

Manual Básico de Técnicas Fitopatológicas

**Laboratório de Fitopatologia
Embrapa Mandioca e Fruticultura**



**Eliane Mazzoni Carollo
Hermes Peixoto Santos Filho**

Embrapa

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**Manual Básico de
Técnicas Fitopatológicas
Laboratório de Fitopatologia
Embrapa Mandioca e Fruticultura**

Eliane Mazzoni Carollo
Hermes Peixoto Santos Filho

Embrapa
Brasília, DF
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Rua Embrapa - s/n, Caixa Postal 007
44380-000, Cruz das Almas, Ba
Fone: (75) 3312-8048
Fax: (75) 3312-8097
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Comitê de publicações da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Presidente: *Francisco Ferraz Laranjeira Barbosa*

Secretária-executiva: *Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro*

Membro: *Áurea Fabiana Apolinário Albuquerque*

Clóvis Oliveira de Almeida

Eliseth de Souza Viana

Tullio Raphael Pereira de Pádua

Cicero Cartaxo de Lucena

Jacqueline Camolese de Araújo

Leandro de Souza Rocha

Fabiana Fumi Cerqueira Sasaki

Revisão de texto: *Aldo Vilar Trindade*

Normalização bibliográfica: *Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro*

Projeto gráfico e Editoração eletrônica: *Anapaula Rosário Lopes*

Tratamento de imagem: *Victor Pereira Brito*

Foto da 1ª capa: *Leandro Rocha*

Foto da 4ª capa: *Hermes Peixoto Santos Filho*

1ª edição

On-line (2016)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Carollo, Eliane Mazzoni.

Manual básico de técnicas fitopatológicas / Eliane Mazzoni Carollo, Hermes Peixoto Santos Filho. – Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura BA, 2016.

109 f. il. ; 9,50 cm x 13,0 cm.

1. Fitopatologia. 2. Doença de planta. Santos Filho, Hermes Peixoto. II. Título.

CDD: 632.3

©Embrapa 2016

Autores

Eliane Mazzoni Carollo

Engenheira Química, DSc. em Química, analista da Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Hermes Peixoto Santos Filho

Engenheiro-agrônomo, mestre em Microbiologia Agrícola, pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA, Brasil.

Apresentação

Muitas vezes o conhecimento tácito, de alta valia para os trabalhos de rotina de um laboratório, se perde por absoluta falta de um simples registro. Aquela dica que poderia significar sucesso ou insucesso de um experimento, conhecida somente por pessoas do ramo e com larga experiência no dia a dia, raramente é repassada junto com protocolos simplificados existente, principalmente, nos artigos científicos. Essa publicação vem de certa forma cumprir esse papel, detalhando os procedimentos de rotina de um laboratório de fitopatologia, desde daqueles conceitos básicos sobre o tema até o uso de equipamentos. Tudo com o intuito de dar ao leitor a exata ideia de como lidar com as metodologias práticas da fitopatologia.

Desejamos a todos uma boa leitura, certos que propiciará muito sucesso nos trabalhos laboratoriais.

Alberto Duarte Vilarinhos

Chefe-geral da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Sumário

Introdução.....	11
Princípios e Conceitos Básicos sobre doenças de plantas	12
Conceitos básicos da fitopatologia	12
Sintomatologia	14
Sintomas mais comuns associados às doenças de plantas.....	14
Tipologia de danos em plantas.....	18
Dano Potencial	19
Dano Real	19
Dano Real Direto	19
Dano Real Indireto	20
Características funcionais do Laboratório de Fitopatologia	21
O Laboratório	21
Gestão em Laboratório	22
Biossegurança, rotinas, manutenção básica de equipamentos e instrumentos e verificação de registros	24
Biossegurança.....	24
Tarefas de rotinas para a manutenção do Laboratório.....	28
Verificação de registros.....	31
Fatores de riscos à segurança, inerentes ao Laboratório	32
Produtos químicos.....	32
Produtos biológicos.....	33
Técnicas Fitopatológicas.....	36
Desinfecção e esterilização	36
Conceitos.....	36

Técnica de esterilização por calor	37
Flambagem	37
Esterilização a calor úmido (Autoclave)	41
Cuidados com a Autoclave	44
Procedimento de operação da Autoclave	45
Esterilização a calor seco (forno Pasteur)	46
Procedimento de operação do forno Pasteur	47
Zona de esterilidade (câmara de fluxo laminar)	50
Procedimento de operação da câmara de fluxo laminar	52
Fatores associados ao cultivo de micro-organismos ...	54
Luz	55
Temperatura	57
Aeração	58
Ph	59
Nutrição	59
Incubação dos micro-organismos (estufa de germinação tipo B.O.D.)	61
Procedimento de operação da estufa de germinação tipo B.O.D.	63
Meios de cultura	64
Classificação dos meios de cultura	66
Procedimento de preparo de meio de cultura	69
Diagnose de doenças de plantas	72
Diagnóstico de doenças desconhecidas	74
Postulados de Koch ou Regras de prova de patogenicidade	74
Isolamento de micro-organismos fitopatogênicos	76
Aspectos Gerais	76
Métodos básicos de isolamento	77
<i>Isolamento direto</i>	77
<i>Vantagens do isolamento direto</i>	78

<i>Procedimento para o isolamento direto</i>	78
<i>Isolamento indireto</i>	79
<i>Procedimento para o isolamento indireto</i>	81
Métodos de inoculação de micro-organismos fitopatogênicos	85
Propósito da inoculação artificial	86
Métodos de inoculação	86
<i>Esporos a seco como inóculo</i>	87
<i>Suspensão de esporos ou de micélio triturado como inóculo</i>	87
<i>Para fungos não cultiváveis em meios de cultura</i>	88
<i>Para fungos cultiváveis em meios de cultura</i>	88
Procedimento de inoculação de fungos fitopatogênicos	89
Cálculo da concentração do inóculo	92
Suspensão de inóculo injetada no caule	95
Inoculação com cilindros ou cubos de cultivos artificiais contendo micélio do patógeno	96
Infestação de solo e inoculação de raízes	97
Exame microscópico	99
Procedimento de operação de microscópio	101
Referências	105

Introdução

Este manual foi elaborado com o objetivo de servir como uma fonte de consulta a ser utilizada para auxiliar e orientar funcionários, estagiários, bolsistas e outros usuários e clientes que se interessem pelo aprendizado de técnicas em análises fitopatológicas, envolvidas no desenvolvimento de metodologias de identificação dos agentes causais de doenças em plantas, das condições ambientais necessárias para o seu desenvolvimento e também, do manuseio de materiais e equipamentos envolvidos na marcha analítica.

O texto foi construído a partir de consultas a documentos, livros, trabalhos científicos e procedimentos operacionais padrão do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura. A publicação está dividida em três capítulos. O primeiro apresenta os princípios e conceitos básicos sobre as doenças de plantas; no segundo capítulo são abordadas as características funcionais do laboratório,

incluindo biossegurança e manutenção básica de equipamentos; e no terceiro, são descritas as técnicas fitopatológicas adotadas para isolamento, identificação e diagnóstico de patógenos.

Princípios e Conceitos Básicos sobre as doenças de plantas

Conceitos básicos da fitopatologia

O termo fitopatologia é originário de três palavras gregas (Phyton = planta, vegetal), (Pathos = doença) e (Logos = estudo, tratado), podendo ser definida como a ciência que estuda a interação entre planta, doença e meio ambiente, estabelecendo deste modo os métodos de prevenção e controle. Portanto, Fitopatologia é a ciência que estuda as doenças de plantas, abrangendo todos os seus aspectos, desde a diagnose, sintomatologia, etiologia, epidemiologia, até o seu controle.

Segundo Whetzel citado por Kimati e Bergamim Filho (1995), doença em planta

consiste de uma atividade fisiológica injuriosa, causada pela irritação contínua provocada por fator causal primário, exibida através de atividade celular anormal e expressa através de condições patológicas características, chamadas sintomas. Portanto é um processo dinâmico no qual o hospedeiro (planta) e o agente causal, denominado de patógeno (fungos, bactérias, vírus, etc.), em íntima relação com o ambiente, se influenciam mutuamente, resultando modificações morfológicas e fisiológicas.

No novo texto da Convenção Internacional para Proteção de Plantas (CIPP 2006) pragas e doenças devem ser consideradas, conjuntamente, como pragas. O conceito oficial de praga então estabelecido fica sendo: “qualquer espécie, raça ou biótipo de vegetais, animais ou agentes patogênicos, nocivos aos vegetais ou produtos vegetais”, compreendendo animais (insetos, ácaros e nematoides) e doenças (causadas por fungos, bactérias, vírus e viroides).

