem podridões em sementes. Segundo BEDENDO (1995) estes fungos são favorecidos quando o teor de água na semente encontra-se em torno de 25%; levando-se em consideração os valores obtidos na avaliação do teor de água das sementes, todos inferiores a 13%, supõe-se que as estruturas fúngicas já estavam presentes nas sementes antes da realização da colheita e, durante o teste de sanidade, encontraram condições favoráveis à sua multiplicação e desenvolvimento, embora as amostras que apresentaram estes fungos tivessem os maiores valores no teste de teor de água.

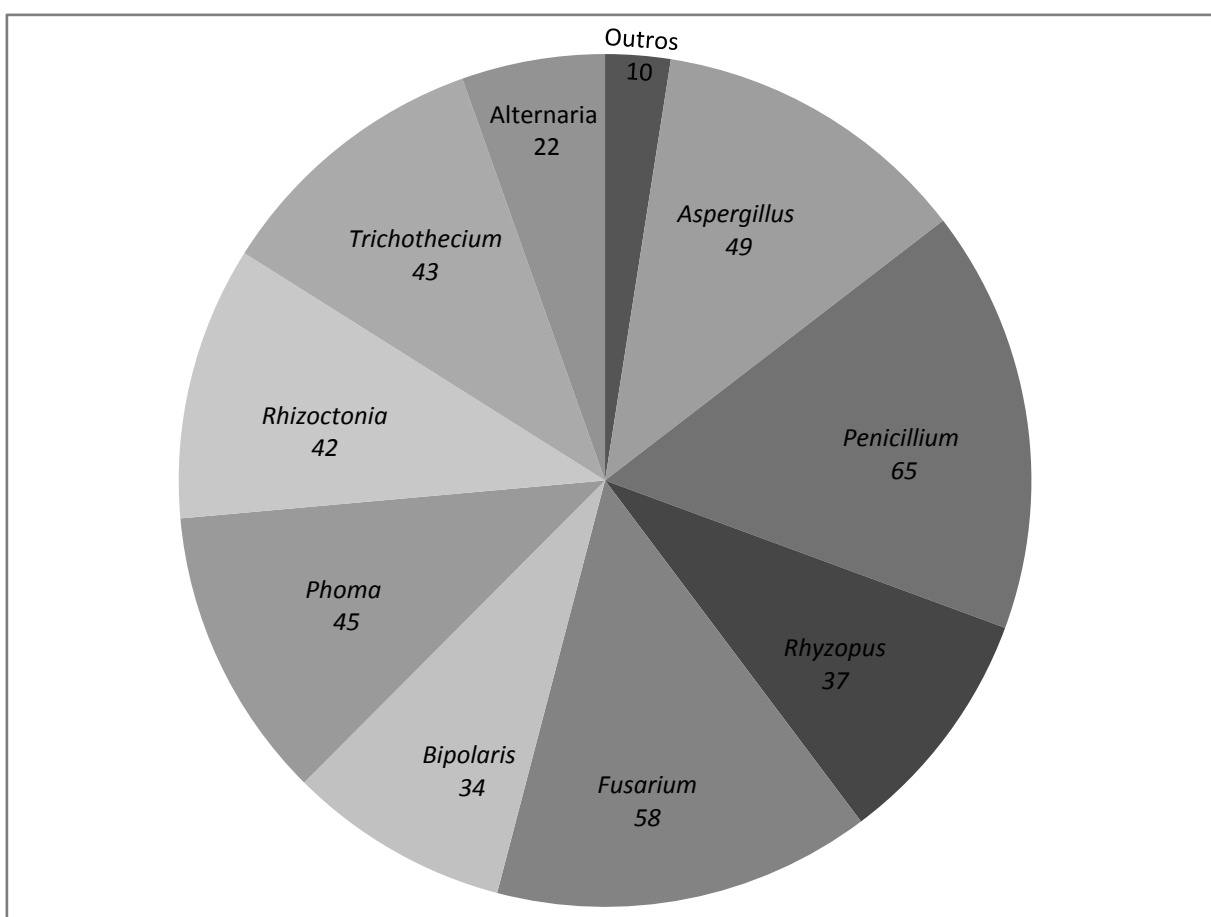


Figura 3.5. - Número de amostras, de um total de 70 amostras de sementes de arroz procedentes de diferentes Estados brasileiros, infectadas por fungos detectados pelo *Blotter Test*. Santa Maria, RS, 2010.

Os fungos *Alternaria* spp., *Phoma* spp., *Bipolaris* spp. e *Fusarium* spp. são podem causar manchas das glumas ou mancha dos grãos. Segundo FUNK e KEMPF (2008) essa doença ocorre nas lavouras gaúchas que são semeadas mais

tardamente, embora surja com menor frequência em lavouras semeadas nas demais épocas; além de causar esterilidade de espiguetas, há depreciação visual do produto colhido, pois ocorre o escurecimento dos grãos antes do beneficiamento. Caso esta doença ocorra em associação com temperaturas baixas, pode haver uma porcentagem maior de esterilidade e de grãos manchados após o beneficiamento. *Alternaria padwickii*, embora seja considerado um patógeno fraco e que não causa grandes danos com relação à sanidade e germinação das sementes, tem sido encontrado com bastante frequência na região do Estado de Minas Gerais associado a outros fungos como *Helminthosporium* spp., *Helminthosporium oryzae*, *Alternaria tenuis* e *Curvularia lunata* (TANAKA, 1986). Esta espécie de fungo do gênero *Alternaria* pode causar mancha nas folhas conhecidas como mancha circular ou mancha de *Alternaria*. Conforme FUNK e KEMPF (2008) esta doença se estabelece em temperaturas entre 26 e 28°C e é disseminada principalmente via sementes infestadas, solo e restos culturais.

Bipolaris spp. também é conhecido como causador da mancha marrom ou mancha parda em arroz. Nesta doença, o fungo pode causar lesões nas folhas e nos grãos e seus sintomas vão depender da suscetibilidade das cultivares; na emergência ocorrem os maiores danos devido à morte de plantas pequenas, o que irá contribuir para a redução da densidade de plantas na lavoura (FUNK e KEMPF, 2008). Segundo estes autores, a doença se inicia pela germinação dos esporos que estão contidos nas sementes, o que pode reduzir a germinação ou ocasionar a morte de plântulas; posteriormente ocorre o ataque das folhas, do colmo e dos grãos, o que irá resultar numa nova infestação das sementes.

Rhizoctonia spp. pode causar mancha e queima das bainhas, em ambas as doenças os sintomas ocorrem na bainha das folhas e no colmo, em ataques severos podem ocorrer queimas parciais ou totais das folhas o que pode culminar no acamamento de plantas; a disseminação deste patógeno se dá através do solo e restos culturais o que pode ocasionar um ataque já na emergência das plantas (FUNK e KEMPF, 2008).

Conforme LOURENÇO (2010), *Trichothecium* spp. produz micotoxinas, que são substâncias produzidas e liberadas pelos fungos que podem causar danos a saúde humana e de animais ao serem consumidas juntamente com o substrato onde foram liberadas, neste caso, sementes de arroz.

A maioria das amostras teve a incidência de fungos inferior a 10%, porém a maioria destes fungos causa danos a cultura do arroz e alguns, como *Bipolaris* spp. usam a semente como principal meio de sobrevivência e disseminação.

Para CERBARO et al. (2007) que, trabalhando com cultivares de arroz de duas procedências do Estado do Rio Grande do Sul, também encontraram *Alternaria* spp., *Phoma* spp., *Bipolaris* spp., e a causa da variação da incidência destes patógenos poderia estar associada a vários fatores como: clima, aspectos de nutrição, época de semeadura, tratos culturais, manejo das lavouras, ataque de insetos, entre outras causas que predispõe as plantas ao ataque de patógenos.