Sintomatologia

É a parte da fitopatologia que estuda os sintomas e sinais que caracterizam uma determinada doença na planta. Sintomas: são reações da planta (hospedeiro) ante qualquer manifestação de agentes nocivos. Sinais: são estruturas do patógeno quando exteriorizadas no tecido doente (BERGAMIN FILHO apud SALGADO; AMORIM, 1995).

Sintomas mais comuns associados às doenças de plantas

- Anasarca – extravasamento de conteúdo celular, que resulta em áreas de aspecto encharcado;
- Cancro – lesões necróticas, formando depressões nos tecidos corticais dos caules, tubérculos e raízes;
- Clorose – ausência parcial ou total da coloração verde normal. Os órgãos afetados podem se tornar verde-amarelado, amarelados ou mesmo esbranquiçados;
- Galha – desenvolvimento anormal de tecidos resultantes da hipertrofia (super-

- crescimento de células) e, ou, hiperplasia (multiplicação excessiva de células);
- Gomose – exsudação de goma a partir de lesões, principalmente em caules ou frutos;
 - Mancha – as manchas são mais comuns em folhas, mas também podem ocorrer em flores, frutos ou ramos. O sintoma resulta da morte dos tecidos que se tornam secos e pardos. Dependendo da doença, as manchas foliares têm formas variadas, podendo ser irregulares, angulares, circulares, etc;
 - Mosaico – áreas cloróticas intercaladas com áreas de verde mais escuro, observadas principalmente em folhas;
 - Murcha – perda de turgescência de folhas, pecíolos e hastes suculentas, decorrente da obstrução do sistema vascular ou destruição do sistema radicular;
 - Necrose – escurecimento de tecido resultante da morte/ desintegração de células;
 - Podridão – morte e desintegração de tecidos, decorrente da atividade enzimática de fitopatógenos; as podridões podem

ser adjetivadas como: úmidas, secas, firmes, brancas, marrons, etc.;

- Pústula – pequena mancha necrótica (geralmente menor do que 1,0 cm), com elevação da epiderme, que se rompe por força da produção e exposição de esporos fúngicos;
- Requeima ou crestamento – necrose repentina de órgãos aéreos (folhas, flores e brotações);
- Tombamento (ou damping-off) – tombamento ou morte de mudas, resultante da podridão dos tecidos tenros da base de seu caulículo. Se a podridão ocorrer antes da emergência da planta, havendo redução no estande de semeadura, diz-se que houve “tombamento em pré-emergência”;
- Verrugose – crescimento excessivo de tecidos epidérmicos e corticais, geralmente modificados pela ruptura e suberificação das paredes celulares, originando lesões salientes e ásperas, em frutos, tubérculos e folhas.

A interação dos fatores patógeno, hospedeiro e ambiente é essencial para a ocorrência de doenças em plantas. Entretanto, a severidade das doenças infecciosas pode ser maior ou menor, dependendo de outros fatores que compõem os vértices do triângulo, representados na Figura 1 A. Na agricultura moderna o homem é um fator tão importante no manejo das doenças que os autores propõem a figura de um tetraedro, ao invés de um triângulo, para melhor representar as interações entre fatores predisponentes à ocorrência de uma doença (Figura 1 B) (AGRIOS, 2005).

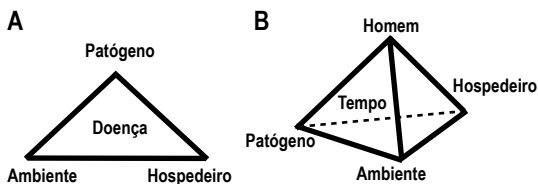


Figura 1. Diagrama esquemático das inter-relações dos fatores envolvidos em epidemias de doenças de plantas: Triângulo epidemiológico (A); Tetraedro de doença de plantas ou pirâmide de doenças (B).

Tipologia de danos em plantas

Os danos causados pelos patógenos às plantas podem gerar efeitos dos mais diversos e significativos. Segundo Zadoks e Schein, citados por Bergamin Filho e Kimati, (1995) a tipologia de danos ajuda a identificar e delimitar os tipos e variedades de plantas que podem desenvolver doenças em determinada área geográfica, minimizar o impacto agrônômico imediato e não comprometer a capacidade futura de produção. A tipologia de danos causados por patógenos inclui danos potenciais e danos reais (Figura 2).

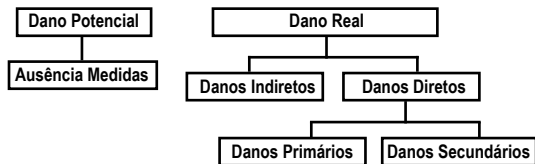


Figura 2. Esquema da tipologia de danos causados por doenças de plantas.

Dano Potencial

Dano que pode ocorrer na ausência de medidas de controle

Dano Real

É o dano que já ocorreu ou que ainda está ocorrendo.

O Dano Real divide-se em dois grupos: Dano real direto e Dano real indireto:

- **Dano Real Direto**

Afeta a quantidade ou qualidade do produto ou ainda a capacidade futura de produção. Divide-se em dois grupos: *dano real direto primário* e *dano real direto secundário*.

Dano real direto primário – É o dano causado na pré-colheita e pós-colheita de produtos vegetais devidos às doenças de plantas. Eles ocorrem desde a estocagem das sementes, passando pela germinação, crescimento da planta, colheita, manuseio e estocagem do produto colhido.

Dano real direto secundário – É o dano cuja causa é o patógeno veiculado pelo solo ou disseminado por órgãos de propagação vegetativa (sementes, tubérculos, ext.) de seu hospedeiro. Incluem-se aqui também os patógenos que debilitam, usualmente, pela desfolha prematura de seus hospedeiros.

A tipologia de danos entre o causador do dano (patógeno) e quem sofreu o dano (planta) envolve um efeito direto que afeta o produtor e o consumidor do produto. É de extrema relevância, avaliar o efeito dos possíveis danos para gerar produtos em quantidades desejáveis e com qualidade.

- **Dano Real Indireto**

Compreende os efeitos econômicos e sociais das doenças de plantas que estão além do impacto agrônômico imediato, podendo ocasionar danos no âmbito do produtor, da comunidade rural, do consumidor, do Estado e do ambiente.

Características funcionais do Laboratório de Fitopatologia

O Laboratório

O Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura está instalado em ambiente amplo, claro e arejado, destinado, prioritariamente, a realizar pesquisas referentes ao manejo integrado de doenças de mandioca e das fruteiras prioritárias abacaxi, banana, citros, mamão e maracujá. O laboratório também realiza prestação de serviços a clientes externos e internos por meio de uma clínica fitopatológica instituída para tal e credenciada junto ao MAPA pela Portaria 267, de 07/06/2010 (DOU nº108 de 09/06/2010, Seção 1, página 3) para análises de diagnóstico fitossanitário de doenças de plantas.

O laboratório ocupa uma área de 204 m² e possui vários ambientes, nos quais se encontram uma sala para o recebimento de amostras, sala do supervisor técnico, sala do

responsável pela qualidade, sala de bolsistas/ estagiários e uma minibiblioteca contendo livros específicos e periódicos sobre fitopatologia; sala de isolamento com duas câmaras de fluxo laminar, salão de experimentação com arquivos de material herbarizado, sala de balanças – material didático – sala de microscopia, sala de esterilização de vidrarias e sala de descarte de resíduos; sala de geladeiras e estufas de germinação tipo B.O.D. e sala de distribuição de material necessário aos procedimentos de pesquisa desenvolvidos e acompanhados no laboratório de fitopatologia. Em apoio aos trabalhos de laboratório, a Embrapa Mandioca e Fruticultura dispõe também de uma casa de vegetação.

Gestão em Laboratório

Em trabalhos de pesquisa e principalmente em condições de laboratório, os cuidados e a atenção devem ser contínuos. Para isto, os usuários devem conhecer os riscos à saúde, a segurança relacionada com o manuseio de produtos químicos e os riscos envolvendo

equipamentos e área de circulação de modo que se use das disposições, procedimentos que minimizem os riscos e se tenha ciência das ações emergenciais eficientes.

Antes do uso de qualquer técnica empregada no laboratório e da manipulação de qualquer equipamento, o operador deve ser capaz de identificar os pontos críticos da operação, que estarão disponíveis nos procedimentos operacionais técnicos do laboratório.

O supervisor técnico (ST), o responsável da qualidade (RQ) do laboratório ou qualquer outro funcionário credenciado para tal, deve transmitir orientações e treinar os usuários do laboratório de fitopatologia em todas as atividades realizadas, inclusive as medidas de segurança aplicáveis ao ambiente para evitar retrabalho e prevenir acidentes.