Com relação à patogenicidade das bactérias inoculadas em plântulas de arroz, ao final de 20 dias de avaliação, quando as plântulas estavam com 35 dias não houve nenhum sintoma de doença. As plântulas inoculadas com bactérias encontravam-se com as mesmas características das plântulas da testemunha.

Este resultado indica que nenhuma das bactérias isoladas foi patogênica às plântulas as quais foram inoculadas, e poderiam ter sofrido algum tipo de mutação ou até mesmo a perda de sua patogenicidade durante o armazenamento.

A repicagem dos organismos em intervalos de tempo é o método mais simples de manutenção de culturas bacterianas, que permite, embora mais lentamente, o crescimento da cultura bacteriana. Devido a isto se faz o armazenamento da cultura em temperatura de refrigerador (4°C), o que reduz a taxa de multiplicação bacteriana.

Algumas bactérias, após sucessivas repicagens, podem permanecer viáveis mas perder sua patogenicidade ou virulência (ROMEIRO, 2001). KIRALY et al. (1970) relataram que culturas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* tendem a perder rapidamente a patogenicidade em meio de cultura devido à acidificação que promovem. Embora a manutenção de bactérias em tubo apresente problemas ainda este método ainda é usado, mesmo que em caráter eventual ou temporário, em todos os laboratórios de bacteriologia (ROMEIRO, 2001).

3.4. Conclusões

As amostras analisadas, provenientes de diferentes Estados brasileiros, possuem teor de água dentro dos parâmetros considerados satisfatórios para a

manutenção da qualidade das sementes e estas quando estratificadas por Estado de procedência seguiram o mesmo padrão do conjunto de amostras.

A maioria das amostras apresentou germinação acima de 80%.

As amostras oriundas do Estado de Goiás apresentaram germinação e vigor mais baixos que as dos demais Estados.

Os testes de vigor (primeira contagem de germinação e frio) apresentam poucas amostras com resultados acima de 80%.

Embora menos vigorosas, as sementes tem condições de gerar plântulas normais.

De maneira geral, as amostras apresentam baixo vigor, boa capacidade de germinação, baixa incidência de fungos e, quando são analisadas conforme o seu Estado de origem, seguem o padrão do conjunto analisado.

Não foi detectada a patogenicidade dos isolados bacterianos oriundos das sementes de arroz.

3.5. Referências

AOSA - ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigour testing handbook**. East Lasing, 93p. 1983.

BALARDIN, R. S.; BORIN, R. C. **Doenças na cultura do arroz irrigado**. Santa Maria: UFSM, 48 p, 2001.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. St Paul, Minnesota: APS Press, 218p. 1998.

BEDENDO, I.P., Podridão de órgãos de reserva. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**, v1, 3ª Ed. Agronômica Ceres, 919 p. 1995.

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, 399 p., 2009.

CARVALHO, N.M. **A secagem de sementes**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 165p. 1994.

CERBARO et al. Ocorrência de fungos manchadores de grãos em diferentes cultivares, provenientes das regiões de Camaquã e Pelotas - rs, safra 2006/2007. XVI Congresso de Iniciação Científica-CIC, **Anais**, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas-RS, 27, 28 e 29 de novembro de 2007.

CICERO, S.M.; VIEIRA, R.D. Teste de frio. In: VIEIRA, R.D. & CARVALHO, N.M. (ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, p.151-164. 1994.

FUNK, G.D.; KEMPF, D. Doenças do arroz irrigado no Rio Grande do Sul, **Boletim Técnico nº5**, Instituto Rio-Grandense do Arroz- IRGA, Divisão de Pesquisa, 38p., 2008.

KIRALY, Z. et al. **Methods in Plant Pathology**. Akad. Kiado. Budapest. 509 p. 1970.

LOURENÇO, A. **Microbiologia**. 2010 Disponível em: <http://www.microbiologia.vet.br>
Acesso em 09/11/2010

MARCHEZAN,E.; MENEZES,N.L.; SIQUEIRA,C. A. Controle da qualidade de sementes de arroz irrigado utilizadas em Santa Maria/RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.3, p.375-379, 2001

MENEZES, N.L.; SILVEIRA, T.L.D. da. Métodos para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de arroz. **Scientia Agricola**, Piracicaba-SP, n.52, v.2, p.350-359, maio/agosto-1995.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 289 p.1977.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Departamento de Produção Vegetal. CESM/RS. **Normas e padrões de produção de sementes para o Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre : SAA/ DPV, 156p.1998.

ROMEIRO, R.S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. 2001. Disponível em: <http://www.ufv.br/dfp/bac/uni11.pdf> .Acesso em: 02/11/2010.

SUSLOW, T.V. et al., Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. **Phytopathology**, nº 71, p 917-918, 1982.

TANAKA, M. A. S. Fungos associados a sementes de arroz com descoloração de grãos em Minas Gerais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 8, n. 2, p. 85-90, 1986

THRONEBERRY, G.O.; SMITH, F.G. Relation of respiratory and enzymatic activity to corn seed viability. **Plant Physiology**, Bethesda, v.30, n.4, p.337-343, 1955.

CAPÍTULO II

AValiação DE Crescimento E Desenvolvimento DE BactÉrias Provenientes DE Sementes DE Arroz

RESUMO

Inúmeras bactérias podem utilizar a semente como meio de sobrevivência ou de dispersão, em vista disto, a detecção de bactérias em sementes é um passo importante para se controlar perdas que estas podem ocasionar. Existem várias técnicas para detecção e quantificação de bactérias fitopatogênicas em sementes, algumas são caras e exigem equipamentos e pessoal especializados, outras são dispendiosas, mas exigem um maior espaço físico e apresentam demora na obtenção de resultados. Tem se buscado a criação de técnicas que sejam alternativas, onde se tenha rapidez na obtenção dos resultados sem que se tenham custos elevados para a sua realização. Para a detecção de algumas bactérias é necessário que sejam criadas novas metodologias, pois estas irão melhorar a sua detecção e também a avaliação do seu crescimento. Com o objetivo de testar duas metodologias de extração associadas a dois meios de cultura de cultura para avaliar a multiplicação e crescimento de bactérias associadas a três amostras de sementes de arroz provenientes do Estado do Rio Grande do Sul é que se realizou este trabalho. Os tratamentos consistiram na combinação do método de extração lavado com os meios de cultura PSA e Wakimoto e também na combinação do método de extração triturado com os meios de cultura PSA e Wakimoto, avaliados nos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação com relação a número e tamanho de colônias bacterianas. O meio de cultura PSA apresenta melhores resultados para a avaliação de tamanho e número de colônia ao longo do tempo, o período de incubação de 48 horas apresenta-se mais favorável para avaliação dos meios de cultura com relação ao número de colônias. O número de bactérias tende a estabilizar e posteriormente a diminuir ao longo do tempo. O método de extração triturado tende a ser mais eficiente, quando são avaliadas mais de uma amostra de sementes. As características das amostras de sementes influenciam nos resultados obtidos, independente do método de extração e do meio de cultura utilizados.

Palavras-chave: Bactérias, métodos de extração, meios de cultura.