A instituição da qual o laboratório faz parte tem a obrigação de contribuir para a manutenção das instalações em conformidade com as regras de segurança e a manutenção,

revisão e calibração dos equipamentos em condições ideais para a execução dos trabalhos, promover treinamentos e capacitação de pessoas que realizam os ensaios e o uso de equipamentos; além de garantir o funcionamento do laboratório e a segurança dos usuários com os equipamentos de proteção individual (EPIs) e os equipamentos de proteção coletiva (EPCs).

Biossegurança, tarefas de rotina, manutenção básica de equipamentos e instrumentos e verificação de registros

Biossegurança

Neste caso, entenda-se biossegurança como sendo o conjunto de ações voltadas para a prevenção, proteção do usuário (prática padrão) e minimização de riscos inerentes às atividades e prestação de serviços. Este foco de atenção retorna ao ambiente ocupacional e amplia-se para a proteção ambiental e a qualidade. Não é centrado em técnicas de DNA recombinante, se baseia em técnicas

para ensaios microbiológicos que levem à identificação das doenças de plantas com segurança e sem contaminações ao usuário e ao material identificado.

A seguir estão relacionadas algumas práticas padrão que regulamentam o procedimento do usuário no laboratório de fitopatologia levando-se em consideração a biossegurança segundo o Ministério da Saúde. Vide documento Normas e Manuais técnicos do MS, 2004.

- O uso do jaleco é indispensável e deve ser utilizado somente dentro do ambiente do laboratório e nunca fora dele;
- Usar somente calçado fechado e vestuário que não ofereça risco, tipo: vestidos e saias esvoaçantes;
- Manter presos os cabelos compridos;
- Não usar boné, anéis, pulseiras, brincos, relógios e/ou qualquer adereço que seja um meio de contaminação, principalmente, quando usar a câmara de fluxo laminar;

- Não usar aparelhos sonoros e eletrônicos pessoais no laboratório como celular, rádio, notebook entre outros;
- Não guardar alimentos e bebidas em refrigerador, armário, gaveta ou qualquer compartimento que esteja no interior do laboratório;
- Não comer ou beber no interior do laboratório;
- Evitar apoiar-se na bancada do laboratório. Sempre haverá risco de presença de resíduos químicos ou contaminantes biológicos;
- Limpar o laboratório, uma vez que qualquer matéria estranha pode ser uma fonte de contaminação. Deve-se prestar atenção para evitar a contaminação cruzada provocada por diferentes itens utilizados no laboratório, como por exemplo: troca de material com outros usuários, vidraria que não esteja corretamente limpa e esterilizada;

- É necessário manter sempre os equipamentos limpos e desligados após o uso;
- No manuseio de micro-ondas é vetado o uso de material que contenha papel alumínio ou metais;
- Não tocar a mucosa bucal, nasal ou ocular durante as atividades práticas;
- Não pipetar com a boca; utilizar sempre pipetador ou dispositivos similares;
- Não utilizar vidraria quebrada ou trincada;
- Ter cuidado com o manuseio de bisturi, principalmente, na troca de sua lâmina. Colocar a lâmina descartada em recipiente próprio de descarte na bancada do laboratório;
- Manter os resíduos gerados no laboratório de fitopatologia na sala de resíduos para evitar contaminações cruzadas. Quando o recipiente de resíduos estiver com 75% de seu volume ocupado, este deve ser vedado, identificado de acordo com POP 014.2.4.00.3.001 de rotulagem,

colocar na saída de descarte de resíduos e solicitar sua retirada ao SGL (Setor de Gestão de Laboratórios) (EMBRAPA, 2010a);

- manipular com cuidado vidraria, algodão e outros embebidos em líquido e que estejam próximos à chama;
- Manipular os EPIs sempre de acordo com as recomendações do laboratório de fitopatologia, contidas em POPs ou em outros documentos;
- Não tocar em maçanetas para abrir ou fechar portas, não atender telefone e não manipular áreas do corpo com luvas que estejam sendo utilizadas nos ensaios;
- Fazer, obrigatoriamente, a assepsia das mãos antes e após as atividades.

Tarefas de Rotina para a manutenção do laboratório

- Separar previamente o material necessário para cada experimento, evitando maiores transtornos e perda de tempo;

- Etiquetar ou anotar com caneta retro-projetor todo material separado para o ensaio;
- Identificar sempre com data de realização, nome do usuário e o tipo de material em estudo;
- Limpar a área da bancada a ser utilizada com álcool ou desinfetante neutro;
- Rotular adequadamente os frascos com soluções de acordo com POP 014.2.4.00.3.001 (EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 2010A);
- Armazenar os produtos químicos e as substâncias tóxicas em condições de segurança e o seu manuseio feito sempre com luva própria e outros EPIs exigidos para a atividade;
- Ao término das atividades: seguir as recomendações abaixo:
 - Vidrarias, como placas de Petri: deixar de molho por 1 hora em solução com sabão em pó ou detergente e com o auxílio de uma escova de limpeza ou


esponja de aço, retirar o excesso de resíduos; enxaguar em água corrente várias vezes, e depois em água deionizada. As demais vidrarias, lavar com o auxílio de escova própria, detergente, enxaguar e colocar para secar em estufa;

- Vidraria de difícil limpeza como pipetas e lâminas manchadas de corante: deixar por mais tempo submersa em água ligeiramente acidificada (solução de ácido clorídrico, 0,5%) e depois proceder à lavagem e esterilização quando necessária;
- Após limpeza e esterilização, cobrir com papel alumínio a abertura da vidraria;
- Lavar a pia após usá-la; evitar jogar material usado na pia e os resíduos embrulhar em papel jornal e colocar no cesto de lixo específico;
- Lavar, secar e repor, no seu devido lugar, o material empregado no ensaio;
- Manter o laboratório sempre limpo e organizado.

Verificação de Registros

O uso de cada equipamento deve ser registrado em ficha própria conforme Figura 3, que deve ficar ao lado do equipamento a ser usado, para as devidas anotações, (Figura 4).

Os registros dos resultados analíticos devem ser anotados em caderno próprio ou, no caso da Clínica Fitopatológica, na ficha de entrada de amostra e na ficha de acompanhamento do POP do ensaio que se faça necessário para a identificação do patógeno e o diagnóstico final da doença, que acompanha o laudo.

	LABORATÓRIO DE FITOPATOLOGIA	FOR - 13	Revisão 01
		Página	01/01
HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO			

Equipamento:

DATA	FINALIDADE	USUÁRIO

Figura 3. Modelo de ficha própria para balança semianalítica.



Foto: Leandro Rocha

Figura 4. Disposição da ficha, própria para anotação de uso e documento do Procedimento Operacional Padrão (POP) para uso da balança semianalítica, próximo ao equipamento.

Fatores de riscos à segurança, inerentes ao Laboratório

Produtos químicos

O preparo e manuseio de algumas soluções e substâncias tóxicas sem a observância dos procedimentos adequados podem causar consequências graves. Antes do manuseio de

qualquer substância química é imprescindível a leitura da Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ). Qualquer substância tóxica deve ser controlada a fim de prevenir a inalação de vapores, gases e partículas (fumaças, poeiras e aerossóis). Essas substâncias devem ser manipuladas sempre com EPIs e EPCs apropriados.

Produtos biológicos

Embora a maioria dos fitopatógenos não seja patogênica ao homem, alguns micro-organismos oportunistas podem ser acidentalmente dispersados. Os colaboradores que apresentem alguma condição ou enfermidade relacionada ao comprometimento imunológico terá sua permanência em atividades de bancada condicionada à avaliação médica.

É sempre bom lembrar que no laboratório de fitopatologia são recebidos tecidos vegetais sintomáticos para diagnose sem ter, muitas vezes, o conhecimento prévio se o material foi pulverizado com defensivos químicos ou se o possível agente causal, até então

desconhecido, pode ocasionar lesões ou alergias ao manipulador, devendo-se sempre preferir o seu manuseio usando EPIs apropriados, como luvas e máscaras.

A estrutura física do laboratório de fitopatologia é adequada para trabalhos com produtos biológicos com classificação de risco 1, de acordo com classificação da Organização Mundial da Saúde (MANUAL, 2004), o que permite o baixo risco individual e coletivo dos seus usuários, ante micro-organismos infecciosos.

Tabela 1. Classificação de micro-organismos infecciosos por grupo de risco segundo a OMS.

Grupo de Risco 1 (nenhum ou baixo risco individual e coletivo)

Um micro-organismo que provavelmente não pode causar doença no homem ou num animal.

Grupo de Risco 2 (risco individual moderado, risco coletivo baixo)

Um agente patogénico que pode causar uma doença no homem ou no animal, mas que é improvável

continua...

...continuação.

que constitua um perigo grave para o pessoal de laboratórios, a comunidade, aos animais ou ao ambiente. A exposição a agentes infecciosos no laboratório pode causar uma infecção grave, mas existe um tratamento eficaz e medidas de prevenção e o risco de propagação de infecção é limitado.

Grupo de Risco 3 (alto risco individual, baixo risco coletivo)

Um agente patogênico que causa geralmente uma doença grave no homem ou no animal, mas que não se propaga habitualmente de uma pessoa a outra. Existe um tratamento eficaz, bem como medidas de prevenção

Grupo de Risco 4 (alto risco individual e coletivo)

Um agente patogênico que causa geralmente uma doença grave no homem ou no animal e que se pode transmitir facilmente de uma pessoa para outra, direta ou indiretamente. Nem sempre está disponível um tratamento eficaz ou medidas de prevenção

Esta condição é fiscalizada, acompanhada e consolidada juntamente com a Comissão Interna de Prevenção de Acidentes (CIPA) da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Técnicas Fitopatológicas

Desinfecção e esterilização

A desinfecção e a esterilização fazem parte da marcha analítica e a especificidade da descontaminação dependerá do tipo de procedimento que é desenvolvido no laboratório e o agente infeccioso manipulado.

Conceitos

- Desinfecção é a eliminação dos germes patogênicos sem que haja necessariamente a destruição de todos os micro-organismos por meios físicos ou químicos.
- Esterilização do material consiste num processo utilizado para destruir todos os micro-organismos nele existente.
- Antissepsia (anti-contra, septse-putrefação) é o uso de substâncias capazes de impedir a proliferação de micro-organismos.

- Assepsia é o conjunto de meios empregados para impedir proliferação de micro-organismos em local que não os contenha.

No tratamento prévio para fins de desinfecção e antissepsia, em geral, faz-se uso de produtos químicos. No laboratório de Fitopatologia do CNPMF é utilizado hipoclorito de sódio (NaClO) 0,5 % por 5 minutos, em seguida álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) a 70% por mais 5 minutos e, por fim, água estéril.

As técnicas de esterilização podem utilizar métodos físicos ou métodos químicos. Os métodos físicos envolvem a técnica de esterilização por calor, que pode ser seco ou úmido e flambagem; e os métodos químicos utilizam reagentes químicos como álcoois, sais de halogênios e óxidos. A esterilização pelo calor é o mais eficaz agente esterilizante e pode ser empregado por diferentes formas:

Técnica de esterilização por calor

Flambagem

Flambagem é o meio mais simples de se esterilizar um instrumento metálico ou de vidro (pinça, estilete, alça de platina, placa de Petri e outros) passando-o várias vezes pela chama de um bico de Bunsen (ZAUZA et al, 2007).

- Flambagem em Alça de platina

Tanto a alça de platina quanto o fio de platina devem ser flambados antes e depois de qualquer operação de semeadura ou inoculação de micro-organismos. Para tanto, devem ser aquecidos ao rubro e a parte inferior do cabo deve ser passada na chama 2 a 3 vezes e sempre molhando no álcool PA. A posição correta para a flambagem da alça é mantê-la a um ângulo de 45° em relação à mesa de trabalho, incidindo a parte a ser esterilizada no cone interno da chama do bico de Bunsen (Figura 5). Para retirar o material, seja para fazer um

Foto: Leandro Rocha

Figura 5. Posição correta para a flambagem da alça de platina.



esfregaço ou para uma semeadura, esfriar previamente a alça de platina.

- Flambagem de placas de Petri ou tubos

Toda vez que fizer uma semeadura ou inoculação de micro-organismos utilizando tubos de ensaio, tubos de rosca ou frascos do tipo erlenmeyer ou placa de Petri (Figura 6) deve-se flambar a abertura dos mesmos imediatamente após a retirada da tampa (ou tampão de algodão ou a tampa de vidro da placa). A tampa deve ser mantida segura pelo dedo mínimo da mão e deixada na

posição entreaberta. Caso esteja repicando a cultura para outro tubo ou placa de Petri, o mesmo procedimento deve ser feito, com este outro tubo, antes da inoculação dos micro-organismos. Incluir sempre e aproximadamente 30° . No caso de tubo, este deve ficar de preferência na horizontal. Após a retirada do material com alça ou pipeta, flambear novamente a boca do tubo ou da placa de Petri, várias vezes, colocar o tampão no tubo, a tampa na placa de Petri e fechar imediatamente com fita de policloreto de vinila (PVC).



Foto: Leandro Rocha

Figura 6. Posição correta para flambagem de placa de Petri.

Esterilização a calor úmido (Autoclave)

A autoclave é um equipamento muito eficiente para a esterilização de diversos materiais como vidrarias, plásticos autoclaváveis, meios de cultura e também para a destruição de micro-organismos antes de procedimento de descarte. (Figura 7).



Foto: Leandro Rocha

Figura 7.
Autoclave vertical.

A esterilização a calor úmido consiste no tratamento térmico úmido ou via vapor saturado cuja função é, mediante o controle da pressão de vapor da água, favorecer temperaturas superiores a 100 °C, ou de forma inversa, controlando a temperatura, favorecer pressões superiores à atmosférica; o seu poder de penetração é muito grande e faz com que o micro-organismo sofra coagulação das proteínas levando-o à morte (ZAUZA et al., 2007)

A pressão utilizada é de um (1) atm (1 kgf/cm²) em geral, a 121°C por 15 minutos ou mais. O tempo mínimo para a esterilização adequada de líquidos é de 15 minutos para 50 mL; 20 min para 75 mL; 25 min para 250 mL; 30 min para 500 mL; 35 min para 1000 mL e 45 min para 1500 mL ou mais. Se permanecer o líquido a ser esterilizado na autoclave por tempo excessivo, contendo meio com ágar, o ágar é hidrolisado,

resultando um meio espesso por vezes inibidor. Os materiais difíceis de serem aquecidos (óleo, solo, semente e pó) devem ser esterilizados em pequenas quantidades, durante períodos mais longos. O período de tempo deve ser aumentado também no caso de materiais altamente contaminados. Como exemplos de uso da autoclave, têm-se a esterilização de placas de Petri, tubos de ensaio, microtubos, ponteiras, meios de cultura, papéis toalha, pipetas manuais, etc. No entanto, como medida de segurança ou para evitar estragos com os materiais e meios de cultura a serem esterilizados, alguns cuidados devem ser seguidos com o manuseio do equipamento. Para tal, consultar sempre que necessário o procedimento operacional padrão da Autoclave vertical, POP 014.2.4.06.4.003, que se encontra no laboratório de fitopatologia (EMBRAPA, 2012b).

Cuidados com a Autoclave

- O material a ser autoclavado deve ser colocado no cesto de forma a não encher demais a autoclave (evitar preencher o cesto acima de 2/3 de sua capacidade); não colocar fita de PVC em vidraria; fechar os frascos com algodão ou com papel alumínio.
- Os resíduos gerados em placas de Petri ou em outro tipo de material devem ser esterilizados antes do seu descarte e posterior lavagem. Mas, antes retirar a fita de PVC de toda a vidraria, colocar tudo em saco plástico próprio, fechar o saco e identificá-lo com nome e o tipo de resíduo para autoclavagem.
- Após a esterilização do resíduo gerado, preferencialmente quente, retirar o mesmo com a ajuda de uma espátula de plástico, colocar em uma folha de jornal e descartar no lixo convencional e, caso haja no meio de cultura alguma substância considerada tóxica, o resíduo será colocado

no próprio saco plástico da esterilização e descartado em um recipiente próprio na sala de descarte.

Procedimento de operação da Autoclave

- Verificar o nível recomendado de água dentro do equipamento antes de colocar qualquer material;
- Colocar a cesta de inox com o material a ser esterilizado no interior do vaso de pressão;
- Fechar a tampa da autoclave, colocar as travas na posição recomendada e fechá-las, duas a duas, em posição diagonal;
- Abrir a válvula de alívio de pressão, que fica no conjunto de válvulas, girando sempre no sentido anti-horário;
- Ligar a autoclave girando a chave seletora até a posição máxima (MÁX);
- Ligar o sistema de exaustão do ambiente;
- Fechar a válvula de alívio, sempre que ocorrer a saída de vapor intermitente,

- sempre utilizando EPIs (luvas de raspa de coco e óculos de proteção);
- Aguardar alguns minutos até a pressão e a temperatura atingirem os valores desejados para a esterilização, indicado no manômetro, girando a chave seletora para a posição média (MED);
 - Desligar a autoclave após decorrer o tempo estipulado para a esterilização.

Esterilização a calor seco (Forno Pasteur)

O equipamento denominado de Forno Pasteur (Figura 8) utiliza um processo de esterilização com calor a seco, e é muito empregado ao esterilizar materiais como instrumentos metálicos e vidrarias, que muitas vezes não podem ser submetidos ao calor úmido.