EVALUATION OF GROWTH AND DEVELOPMENT OF BACTERIA FROM RICE SEEDS

ABSTRACT

Countless bacteria can use the seed as a means of survival or dispersal, in view of this, the detection of bacteria in seeds is an important step in controlling these losses that may result. There are several techniques for detection and quantification of pathogenic bacteria in seeds, some are expensive and require specialized equipment and personnel, others are costly, but require a larger physical space and have a delay in obtaining results. Alternative techniques, which have speed in getting the results unless you have high costs for their realization, have been sought. For the detection of some bacteria new methodologies need to be created, as they will improve their detection and the evaluation of the growth of bacteria. This work was carried out aiming at testing two extraction methods associated with two media culture to assess the growth and multiplication of isolated bacteria from three rice seeds samples from the Rio Grande do Sul State. The treatments consisted of the washed extraction method with PSA and Wakimoto culture media and also the combined crushed method of extraction with PSA and Wakimoto culture media, rated for 24, 48 and 72 hours of incubation with respect the number and size of bacterial colonies. The PSA culture medium is best used for the evaluation of colony size and number over time, the incubation period of 48 hours has become more favorable assessment of culture media on the number of colonies. The bacteria number tends to stabilize and then decrease over time. The crushed extraction method tends to be more efficient when they are evaluated over a seed sample. The characteristics of the seed samples influence the results, regardless of extraction method and the culture medium used.

Key words: Bacteria, extraction methods, culture media.

4.1. Introdução

Inúmeras bactérias podem utilizar a semente como meio de sobrevivência ou de dispersão, em vista disto, a detecção de bactérias em sementes é um passo importante para se controlar perdas que estas podem ocasionar.

Existem várias técnicas para detecção e quantificação de bactérias fitopatogênicas em sementes, algumas são caras e exigem equipamentos e pessoal especializados para realizar esta função. Existem técnicas menos dispendiosas, porém estas exigem um maior espaço físico e, geralmente, a obtenção de resultados é mais demorada, como por exemplo, o plantio direto, o cultivo de sementes em meio semi-sólido, inoculação em plantas suscetíveis, etc. A partir destas afirmativas tem se buscado cada vez mais o desenvolvimento de técnicas que sejam alternativas, onde se tenha rapidez na obtenção dos resultados sem que se tenham custos muito elevados para a sua realização.

O uso de meios semi-seletivos está cada vez mais amplo, onde pode se utilizar o semeio direto de sementes ou técnicas de extração. Os meios semi-seletivos possibilitam a determinação da porcentagem de sementes infectadas, a quantificação de populações em sementes, além de solos e restos culturais. São de fácil execução e apresentam rápida obtenção dos resultados.

A escolha da metodologia a ser utilizada se dá em função de vários fatores, como o sistema biológico e o objeto do estudo. Para a detecção de algumas bactérias é necessário que sejam criadas novas metodologias, pois estas irão melhorar a sua detecção e também a avaliação do seu crescimento.

Quando se realizam pesquisas com bactérias fitopatogênicas geralmente, se determina o número de células viáveis em suspensão. Para isso podem ser utilizados métodos de contagem ou turbidimetria, onde os resultados são expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). A UFC pode ser considerada como um sinônimo de célula viável, pois considera-se que cada colônia é originada de uma única célula viável.

A estimativa das células viáveis normalmente é feita com o uso de diluições seriais da cultura bacteriana em solução salina, e posterior plaqueamento de uma alíquota de cada diluição em placas de Petri com meio sólido para bactérias. Isto se baseia na hipótese de que células individuais ocuparão regiões separadas na

superfície do meio, para que cada uma possa dar origem a uma colônia bacteriana isolada. Desta maneira, pode-se visualizar o crescimento e então realizar a contagem e avaliação das colônias.

A estimativa das UFCs se faz de grande importância em bacteriologia pois, através dela pode-se ajustar a concentração de inóculo antes da inoculação, quantificar patógenos bacterianos em amostras de sementes, estudar a sobrevivência, entre outros fatores de suma importância.

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi testar duas metodologias de extração associadas a dois meios de cultura para avaliar a multiplicação e crescimento de bactérias associadas a três amostras de sementes de arroz provenientes do Estado do Rio Grande do Sul.

4.2. Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia Eloicy Minusi do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM.

Foram utilizadas sementes de arroz de três amostras provenientes do Rio Grande do Sul. Uma das amostras é da cultivar IRGA 424, outra amostra é da cultivar IRGA 409, ambas foram escolhidas por possuírem características distintas. A IRGA 424 apresenta vigor inicial baixo, é tolerante a toxidez por ferro, resistente à brusone e moderadamente resistente a mancha dos grãos; já a IRGA 409 possui alto vigor inicial, é suscetível à toxidez por ferro, é medianamente suscetível à brusone e mancha dos grãos. A terceira amostra é da cultivar EPAGRI 114, que embora seja proveniente da produção do Rio Grande do Sul, foi desenvolvida em Santa Catarina, segundo maior Estado produtor, o que justifica a sua escolha.

As sementes foram submetidas a dois métodos de extração, lavado e triturado e, posteriormente, foram plaqueadas em dois meios de cultura de cultivo Wakimoto (WK) e PSA (Anexo 2 e 3), para bactérias, conforme descrito abaixo. A amostra IRGA 424 foi avaliada, de maneira isolada, ao longo do tempo, e posteriormente, comparada com as demais amostras.

4.2.1. Método de extração lavado:

Para realização do método de extração lavado, foram pesados 50 gramas de sementes e posteriormente, estas foram colocadas em mistura com 100mL de solução salina (PBS tampão – Anexo 4). Após, a esta mistura foi adicionada uma gota de Tween 20[®], para que houvesse quebra da tensão superficial e as sementes pudessem ter total contato com a solução. Após, agitou-se por 30 minutos em agitador de mesa em temperatura ambiente. Posteriormente, realizaram-se diluições seriadas e plaqueamento nos meios de cultura.

4.2.2. Método de extração triturado:

Para realização do método de extração triturado, foram pesados 50 gramas de sementes e, posteriormente, estas foram colocadas em mistura com 100mL de solução salina (PBS tampão – Anexo 4). Em seguida, esta mistura foi triturada em liquidificador por aproximadamente 20 segundos e foi adicionada uma gota de Tween 20[®], para que houvesse quebra da tensão superficial e houvesse total contato do material triturado com a solução. Após, agitou-se por 30 minutos em agitador de mesa em temperatura ambiente. Posteriormente, realizaram-se diluições seriadas e plaqueamento nos meios de cultura.

4.2.3. Diluições seriadas:

Inicialmente, foi realizado um teste para avaliar qual nível de diluição seria o mais apropriado para que fossem realizadas as contagens das colônias. Para tal, realizaram-se diluições seriadas a partir de 10^0 até 10^{-10} e, posteriormente, as suspensões foram plaqueadas nos dois meios de cultura que foram utilizados nos testes. As diluições consistiram no uso de 1mL da mistura obtido de cada método de extração, diluído em 9 mL de solução salina, e assim foram se realizando diluições sucessivas até 10^{-10} . Após este procedimento, foram plaqueados 10 μ L de cada diluição em três placas contendo cada tipo de meio (WK e PSA). Foi realizada avaliação das diluições às 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento, para que se pudesse fazer a visualização das colônias e então, obter a diluição mais ajustada para a realização das contagens e medições.

A diluição 10^{-4} mostrou-se mais favorável à realização de contagens e medições de colônias bacterianas mesmo 72 horas após o plaqueamento. Soluções menos diluídas não possibilitaram a contagem e a medição das colônias devido ao

grande número e ao coalescimento das colônias. Soluções mais diluídas (acima de 10^{-5}) não apresentaram um número satisfatório de colônias, sendo este muito pequeno para que se realizassem as avaliações necessárias.