Em geral, as temperaturas necessárias para a esterilização são maiores (em torno de 120 °C e 180 °C), assim como, os tempos de exposição (a partir de uma hora), diferentemente dos tempos empregados

na autoclave, uma vez que o poder de penetração do calor seco é menor que o do calor úmido e o maior tempo de exposição leva os micro-organismos à morte por oxidação, ou seja, um processo de desidratação dos seus núcleos celulares (ZAUZA et al, 2007).

Cuidados devem ser seguidos com o manuseio do equipamento, para tal, consultar sempre que necessário o procedimento operacional padrão do Forno Pasteur que se encontra no laboratório de fitopatologia ao lado do equipamento (EMBRAPA, 2011a).

Procedimento de operação do Forno Pasteur

- Organizar no interior da cesta o material que deve ser esterilizado, como vidrarias (placas de Petri), envolto em papel jornal afastado das paredes do mesmo, de modo a permitir a circulação do ar pelo equipamento, antes de ligar o equipamento;

- Fechar o equipamento com a tampa, colocar o termômetro calibrado na abertura específica, abrir a janela de ventilação, afim de possibilitar a saída do ar frio do seu interior;
- Ligar o disjuntor e logo após ligar o equipamento, girando a chave seletora, posicionando a parte mais fina na posição alta (HIGH);
- Aguardar a temperatura atingir 120 °C, fechar a janela de ventilação com o emprego de luvas, pois a tampa giratória está com a mesma temperatura indicada no termômetro;
- Aguardar a temperatura atingir 180 °C, girar a chave seletora, posicionando a parte mais fina na posição média (MED). Manter por 2 horas nesta temperatura;
- Girar a chave seletora, posicionando a parte mais fina na posição baixa (LOW), após as 2 horas de operação a 180 °C;
- Girar a chave seletora, posicionando a parte mais fina na posição OFF, quando

- a temperatura estiver abaixo de 100 °C, desligando assim o equipamento;
- Desligar o disjuntor após resfriamento do equipamento;
 - Lembrar que os materiais no interior do equipamento ainda estarão quentes, devendo-se, aguardar o resfriamento destes ou usar luvas de raspas de couro para retirar o material estéril.

Foto: Leandro Rocha



Figura 8.
Forno Pasteur.

Zona de esterilidade (Câmara de Fluxo Laminar)

A câmara de fluxo laminar ou capela microbiológica (Figura 9) é um equipamento destinado a controlar as micropartículas aéreas, associadas ao manuseio de materiais biológicos infecciosos ou tóxicos, por meio de uso de ventilação apropriada, existente no seu interior, tornando o ambiente estéril para fins de proteção ao usuário e à amostra manipulada (MANUAL, 2005).

As manipulações devem ser realizadas dentro da câmara. Para trabalhos de fitopatologia a câmara deve ser horizontal, para evitar o fluxo unidirecional com grande turbulência encontrado nas câmaras de fluxo vertical.

O fluxo é uma circulação de ar que visa manter o ambiente estéril dentro da câmara, onde a manipulação dos materiais

deve ser feita, junto da chama de uma fonte de calor, de forma a garantir o estabelecimento de uma zona de esterilidade. É somente nesta zona estéril que os tubos, placas de Petri e recipientes com meios de cultura devem ser abertos e o material biológico a ser inoculado deve ser manipulado. Qualquer outro material estéril (ex: caixa de ponteiras, seringas, placas de Petri, caixa com microtubos, etc.) utilizado nos procedimentos de ensaio, também devem ser abertos nesta área para ser preservada a sua condição.

Os cuidados que devem ser seguidos com o manuseio do equipamento estão disponibilizados no procedimento operacional padrão da câmara de fluxo laminar, POP 014.2.4.06.4.005, que se encontra no laboratório de fitopatologia ao lado do equipamento (EMBRAPA, 2012c).



Foto: Leandro Rodia

Figura 9. Câmara de Fluxo Laminar, com ficha de registro de uso e POP específico, afixado no equipamento.

Procedimento de operação da Câmara de Fluxo Laminar

- Ligar a câmara pressionando uma vez o botão verde;
- Ligar a iluminação acionando-se a chave metálica para a posição “luz”;
- Limpar as paredes, a superfície da área de trabalho, grelhas frontal e posterior e as laterais da câmara, com algodão embebido em álcool 70% ou qualquer outra solução desinfetante;

- Deixar a câmara ligada pelo menos 30 minutos antes de iniciar os trabalhos, a fim de remover qualquer partícula de material que possa estar na face do filtro ou que venha na grelha de proteção;
- Esterilizar ou desinfestar superficialmente com álcool PA, todo equipamento ou material que se introduza na área de trabalho da câmara inclusive, os utensílios que contém as amostras biológicas a serem ali manipuladas;
- Não colocar materiais desnecessários ao procedimento na área de trabalho estéril, porque podem obstruir o fluxo de ar e criar turbulências que podem causar contaminações cruzada ou aspiração de ar para dentro da área de trabalho;
- Antes de iniciar os trabalhos, lavar as mãos e os punhos, assim como, todas as vezes que tiver contato com material não estéril externo à área de trabalho.
- Imediatamente após o término do serviço, limpar as grelhas frontal e posterior e

as laterais da câmara, com algodão embebido em álcool PA ou qualquer solução desinfetante; em seguida desligar a câmara (botão vermelho);

- Desligar a iluminação (chave metálica);
- Manter, sempre que possível, a câmara em funcionamento a maior parte do tempo, pois a pressão positiva gerada dentro da área de trabalho ajudará a manter as condições de limpeza da mesma;
- Realizar testes e troca dos filtros absolutos (HEPA®) sempre por pessoal técnico qualificado, contratado para tal.

Fatores associados ao cultivo de micro-organismos

Os micro-organismos necessitam de condições ambientais adequadas para se desenvolverem e esporularem, tais como luz, temperatura, aeração, pH, etc. No entanto, não existe um conjunto de condições únicas para todas

as culturas de fungos patogênicos e é preciso que aquelas, sejam pré-estabelecidas;

É importante saber quais as melhores condições para o crescimento vegetativo e esporulação dos micro-organismos, o que pode acontecer até em condições extremas adversas ao micro-organismo, mas normalmente nessas condições ou quando estas são excedidas, o crescimento pode ser retardado ou mesmo não haver crescimento ou esporulação.

Luz

As fontes de luz empregadas são:

- Luz visível (380 – 750 nm) – as lâmpadas fluorescentes são boas fontes de luz, já as lâmpadas incandescentes com filamento de tungstênio emitem muito calor e isto pode causar problemas à cultura de micro-organismos.

A radiação UV é formada por faixas de radiação com características e aplicações práticas específicas.

- UV próximo (NUV) (300 – 380 nm);
- UV-A conhecida como UV de onda longa ou luz negra (310 – 420 nm), representa a maior parte dos raios;
- UV emitidos pelo sol;
- A UV distante ou UV-C ou faixa UV germicida, compreende a faixa de 200 a 300 nm. O comprimento de onda da radiação UV-C que inativa o DNA/RNA, material genético dos microrganismos, situa-se entre 250 e 270 nm.

A luz pode estimular a reprodução sexuada e assexuada em quase todos os fungos. Normalmente, os comprimentos de onda UV inferiores a 340 nm induzem à esporulação.

A esporulação de fungos pela luz deve seguir as seguintes recomendações:

- Usar lâmpadas fluorescentes que emitam radiação na faixa de (320 – 420 nm), ou seja, UVN;

- Usar duas lâmpadas de 40 Watts cada, na posição horizontal, afastadas 20,0 cm, acima da placa com a cultura;
- Usar um ciclo alternado luz - escuro de 12h (também chamado de fotoperíodo de 12h);
- Usar tubos ou placas que permitam a passagem da luz NUV.

Temperatura

A temperatura favorece a regulação e a distribuição das espécies em toda uma região. O conhecimento da temperatura é fundamental para a otimização do cultivo in vitro. Os efeitos deste fator sobre o crescimento de uma espécie pode ser determinado, avaliando-se inicialmente a temperatura a intervalos mais amplos, de aproximadamente 5 °C (Ex.: 25 °C, 30 °C e 35 °C), podendo variar de no mínimo cinco pontos, para construir uma curva típica de crescimento e determinar as temperaturas mínima e máxima de crescimento.

- **Em fungo**

Embora cada fungo tenha uma temperatura ótima de desenvolvimento, normalmente a maioria desenvolve-se bem à temperatura ambiente (20 – 25 °C). A temperatura pode ser controlada em incubadoras ou em banho-maria.

- **Em bactéria**

A temperatura é o fator externo de maior importância para a reprodução de bactérias. As bactérias fitopatogênicas encontram-se à temperatura ótima para o seu desenvolvimento entre 25 °C e 30 °C. As mesmas param de se reproduzir entre 33 °C e 40 °C.

Aeração

O oxigênio (O_2) assim como o dióxido de carbono (CO_2) influencia no crescimento de micro-organismos. O gás carbônico muito embora faça parte de algumas reações químicas existentes nas células, seu excesso

no meio de cultura pode inibir o crescimento e a esporulação de alguns micro-organismos.

pH

O pH ótimo para o crescimento vegetativo pode não ser o mesmo que induz à esporulação. Enquanto fungos crescem numa faixa ampla de pH, as bactérias geralmente são sensíveis ao meio ácido. Sendo assim, em alguns trabalhos de rotina o pH do meio é ajustado usando-se ácido acético, ácido clorídrico, ácido láctico, hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio antes ou depois de autoclavar, se necessário. É importante verificar se o meio que contém ágar não solidifica em pH abaixo de 4,0. E autoclavar o meio pode alterar o pH, portanto, é preciso ajustá-lo antes e conferir depois de acordo com os objetivos do estudo.

Nutrição

Os elementos minerais quando requeridos pela planta e seu fornecimento sendo adequado, fornecem à planta uma maior resistência à doença. Portanto, é importante manter o

balanço nutricional nas plantas, principalmente, de nitrogênio, fósforo e potássio, porém, nada em excesso. Como controle nutricional preventivo das plantas usam-se, na maioria dos casos, os fertilizantes. E, como meio nutritivo para o crescimento dos micro-organismos em laboratório temos os meios de cultura (BEDENDO,1995).

Quando não se conhece os micro-organismos que estão sendo cultivados como no caso do estudo da microbiota de determinado local, normalmente devem ser isolados, incubados e a cultura pura identificada e diagnosticada.

A estufa de germinação tipo B.O.D. é um equipamento muito usado no laboratório de fitopatologia cujas condições pré-estabelecidas de incubação e meio de cultura apropriado permite que um determinado micro-organismo possa ser isolado para posterior identificação.

Incubação de micro-organismos (Estufa de germinação tipo B.O.D.)

O período que decorre após o isolamento de um micro-organismo (bactérias, fungos, leveduras, etc.) em câmara de fluxo laminar até o momento em que ele apresenta estruturas que permitam a obtenção de uma cultura pura é denominada de incubação. Para os micro-organismos aeróbios, a incubação em placas de Petri ou tubos contendo inóculo é normalmente feita em estufas bacteriológicas ou estufa de germinação tipo B.O.D. (Figura 10). O controle de temperatura é importante, tanto em condições aeróbias como anaeróbias, pois é um fator a ser considerado para o cultivo dos micro-organismos. Enquanto muitos micro-organismos crescem em temperatura ambiente, outros crescem em condições extremas, podendo chegar até 37 °C. E, para tal, os micro-organismos devem ser mantidos em estufas de germinação com a temperatura regulada e quando necessário, em presença de luz, também controlada.

Para tal a estufa de germinação deve possuir nível de fotoperíodo. Todas as operações e manuseio do equipamento devem ser feitas após consultar o procedimento operacional padrão da estufa de germinação tipo B.O.D., POP 014.2.4.06.4.002, que se encontra no laboratório de fitopatologia (EMBRAPA, 2012d).



Foto: Leandro Rocha

Figura 10. Estufa de germinação tipo B.O.D.

Procedimento de operação da Estufa de germinação tipo B.O.D.

- Ligar a tomada do aparelho na fonte de energia;
- Ligar o aparelho na chave Liga/Desliga;
- Regular a temperatura, girando a chave seletora do termostato e conferir a temperatura com auxílio de um termômetro, colocado no interior do equipamento;
- Aguardar a temperatura atingir o valor desejado; aferir a temperatura selecionada no termostato do aparelho, com a indicada no termômetro;
- Dispor de forma ordenada as placas de Petri ou tubos de ensaio, contendo o meio de cultura com o isolado das amostras para crescimento dos fitopatógenos, após o ajuste da temperatura;
- Desligar o equipamento na chave Liga/Desliga e retirar a tomada da fonte de energia. Retirar a água acumulada na bandeja e periodicamente, limpar com

auxílio de esponja, água e detergente, sempre que seja concretizado o encerramento do ensaio (avaliações, crescimento e a identificação do fitopatógeno);

- Rotular todo e qualquer material introduzido na estufa de germinação com as seguintes informações: identificação do material, responsável pelo trabalho e data de preparo;
- Descartar sumariamente todo e qualquer material introduzido na estufa de germinação que não possua a rotulação indicada no item anterior;
- Limpar a estufa de germinação tipo B.O.D. com hipoclorito 2% a cada três meses e/ou quando necessário e, somente utilizar depois de 24 horas.

Meios de cultura

Os meios de cultura são substâncias ou soluções que podem ser usados na seleção e crescimento de um determinado micro-organismo ou célula vegetal para a

identificação de uma espécie em particular (ZAUZA et al, 2007).

Entre os principais componentes de um meio de cultura adequado ao desenvolvimento de fitopatógenos, estão as fontes de carbono e energia como os açúcares, as fontes de nitrogênio, fósforo, e sais minerais. Outros componentes que podem ser encontrados em um meio específico para um determinado organismo (meio seletivo), são os fatores de crescimento como as vitaminas, aminoácidos, etc. Por outro lado podemos ter num meio, agentes / constituintes que inibam o crescimento de determinados micro-organismos, sendo estes também considerados meios seletivos. Além dos meios seletivos existem também os meios que permitem diferenciar os micro-organismos (meios diferenciadores ou diferenciais) e o exemplo mais simples é a existência de um indicador de pH, que permite verificar se, por exemplo, um açúcar presente no meio é metabolizado, pois ao ser, implica na produção de

metabólitos que acidificam o meio, alterando o seu pH e conseqüentemente alterando a cor do indicador de pH (BRASIL, 1954).

Classificação dos meios de cultura

Os meios de cultura segundo Zauza et al. (2007) encontram-se nas seguintes categorias:

- **Sintético**

Os meios de cultura sintéticos são constituídos de ingredientes ou substâncias cuja composição e concentrações químicas são conhecidas.

- **Semissintético**

Os meios de cultura semissintéticos que são amplamente utilizados na microbiologia, assemelham-se aos meios sintéticos quanto ao possuírem um conjunto conhecido de ingredientes ou substâncias. Porém, o meio semissintético contém uma fonte natural de açúcar, podendo ser a batata, milho, extrato de carne ou de malte.

- **Natural**

Os meios de cultura naturais são compostos parcial ou integralmente de produtos naturais, como parte das plantas (folhas, brotos, raízes, sementes, frutos, etc.) ou de infusões ou de extratos de materiais de origem vegetal ou animal. Um pedaço de batata é um meio de cultura natural, assim como um pedaço de pão ou de carne.

- **Seletivo**

O meio de cultura seletivo favorece ao desenvolvimento de uma cultura pura ou inibi culturas indesejáveis, e para isto, são utilizadas substâncias como: antibióticos, vitaminas ou fungicidas, adicionados ao meio de cultura já preparado.

O emprego do meio de cultura possibilita o isolamento de micro-organismos que poderão ser diagnosticados como agentes causais de doenças, após o cumprimento dos postulados de Koch (BRASIL, 1954).

Para o isolamento de um fitopatógeno utiliza-se ágar nutritivo (AN) para bactérias, e ágar-água (AA) ou batata dextrose ágar (BDA) para fungos, considerado um meio de cultura universal. Para fitopatógenos desconhecidos é necessário fechar os postulados de Koch para possibilitar a certeza de sua patogenia.

Outros meios mais específicos também podem ser usados tanto para fungos como para bactérias, porém, todos devem ser esterilizados antes de seu uso.

A identificação de um tecido infectado através de uma avaliação feita por microscopia permite dizer que tipo de patógeno está envolvido na doença da planta e qual o meio de cultura mais indicado.

Cuidados devem ser seguidos com o preparo do meio de cultura. Para tal, consultar sempre que necessário o procedimento operacional padrão, intitulado Preparo de meio de cultura em batata dextrose e ágar, POP 014.2.4.06.3.004, que se en-

contra no laboratório de fitopatologia (EMBRAPA, 2010B) ou consultar os registros da qualidade do laboratório de fitopatologia (REQLFITO 012) onde se encontram os meios de cultura mais empregados no laboratório.