4.2.4. Plaqueamento da solução

Após a realização de cada método de extração, foi retirada uma alíquota de 10 μ L de cada solução e, estas plaqueadas em placas de Petri contendo os meios de cultura de cultura Wakimoto e PSA. A composição dos tratamentos avaliados foi constituída pelas seguintes combinações: método de extração lavado + meio de cultura WK; método de extração lavado + meio de cultura PSA; método de extração triturado + meio de cultura WK e método de extração triturado + meio de cultura PSA, cada uma das combinações contendo quatro repetições.

Posteriormente, as placas foram levadas para incubação em câmaras do tipo BOD com temperatura controlada de 28°C (\pm 2°C) de temperatura e regime de luz de 12 horas pelo período de 72 horas, sendo realizadas avaliações a cada 24 horas.

4.2.5. Avaliação:

As avaliações consistiram em contagens e medições de colônias em cada placa e foram realizadas em três períodos de tempo: 24, 48 e 72 horas. As contagens foram feitas com auxílio de contador de colônias CP600 Plus-Phoenix[®] e as medições com auxílio de paquímetro digital. Para as medições, foram escolhidas quatro colônias, já na primeira contagem, e estas foram fixadas para que se realizassem as medições subsequentes.

4.2.5.1. Procedimento estatístico para a amostra individual (IRGA 424)

Para a análise estatística desta amostra foi utilizado um fatorial (2 x 2 x 3), com dois métodos de extração (Lavado e Triturado), dois meios de cultura (PSA e WK) e três períodos de incubação (24, 48 e 72 horas). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Os resultados dos períodos de incubação foram submetidos à regressão polinomial, onde foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico, sendo selecionado para explicar os resultados, o modelo significativo de maior ordem.

Os demais fatores foram submetidos ao Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores obtidos para número de UFCs sofreram transformação log $(X+100)$ e, posteriormente, juntamente com os valores de tamanho de UFCs foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância pelo Sistema de Análises Estatísticas – SANEST (ZONTA et al., 1986).

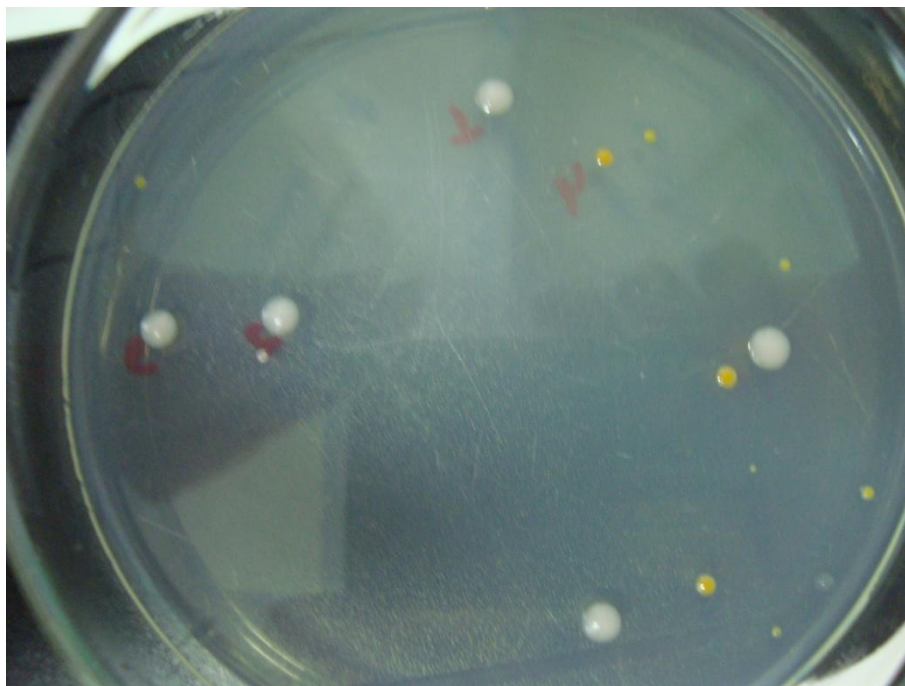
4.2.5.2. Procedimento estatístico para a comparação de diferentes amostras

Para comparação de diferentes amostras de sementes analisaram-se as amostras com relação aos métodos de extração, meios de cultura e a combinação destes fatores, considerando a média dos três períodos de tempo.

Para a análise estatística das amostras foi utilizado um fatorial $(2 \times 2 \times 3)$, com dois métodos de extração (Lavado e Triturado), dois meios de cultura (PSA e WK) e três amostras. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições. Os valores obtidos para número de UFCs sofreram transformação log $(X+100)$, e posteriormente, juntamente com os valores de tamanho de UFCs foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância pelo Sistema de Análises Estatísticas – SANEST (ZONTA et al., 1986).

4.3. Resultados e discussão

As colônias que cresceram nos meios de cultura possuíam as seguintes características: mucóides, translúcidas, brilhantes, convexas, elevadas, de coloração amarelada e esbranquiçada, variando entre suas tonalidades; características estas que podem ser observadas na Figura 4.1.



Fonte: Cleidionara Pacheco, 2010.

Figura 4.1. - Aspecto das colônias bacterianas crescidas no meio de cultura PSA. Santa Maria, RS, 2010.

4.3.1. Comparação entre métodos de extração, meios de cultura e períodos de incubação para colônias bacterianas oriundas de sementes de arroz

Após a realização da análise de variância (Apêndice 1) para a variável número de UFCs, observou-se que os métodos de extração utilizados não apresentavam diferença estatística significativa entre si. As interações entre meios de cultura e métodos de extração e, entre métodos de extração, meios de cultura e períodos de incubação também não foram significativas. Na análise de variância para a variável tamanho de UFCs (Apêndice 2), observou-se que os métodos de extração, os meios de cultura e os tempos (períodos) utilizados apresentavam diferença estatística significativa entre si. As interações entre métodos de extração e meios de cultura e entre métodos de extração, meios de cultura e os períodos não foram significativas. Com base nesta análise foram apresentados os dados que tiveram diferença significativa entre si, além da análise de regressão para o tempo (período) de incubação, que mostrou diferença significativa.

Na Tabela 4.1. pode-se observar as médias obtidas para número de UFCs da amostra as 24, 48 e 72 horas após plaqueamento.

Quando foram avaliados os métodos de extração, não observou-se diferença significativa entre eles, independente do período de incubação. Ao avaliar-se o

número de UFCs, com relação aos meios de cultura utilizados, há diferença, porém em 48 horas, o meio de cultura PSA apresenta a maior diferença numérica, com o meio de cultura Wakimoto e, às 72 horas, os valores diminuem, embora a diferença entre ambos continue a ser significativa. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de haver um grande crescimento das colônias e elas terem coalescido, o que passou a impossibilitar a contagem de todas as colônias. Na Figura 4.2., pode ser observado o coalescimento de colônias. Desta maneira, pode-se inferir que quando se tem por objetivo avaliar o meio de cultura de cultura utilizado, 48 horas seria o tempo mais indicado, por apresentar um número considerável de colônias e estas não terem um tamanho muito grande que permita o a sua aglutinação.

Quando realizou-se a avaliação do desempenho dos meios de cultura relacionados com os métodos de extração (Tabela 4.1), verifica-se que utilizando método de extração triturado, em relação ao número de UFCs, o meio de cultura PSA apresentou melhores resultado às 48 horas. No método de extração lavado, não houve diferenças entre os meios de cultura, independente do tempo de incubação.

Tabela 4.1 Número ($\times 10^4$ /mL) de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs), observadas às 24, 48 e 72 horas em função do método de extração, do meio de cultura e da interação entre o método de extração e o meio de cultura utilizado para uma amostra de sementes de arroz. Santa Maria, RS, 2010.