Procedimento de preparo de meio de cultura

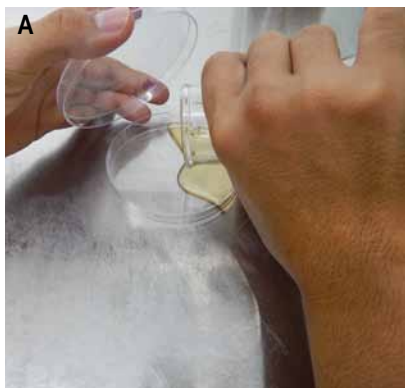
- Pesar cada substância em um béquer, com identificação de cada uma e o peso a ser pesado (para minimizar erros), tampar com papel alumínio cada béquer até que termine a pesagem;
- Antes de adicionar as substâncias do béquer no erlenmeyer ou vidro âmbar, certificar-se que o volume do erlenmeyer ou do vidro âmbar está correto (medir com uma proveta de volume próximo ao que se deseja preparar o meio de cultura, inserir na vidraria e fazer uma marcação com caneta própria); a seguir passar água destilada na vidraria, colocar um volume de água destilada no fundo do vidro que corresponda a três centímetros de altura

e levar ao agitador magnético com uma barra magnética e proceder à adição de cada substância;

- Levar o meio já homogeneizado, no vidro âmbar, com a tampa entreaberta, e se for no erlenmeyer, coberto com papel alumínio, para a autoclave, sob pressão de 1 kgf/cm² (1 atm), temperatura regulada para 120 °C e deixar por 20 minutos
- Terminada a dissolução do meio de cultura, deixar esfriar até aproximadamente 50 °C (temperatura máxima para se segurar o frasco na mão), verter cuidadosamente para as placas de Petri em uma câmara de fluxo laminar (Figura 11A) e deixá-las semiabertas (Figura 11B) até que esfrie (em média uns 20 min).

OBS: Quando usar antibiótico no meio de cultura, proceder às etapas anteriores até a dissolução do meio, deixar esfriar até aproximadamente 50 °C (temperatura máxima para se segurar o frasco na mão), adicionar o antibiótico (previamente diluído em aproximadamente 1 mL de água deionizada, autoclavada em

ambiente asséptico) e colocar na mesa agitadora por 3 minutos. Em seguida, verter para placas de Petri em câmara de fluxo laminar, esfriar e quando necessário, armazenar em geladeira.



Fotos: Leandro Rocha

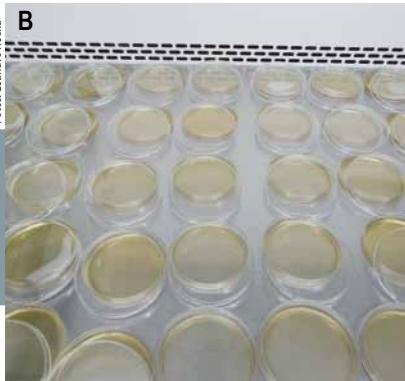


Figura 11. Distribuição de meio de cultura em câmara de fluxo laminar (A) e Placa de Petri semi-aberta com meio de cultura em fase de polimerização (B).

Diagnose de doenças de plantas

O diagnóstico de doenças em plantas deve ser verificado, inicialmente, pelos sinais dos patógenos presentes ou por fatores ambientais. A descrição sintomatológica das doenças de plantas e suas causas específicas, podem ser verificadas através de numerosas chaves de identificação publicadas em livros, compêndios, relatórios, etc., que ajudam a diagnosticar uma determinada doença (AGRIOS, 2007).

Algumas vezes, o sintoma na planta não é característico de nenhuma doença em particular e torna-se difícil de ser diagnosticado. A importância de um exame mais detalhado sobre a doença encontrada na planta ajuda a identificá-la, necessitando do conhecimento de outras informações, que possibilitem um melhor conhecimento da relação planta/hospedeiro/ambiente como: estágio de desenvolvimento em que se encontra a cultura e qual a prática cultural que foi empregada na plantação, sendo uma delas, o uso de defensivos agrícolas, podas e conhecimento

sobre as condições climáticas que a cultura esteve submetida.

As informações observadas do material doente, com ajuda de um microscópio estereoscópico, orienta a busca da estrutura do patógeno (sinais) para um diagnóstico afirmativo e preciso.

Na fitopatologia, ao encontrar-se uma planta infectada, cujos sintomas são desconhecidos ou não característicos, o primeiro passo é tentar isolar o organismo causador da enfermidade, tanto para fins de identificação como para determinação das características de desenvolvimento ou para estudos adicionais.

A importância para o sucesso do isolamento depende da seleção adequada do material vegetal infectado e, normalmente, a sua rápida utilização. Se o material infectado não for utilizado de imediato, este deve ser mantido sob refrigeração, armazenando-o a fim de conservá-lo por um tempo máximo de 30 dias. No isolamento de material

recentemente obtido, as primeiras 12 – 72 horas são especialmente críticas e, durante esse período, não se deve deixar de examinar as culturas em espaços não superiores a 15 horas.

Diagnóstico de doenças desconhecidas

Para estabelecer a relação causal entre uma doença e um micro-organismo deve-se confirmar o diagnóstico com os Postulados de Koch ou “Regras de Prova da Patogenicidade”. Postulado descrito por Robert Koch, em 1881, para patógenos humanos que foi adaptado à fitopatologia e, até os dias atuais, é amplamente empregado como um método clássico de comprovação para a diagnose de doenças de plantas (AMORIM; SALGADO, 1995).

Postulados de Koch ou Regras de prova da patogenicidade

A Associação constante Patógeno/Hospedeiro para um determinado micro-organismo deve estar presente em todas as plantas de uma mesma espécie que apresentam o mesmo sintoma. Em outras palavras, deve-se

poder associar sempre um determinado sintoma a um patógeno particular. No entanto, se o organismo encontrado parece ser o agente causal da doença, sem haver relatos anteriores que o confirmem, é necessário observar os passos abaixo para verificar a hipótese de que o patógeno isolado é realmente o agente causal da enfermidade.

- Associação constante – o patógeno tem que ser encontrado associado às plantas doentes examinadas, ou seja, ele é avaliado e identificado e caso não o seja de imediato, são realizadas as etapas a seguir;
- Isolamento do patógeno – o patógeno deve ser isolado e cultivado em cultura pura;
- Inoculação do patógeno e reprodução dos sintomas – o patógeno da cultura pura, deve ser inoculado em plantas sadias da mesma espécie ou da mesma variedade que apresentou os sintomas iniciais da doença e provocar a mesma sintomatologia observada anteriormente;

- Reisolamento do patógeno – o patógeno deve ser isolado em culturas puras submetidas à inoculação artificial.

As etapas citadas anteriormente, se forem todas cumpridas, o micro-organismo isolado pode ser considerado como o agente patogênico e responsável pelos sintomas observados na planta doente (AMORIM; SALGADO, 1995).

Os postulados de Koch exigem testes rigorosos com plantas adequadas, não inoculadas e não tratadas. E, em via de regra, é necessário repetir os experimentos para se estabelecer sua validade.

Isolamento de micro-organismos fitopatogênicos

Aspectos gerais

É essencial que o patógeno que se pretende isolar seja colocado em um novo ambiente que favoreça o seu desenvolvimento, superando seus concorrentes saprófitas. Esta etapa requerida se comprova com a segunda e

quarta regras dos postulados de Koch. Um isolamento bem sucedido de uma cultura depende, basicamente, da capacidade técnica em separar determinado organismo de outros.

Métodos básicos de isolamento

Para o isolamento são usadas diferentes técnicas, conforme a natureza do tecido afetado, o substrato e o estágio de desenvolvimento do patógeno (vegetativo ou reprodutivo), bem como do operador. E, segundo Alfenas et al., (2007), as técnicas básicas empregadas são de isolamento direto e isolamento indireto.

- **Isolamento direto**

O isolamento direto baseia-se na transferência direta do órgão infectado do patógeno com o auxílio de um estilete, diretamente para o meio de cultura. Se a pretensão do trabalho com os esporos presentes na amostra for estimular a esporulação do fungo, deve-se manter o material em câmara úmida (por um a três dias) a 25 °C.

O material exposto à luz contínua em câmara úmida irá favorecer a esporulação. A câmara úmida deve ser montada por placas de Petri fechadas ou bandejas envoltas por saco plástico transparente e conter papel de filtro ou algodão embebido com água e o isolado sobre o papel ou o algodão.

- **Vantagens do isolamento direto**

- Obter um organismo puro que esteja isento de contaminações de microorganismos saprófitas associados ao tecido infectado.
- Obter qual o organismo exato que está sendo transferido para o meio.
- Favorecer etapas de comparações entre as estruturas do organismo obtidas na superfície do hospedeiro e em cultura.