Variável	24 Horas	48 Horas	72 Horas
Método	Número de UFCs		
Triturado	8,79 a*	41,77 a	41,14 a
Lavado	12,28 a	34,79 a	34,54 a
Meio	Número de UFCs		
PSA	12,54 a	49,06 a	44,24 a
WK	8,54 b	28,20 b	31,64 b
Triturado	Número de UFCs		
PSA	10,38 a	59,58 a	54,60 a
WK	7,22 b	25,95 b	28,84 b
Lavado	Número de UFCs		
PSA	14,74 a	39,23 a	34,57 a
WK	9,87 a	30,50 a	34,50 a
CV%	1,55		

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Bactérias associadas ao tegumento das sementes são facilmente detectadas no meio de cultura (LEBEN, 1981), enquanto que sementes que veiculam fitobactérias internamente carecem de um contato mais íntimo com o meio de cultura para que o patógeno alcance o exterior das sementes e entre em contato com o mesmo. Quanto mais interna for esta localização, maior a dificuldade e tempo gasto para esta difusão (NEERGAARD, 1979). Pelo fato de o método de extração triturado realizar a quebra da semente e deixar expostas as bactérias que estão internamente relacionadas às sementes, este tende a apresentar um maior número de colônias.

Aberturas naturais em sementes, como o hilo, juntamente com rachaduras e outros ferimentos de diversas origens, são importantes vias para o estabelecimento interno de alguns patógenos, sobretudo bactérias. Outras maneiras possíveis de estabelecimento de patógenos no interior das sementes ocorrem por meio do sistema vascular de plantas atacadas pelos órgãos fertilizadores, como o grão de pólen, contaminados ou infectados (BAKER e SMITH, 1966; NEERGAARD, 1979).



Fonte: Cleidionara Pacheco, 2010.

Figura 4.2. - Coalescimento e “escorrimento” de colônias bacterianas. Santa Maria, RS, 2010.

Conforme ESAU (1974), os tecidos vasculares formam um sistema contínuo que percorre a planta inteira, incluindo todas as ramificações do caule e da raiz; o

sistema vascular de inúmeras sementes é bem desenvolvido e o feixe vascular estende-se até a região da chalaza, onde se ramifica.

BAKER e SMITH (1966) relataram a possibilidade da presença de feixes vasculares entre as camadas da semente, os quais se estendem por toda ela, unindo as suas camadas. Os autores afirmaram também que, frequentemente, encontram-se tecidos vasculares anexos ao hilo da semente.

Com base no exposto, reforça-se a idéia de que o método de extração triturado apresenta uma maior capacidade de detecção em virtude de expor não só as bactérias externas, mas também as internas às sementes.

Na Tabela 4.2. pode-se observar as médias obtidas para tamanho de UFCs da amostra de sementes as 24, 48 e 72 horas após plaqueamento.

Tabela 4.2 Tamanho de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) observadas às 24, 48 e 72 horas em função do método de extração, do meio de cultura e da interação entre o método de extração e o meio de cultura utilizado. Santa Maria, RS, 2010.

Variável	24 Horas	48 Horas	72 Horas
Método		Tamanho* de UFC	
Triturado	2,01 a**	4,31 a	5,75 a
Lavado	1,10 b	3,46 b	4,10 b
Meio		Tamanho de UFC	
PSA	2,16 a B	5,18 a A	6,95 a A
WK	0,95 b B	2,58 b A	2,90 b A
CV%		25,81	

* Medidas em milímetros (mm).

** Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Na avaliação do tamanho das colônias (UFCs) o método de extração triturado apresentou-se mais promissor do que o método de extração lavado, independente do período de incubação.

O tamanho das colônias mostrou significância quando foi utilizado o meio de cultura PSA, e a partir de 48 horas podem ser verificados os maiores resultados. As bactérias devem ser cultivadas em um meio de cultura que não favoreça a excessiva formação de material capsular, pois os glumos resultantes da aglomeração de células podem interferir na contagem (ROMEIRO, 1999). O meio de cultura PSA leva sacarose em sua composição, que é um açúcar formado por uma molécula de

frutose e uma de glicose; já o meio Wakimoto leva dextrose, que é um açúcar simples, formado apenas de glicose. A sacarose estimula uma intensa formação de cápsula na célula bacteriana (SILVA, 1996), o que pode resultar na união das colônias, dificultando a contagem.

É recomendável o cultivo da bactéria em um meio de cultura pobre em carboidratos, pois, caso contrário, há abundante produção de cápsula e eventual aderência de células umas às outras, ocasionando erros de contagem. Isso porque, quando um grupo de células é depositado na superfície do meio de cultura, a colônia surgida é contada na pressuposição de ser ela originária de uma única célula viável, o que pode não ser verdade (ROMEIRO, 1999). Espécies de *Xanthomonas* sp. especificamente, têm tendência a uma copiosa produção de cápsula. Uma das formas de se minimizar o problema é a adição de um espalhante (Tween 80[®] a 0,1 %, por exemplo) conforme GERHARDT (1994). ROMEIRO et al (1991) obtiveram bons resultados em contagem de UFCs de *X. campestris* pv. *manihotis* fazendo uso de Tween 80[®].

Não houve interação entre os métodos de extração e os meios de cultura utilizados (Apêndice 1), diferentemente do que acontece quando se avalia número de colônias. Este fato pode ser devido à competição existente entre as bactérias, onde um maior número de bactérias irá competir por espaço e por nutrientes para sua multiplicação.

Na Figura 4.3. pode-se observar a tendência tanto do número (Apêndice 3) como do tamanho (Apêndice 4) de colônias com relação ao tempo de incubação, em que os dados apresentaram tendência linear para o tamanho e quadrática para o número de UFCs.

Nesta figura pode-se verificar que número de UFCs apresenta-se de maneira crescente ao longo do tempo, porém a partir de 48 horas o seu aumento passa a ser menos expressivo, e pode ser um indicativo de que as bactérias estejam iniciando sua fase estacionária, para posterior morte, como é peculiar em seu ciclo de vida.

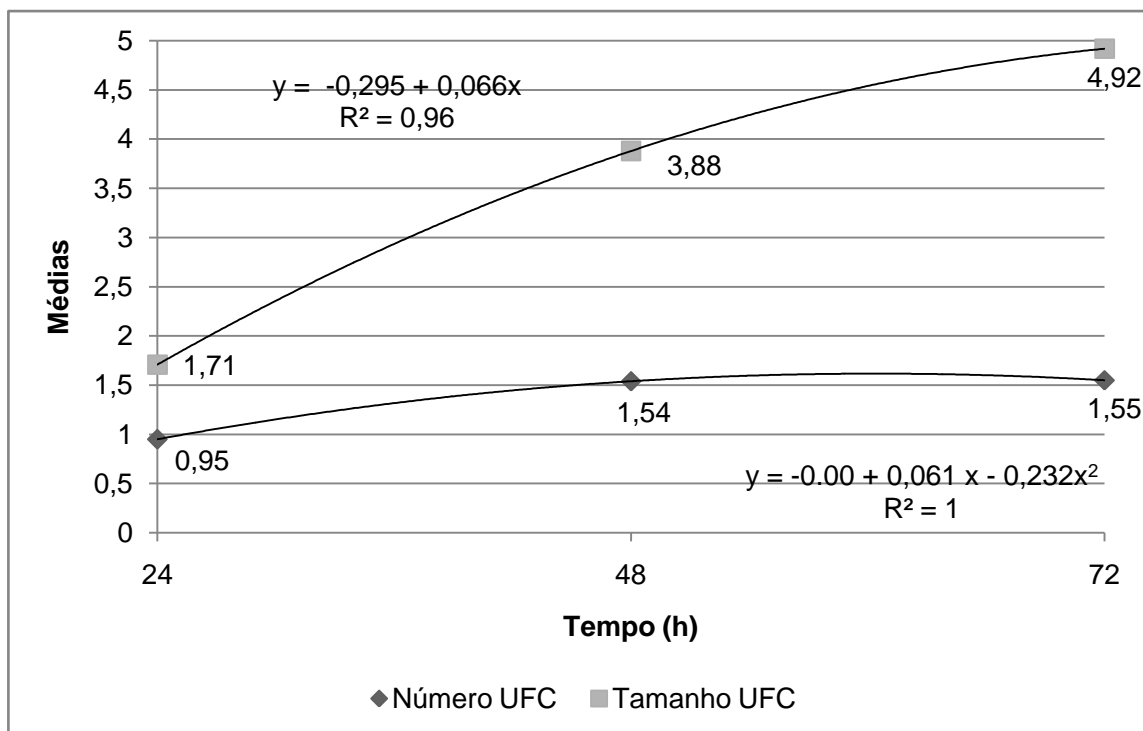


Figura 4.3. – Número (x 10⁻⁴/mL) e tamanho de UFCs em relação ao tempo de incubação. Santa Maria, RS, 2010.

ZACHOWSKI e RUDOLPH (1988) observaram que nem sempre é possível identificar a bactéria em lotes de sementes através do método de diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura.

ROTH (1989) relaciona uma série de características que devem ser consideradas na detecção de bactérias em sementes, entre elas: alta porcentagem de recuperação do patógeno; aplicabilidade a amostras de diferentes regiões geográficas e com diferentes concentrações de inóculo; repetibilidade e rapidez do método; emprego em extrações de sementes infectadas com mais de um patógeno; adaptabilidade como teste de rotina; baixo custo.

4.3.1.2. Comparação entre métodos de extração, meios de cultura e diferentes amostras de sementes de arroz

Ao observar-se a análise de variância que foi realizada para a variável tamanho de colônias (Apêndice 5), levando-se em consideração os métodos de extração, os meios de cultura e as três amostras utilizadas, pode verificar que não houve significância para nenhum dos fatores avaliados (método de extração, meio de cultura e amostra), bem como as interações.

Para a análise da variância da variável número de colônias (Apêndice 6), levando-se em consideração os métodos de extração, os meios de cultura e as amostras utilizadas, foi possível verificar que não houve significância para o meio de cultura utilizado, bem como para a interação entre meio de cultura e amostra utilizada.

Na Tabela 4.3. podem ser observadas as médias obtidas quando se comparou os métodos de extração, meios de cultura e amostras. Estes dados estão mostrados de maneira isolada, e as interações podem ser visualizadas nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6.

Quando se avaliou o número de colônias o melhor método de extração é o triturado e a amostra IRGA 424 foi a que apresentou uma maior quantidade destas, enquanto as amostras IRGA 409 e EPAGRI 114 não diferiram entre si. Como já mencionado anteriormente, o método de extração triturado faz a quebra das sementes, expondo a parte interna e desta maneira exterioriza supostas bactérias que estariam contidas internamente as sementes. É esperado que se tenham diferenças entre as amostras uma vez que estas são de diferentes cultivares, diferentes formas de manejo no campo e também de armazenamento.

Quando avalia-se os métodos de extração (Figura 4.4.) pode-se perceber que não há diferença significativa entre eles nas amostras IRGA 424 e IRGA 409, porém na amostra EPAGRI 114, o método de extração triturado possui um número maior de colônias e é estatisticamente superior ao método de extração lavado.

Tabela 4.3. Número ($\times 10^{-4}$ /mL) e tamanho de colônias observadas em função do método de extração, do meio de cultura e da amostra utilizada. Santa Maria, RS, 2010.

Método	Número de colônias	Tamanho* de colônia
Triturado	25,02 a**	3,72 a
Lavado	17,14 b	4,46 a
Meio	Número de colônias	Tamanho de colônia
PSA	22,13 a	4,10 a
Wakimoto	19,92 a	4,07 a
Amostra	Número de colônias	Tamanho de colônia
IRGA 424	28,61 a	3,46 a
IRGA 409	18,70 b	3,96 a
EPAGRI 114	16,10 b	4,84 a
CV %	1,7	65,9

*Medidas em milímetros (mm).

** Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando se avaliam as combinações entre os meios de cultura e os métodos de extração utilizados (Figuras 4.5 e 4.6) estes também apresentam variações de comportamento em decorrência da amostra avaliada. Quando se leva em consideração o método de extração lavado, para a amostra IRGA 424 não há diferença para a sua associação com os diferentes meios de cultura; já para a amostra IRGA 409, o uso do método de extração lavado em conjunto com o meio de cultura Wakimoto apresenta um maior número de colônias e é, estatisticamente, mais eficiente que quando este método de extração é associado ao meio de cultura PSA; para a amostra EPAGRI 114, repete-se o comportamento da amostra IRGA 424 quando são avaliadas as combinações citadas de métodos de extração e meios de cultura.

Quando se considera o método de extração triturado, para a amostra IRGA 424, a sua associação com o meio de cultura PSA apresenta-se como a combinação onde cresceram um maior número de bactérias, e é, estatisticamente significativa quando comparada com sua associação com o meio de cultura Wakimoto. Para as amostras IRGA 409 e EPAGRI 114 não houve diferença estatística quando o método de extração triturado é associado o meio de cultura PSA ou ao meio de cultura Wakimoto, embora em ambas, o número de colônias seja maior quando este método de extração esta ligado ao meio de cultura PSA.

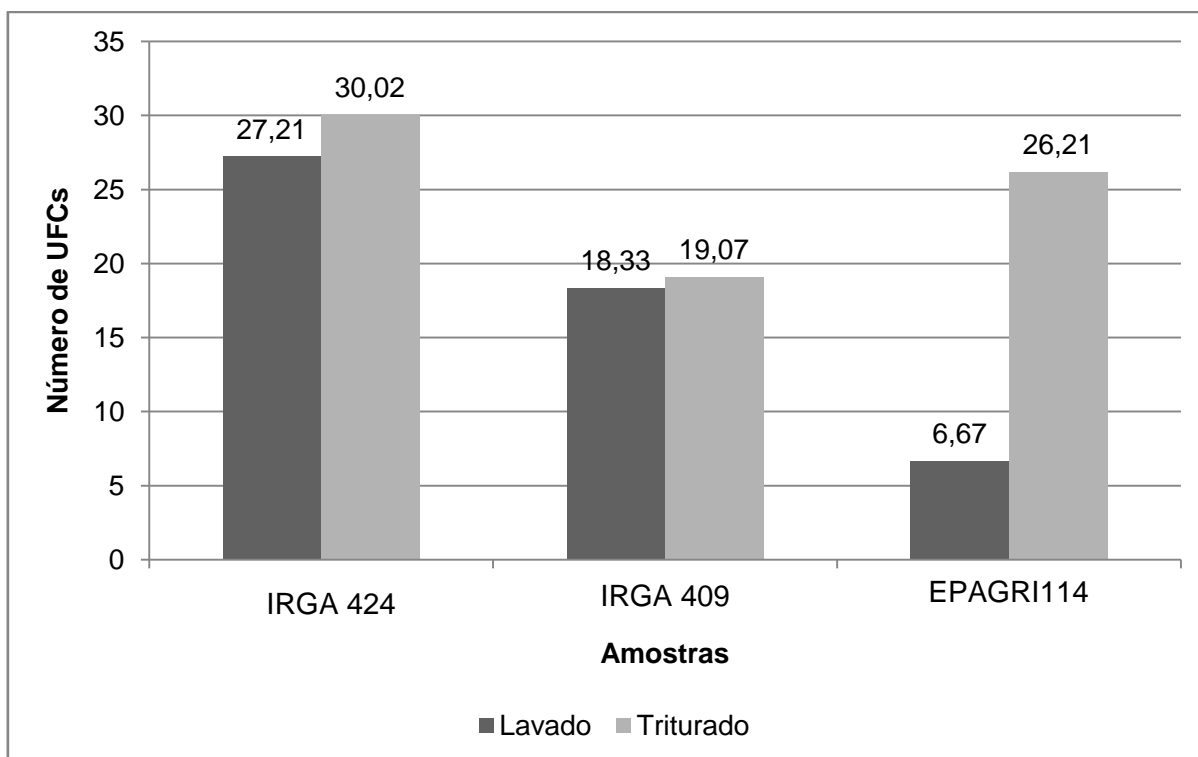


Figura 4.4. - Número (x 10⁴/mL) de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) observadas nas amostras de sementes de arroz, em função dos métodos de extração. Santa Maria, RS, 2010.

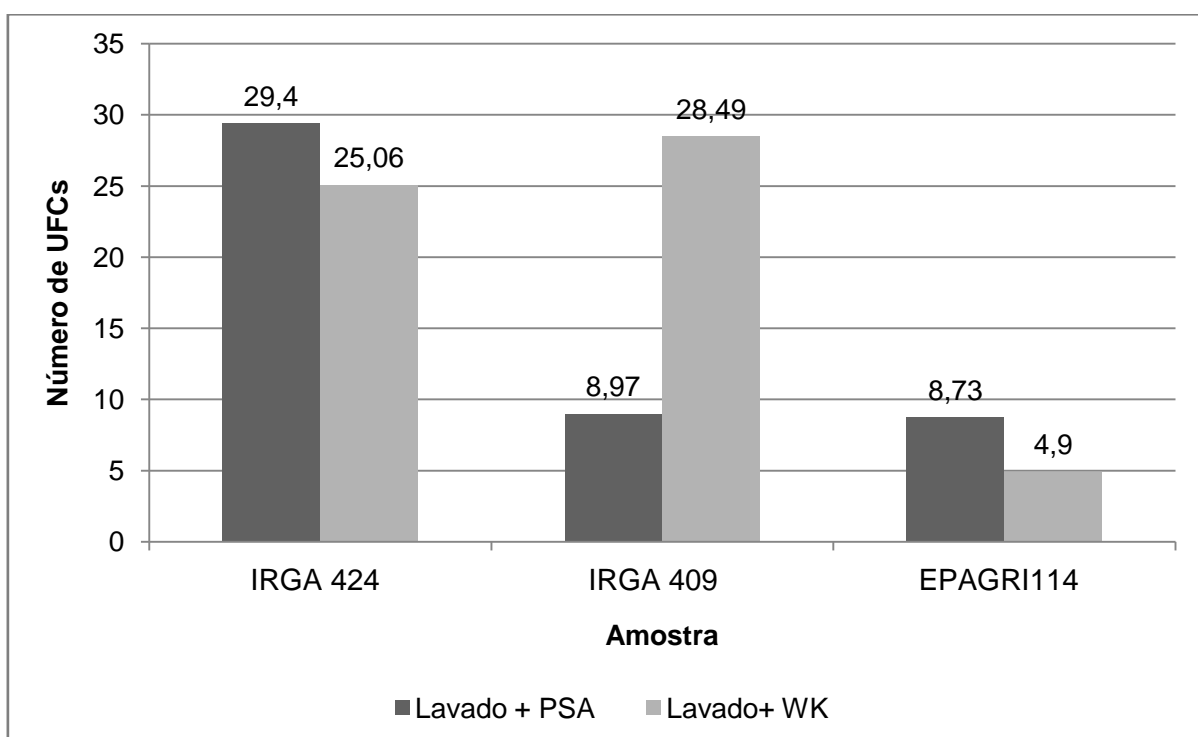


Figura 4.5. - Número (x 10⁴/mL) de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) observadas nas amostras de sementes de arroz, em função do método de extração lavado e sua associação com os meios de cultura PSA e Wakimoto (WK). Santa Maria, RS, 2010.

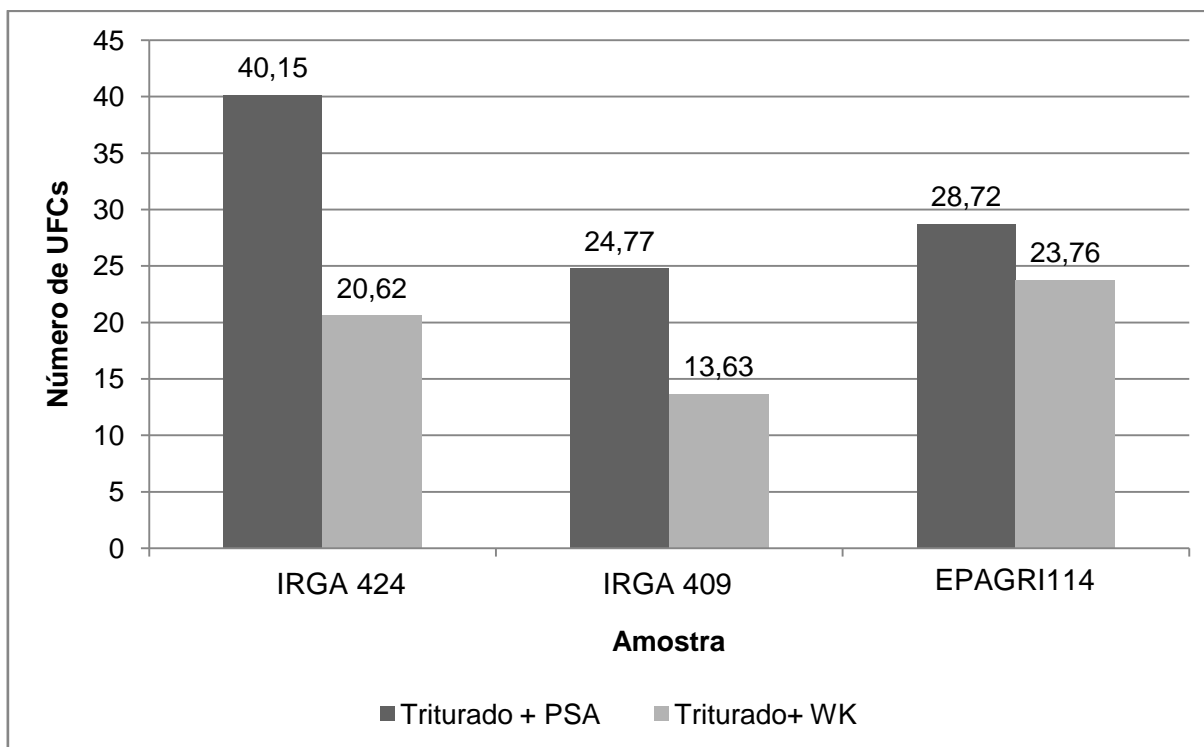


Figura 4.6. – Número ($\times 10^4/\text{mL}$) de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) observadas nas amostras de sementes de arroz em função do métodos de extração triturado e sua associação com os meios de cultura PSA e Wakimoto (WK). Santa Maria, RS, 2010.

Baseando-se nos dados apresentados, é possível inferir que a amostra influencia nos resultados obtidos. A concentração de bactérias nas sementes varia de acordo com o genótipo da planta mãe, severidade e estágio de desenvolvimento no qual iniciou a infecção na planta mãe, condições ambientes e de manejo no desenvolvimento da planta mãe, condições e período de armazenamento das sementes, etc. (NEEGARD, 1979). Todas estas variáveis fazem com que existam concentrações de bactérias diferentes, dentro de uma amostra e entre amostras de sementes.

4.4. Conclusões

Quando se avalia número e tamanho de colônias, ao longo do tempo, o meio de cultura PSA apresenta melhores resultados.

O período de incubação de 48 horas apresenta-se mais favorável para a contagem do número de UFCs, usando os meios de cultura PSA e Wakimoto.

O método de extração triturado mostrou-se mais eficiente do que o método de extração lavado, quando são avaliadas mais de uma amostra de sementes.

As características das amostras de sementes influenciam nos resultados obtidos, independente do método de extração e do meio de cultura utilizados.

4.5. Referências

BAKER, K.; SMITH, S.H. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.3, p.311-344, 1966.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgar Blücher, 293p. 1974.

GERHARDT, P (Ed.). **Methods for General and Molecular Bacteriology**. American Society for Microbiology, Washington. 791p. 1994.

LEBEN, C. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *lachymans* with cucumber seed. **Canadian Journal of Plant Pathology** v.3, p 247-49,1981.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: Mac Millan Press, 839p, 1979.

ROMEIRO, R. S.; SOUZA, R. M.; LIEBEREI, R. Sensibilidade a cianeto e capacidade de metabolização do composto por isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Fitopatologia Brasileira**, n.16, v.2, p. 24, 1991. [Abstract].

ROMEIRO, R.S. **Métodos de diluição em placas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. 1999. Disponível em: <http://www.ufv.br/dfp/bac/uni3.pdf> .Acesso em: 16/12/2010.

ROTH, D.A. Review of extraction and isolation methods. In: SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. (eds.). **Detection of bacteria in seed and other planting material**. St. Paul: APS, p.3-8.1989.

SILVA, D. O. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. 36.571.000 Viçosa, Minas Gerais. Brasil. (Comunicação Pessoal). 1996 In: ROMEIRO, R.S. **Métodos de diluição em placas para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. 1999. Disponível em: <http://www.ufv.br/dfp/bac/uni3.pdf> .Acesso em: 16/12/2010.

ZACHOWSKI, A. ; RUDOLPH, K. Characterization of isolates of bacterial blight of cotton (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*) from Nicaragua. **Journal of Phytopathology**, v. 123, p. 344-352, 1988.

ZONTA, E.P; MACHADO, A.A. **Sistema de análise estatística para microcomputadores - SANEST**. Pelotas: UFPel, Instituto de Física e Matemática, 150p. 1986.

ANEXOS

Anexo 1: Fórmula do meio de cultura NA

20 gramas de nutriente-ágar (NA)
4 gramas de ágar
1000 mL de água destilada

Anexo 2: Fórmula do meio de cultura PSA

10 gramas de sacarose
10 gramas de peptona
1 grama de Na-glutamato
17 gramas de ágar
1000 mL de água destilada

Anexo 3: Fórmula do meio de cultura Wakimoto (WK)

300 gramas de batata
0,5 gramas de nitrato de cálcio
2 gramas de fosfato de sódio bibásico
5 gramas de peptona
20 gramas de dextrose
1 grama de cloreto de sódio
20 gramas de ágar
1000 mL de água destilada

Anexo 4: Fórmula do meio PBS Tampão

8 gramas de cloreto de sódio
0,2 gramas de cloreto de potássio
1,15 gramas de fosfato de sódio dibásico dodeca-hidratado
0,2 gramas de dihidrogenato de fosfato
0,2 gramas de azida sódica
1000 mL de água destilada

APÊNDICES

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr.>F
Método	1	0.0058999	0.0058999	1.0343	0.31700
Meio	1	0.1032425	0.1032425	18.0996	0.00032
Tempo	2	0.5266090	0.2633045	46.1604	0.00001
Método X Meio	1	0.0384119	0.0384119	6.7340	0.01304
Método X Tempo	2	0.0174446	0.0087223	1.5291	0.22921
Meio X Tempo	2	0.0262814	0.0131407	2.3037	0.11263
Método X Meio X Tempo	2	0.0243662	0.0121831	2.1358	0.13107
Desvio	36	0.2053485	0.0057041		
Erro	47	0.9476040			

Apêndice 1 - Quadro de análise da variância para a variável número de UFCs em função dos métodos, dos meios de cultura utilizados e dos períodos de incubação.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>F
Método	1	15.5268721	15.5268721	19.4983	0.00023
Meio	1	82.4252053	82.4252053	103.5077	0.00001
Tempo	2	95.2512414	47.6256207	59.8072	0.00001
Método X Meio	1	0.5418767	0.5418767	0.6805	0.58003
Método X Tempo	2	1.5837537	0.7918768	0.9944	0.61838
Meio X Tempo	2	16.1054144	8.0527072	10.1124	0.00055
Método X Meio X Tempo	2	0.9162497	0.4581248	0.5753	0.57264
Desvio	36	28.6675061	0.7963196		
Erro	47	241.0181194			

Apêndice 2 - Quadro de análise da variância para a variável tamanho de UFCs em função dos métodos de extração, dos meios de cultura utilizados e dos períodos de incubação.

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>F
Linear	1	2.839656	2.839656	56.657	0.000
Quadrática	1	0.936482	0.936482	18.685	0.000
Cúbica	0	0.000000	0.000000	0.000	0.997
Desvio	0	0.000000	0.000000	0.000	0.000
Erro	42	2.105035	0.050120		

Apêndice 3 - Quadro de análise da variância para a variável número de UFCs em função dos tempos de incubação.

Causas de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc	Pr>F
Linear	1	82.561250	82.561250	81.526	0.000
Quadrática	1	3.450417	3.450417	3.407	0.072
Cúbica	0	0.000000	0.000000	0.000	0.997
Desvio	0	0.000000	0.000000	0.000	0.000
Erro	42	42.533333	1.012698		

Apêndice 4 - Quadro de análise da variância para a variável tamanho de UFCs em função dos tempos de incubação.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Método	1	6.6008377	6.6008377	0.9075	0.65076
Meio	1	0.0075079	0.0075079	0.0010	0.97318
Amostra	2	15.5254203	7.7627101	1.0672	0.35567
Método X Meio	1	5.6033240	5.6033240	0.7704	0.61013
Método X Amostra	2	28.7154033	14.3577016	1.9739	0.15189
Meio X Amostra	2	19.4737401	9.7368701	1.3387	0.27429
Método X Meio X Amostra	2	22.2804230	11.1402115	1.5316	0.22868
Desvio	36	261.8499991	7.2736111		
Erro	47	360.0566554			

Apêndice 5 - Quadro de análise da variância para a variável tamanho de UFCs em função dos métodos de extração, dos meios de cultura utilizados e das amostras utilizadas.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Método	1	0.0507735	0.0507735	7.6104	0.00888
Meio	1	0.0040020	0.0040020	0.5999	0.55025
Amostra	2	0.0927047	0.0463523	6.9477	0.00314
Método X Meio	1	0.0298096	0.0298096	4.4681	0.03919
Método X Amostra	2	0.0629508	0.0314754	4.7178	0.01490
Meio X Amostra	2	0.0349874	0.0174937	2.6221	0.08478
Método X Meio X Amostra	2	0.0559698	0.0279849	4.1946	0.02246
Desvio	36	0.2401771	0.0066716		
Erro	47	0.5713749			

Apêndice 6 - Quadro de análise da variância para a variável número de UFCs em função dos métodos de extração, dos meios de cultura utilizados e das amostras utilizadas.