- **Procedimento para o isolamento direto**

- Focalizar as estruturas do patógeno (fragmentos) em lupa para ajudar a isolar;

- Flambar a lâmina de estilete;
 - Resfriar a ponta da lâmina, tocando-a levemente no meio de cultura;
 - Transferir o fragmento desejado para uma placa com o meio de cultura
 - Distribuir os fragmentos, sendo um no centro e três ao redor dele de forma equidistante;
 - Colocar a placa de Petri numa estufa de germinação tipo B.O.D até o aparecimento da colônia desejada;
 - Repicar a colônia para tubos com BDA inclinado.
- **Isolamento indireto**

O isolamento indireto baseia-se na técnica de transferência para um meio de cultura de porções infectadas de tecido hospedeiro ou amostras de solo e sementes infestadas em que não exista a evidência de estruturas do micro-organismo. Este método de isolamento indireto de um micro-organismo varia com o tipo de órgão

ou tecido infectado (órgão lenhoso ou carnosos, não-lenhoso ou não-carnosos) ou o substrato onde o organismo é recuperado. Porém, há casos em que o patógeno encontra-se internamente nos tecidos da planta sem produzir frutificações.

- Isolamento de fungos dos tecidos de órgãos lenhosos ou carnosos (tronco, raízes, galhos grossos e frutos)

Os micro-organismos que colonizam esses tecidos permitem que as suas estruturas atinjam as camadas de células mais profundas, exigindo maior cuidado na desinfecção dos tecidos e na retirada das partes mais superficiais que, geralmente, possuem micro-organismos contaminantes, permitindo a passagem para o meio de cultura apenas de fragmentos tissulares mais internos. Fragmentos desses tecidos são retirados, utilizando-se uma lâmina de estilete previamente flambada, da região limite entre o tecido doente e o

tecido sadio, os quais são depositados em meios de cultura para crescimento.

- Isolamento de fungos dos tecidos de órgãos não-lenhosos ou não-carnosos (folhas, ramos, finos, radículas)

No laboratório de fitopatologia a técnica mais usada é o isolamento indireto. Essa técnica encontra-se descrita no procedimento operacional padrão, POP 014.2.4.06.3.012, intitulado Isolamento, incubação e repicagem de micro-organismos fitopatogênicos (EMBRAPA, 2011b).

- **Procedimento para o isolamento indireto**
 - Retirar fragmentos de tecidos da região limítrofe entre a área lesionada e a área sadia porque é aí que o patógeno se encontra em maior atividade. Áreas necróticas, no centro das lesões, normalmente contêm alta população de saprófitas e devem ser evitadas (Figura 12);



Fotos: Hermes Peixoto Santos Filho

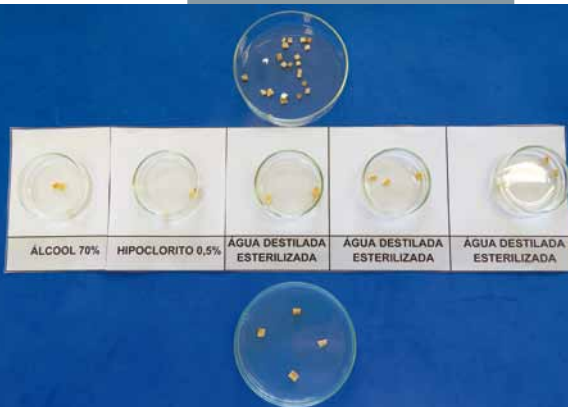
Figura 12. Lesão causada por doença e no detalhe região limítrofe da área lesionada e sadia de onde devem ser retirados os fragmentos para isolamento.

- Colocar os fragmentos com ajuda de uma pinça em béquer com álcool a 70% por 2 minutos (Figura 13);
- Passar para outro béquer com hipoclorito de sódio a 0,5% por 2 minutos (Figura 13);

- O próximo passo é a lavagem dos fragmentos com água destilada estéril por três vezes (Figura 13);
- Em seguida, transferir o fragmento para um papel de filtro, dobrá-lo e levá-lo para a câmara de fluxo laminar. Com o auxílio de uma pinça, colocar pelo menos três fragmentos em forma de um triângulo na placa de Petri, previamente pronta com o meio de cultura BDA (Figura13);

Figura 13. Sequência das etapas de preparo de uma amostra, com sintomas de doenças, para posterior isolamento em meio de cultura.

Foto: Leandro Rocha



- Flambar as placas de Petri e fechá-las com filme PVC;
- Incubar a(s) placa(s) de Petri com os fragmentos em uma estufa de germinação tipo B.O.D. com fotoperíodo de 12 horas, de cinco a sete dias, a 25 °C;
- Observar se ocorreu a formação de colônias de bactérias ou micélio de fungos a partir dos fragmentos repicados para placa de Petri;
- Transferir para outra placa de Petri com meio de cultura BDA e seguir as etapas subsequentes à quinta etapa, descrita no procedimento de isolamento;
- Após formar uma cultura pura de microorganismos fitopatogênicos, a mesma é identificada por microscopia ótica.
- Os antibióticos bactericidas têm sido empregados no isolamento seletivo de fungos do solo e de material contaminado. A grande maioria das bactérias é sensível a esses produtos, muito embora, nenhum antibiótico seja eficaz contra

todas. É importante que os antibióticos sejam solúveis e estáveis no meio e atóxico para os organismos a serem desenvolvidos na cultura.

No isolamento de rotina, normalmente, usa-se uma mistura de antibióticos, quase sempre estreptomicina, clorotetraciclina ou neomicina, embora a presença isolada de estreptomicina iniba o desenvolvimento da maioria das espécies de bactérias, sem afetar a maioria dos fungos. O rosa bengala atua também como inibidor do crescimento de bactérias e inibe ou retarda o desenvolvimento de inúmeros fungos.

Métodos de inoculação de micro-organismos patogênicos

A Inoculação permite, artificialmente, tornar uma planta sadia em uma planta doente. Este procedimento faz parte da terceira regra do Postulado de Koch que comprova a

patogenicidade de um dado micro-organismo (ALFENAS; FERREIRA, 2007). Qualquer porção de patógeno, potencialmente capaz de iniciar a doença, é conhecida como inóculo

Propósito da inoculação artificial

- Evidenciar a patogenicidade do organismo isolado em cultura pura com um determinado patógeno, como sendo o agente causal da doença;
- Verificar a resistência de uma determinada planta à doença e quais fatores físicos e químicos que favorecem a infecção;
- Estudar o ciclo de vida de determinados patógenos;
- Avaliar concentrações no estudo do patógeno quanto ao índice da doença.

Métodos de inoculação

Alguns métodos de inoculação apresentados são baseados no tipo de inóculo usado e no órgão da planta a ser inoculada (ALFENAS et al, 2007).

- **Esporos a seco como inóculo**

É uma técnica de inoculação muito empregada em alguns parasitas obrigatórios ou biotróficos, como agentes causais da ferrugem da goiabeira (*Puccinia psidii*) e da oídiose da mangueira (*Oidium mangiferae*), que não crescem em meio de cultura e cujas fontes de inóculo devem consistir de plantas infectadas pelo próprio patógeno. A inoculação destes fungos é feita com a atomização de esporos a seco ou imersos em água destilada esterilizada, sobre as superfícies a serem inoculadas.

- **Suspensão de esporos ou de micélio triturado como inóculo**

É uma técnica muito empregada em inoculações de folhas, inflorescências e frutos. O uso de suspensão de esporos ou de micélio triturado está ligado à capacidade de esporulação do patógeno em cultura.

- **Para fungos não cultiváveis em meios de cultura**

- Realizar a coleta dos esporos nos órgãos do hospedeiro com abundante esporulação
- Passar um pincel sobre as áreas esporuladas ou raspar com um escalpelo e recolher os esporos em um béquer com água destilada ou, ainda, efetuar a imersão e agitação das lesões esporuladas diretamente no béquer com água e mediante o uso de um coletor de esporos apropriado acoplado a uma bomba de vácuo.

- **Para fungos cultiváveis em meios de cultura**

No emprego da inoculação de parasitas facultativos (cultiváveis em meio de cultura artificial), o inóculo deve consistir de uma suspensão de esporos ou de micélio triturado em água destilada e esterilizada. O uso de suspensão de esporos como inóculo deve permitir a padronização da quantidade

de inóculo (n° de esporos/ mL) com maior precisão do que a de micélio triturado.

A inoculação requer cuidados que devem ser seguidos, baseados no procedimento operacional padrão, intitulado Inoculação de fungos fitopatogênicos, POP 014.2.4.06.3.006, que se encontra no laboratório de fitopatologia (EMBRAPA, 2009).

Procedimento de Inoculação de fungos fitopatogênicos

- Isolar em meio de cultura específico.
- Após o fungo crescer em meio de cultura, raspar a superfície do meio contendo esporos e recolher em béquer.
- Acrescentar ao béquer aproximadamente 20 mL de água destilada.
- Filtrar essa suspensão em funil com camada dupla de gaze, para retenção dos fragmentos miceliais e detritos do meio de cultura ou da folha.
- Adicionar 2 gotas de Tween 20 à suspensão, a fim de evitar o agrupamento

de esporos. Homogeneizar bem a suspensão antes de efetuar o ajuste da concentração de esporos.

- Padronizar a suspensão em 10^n esporos/mL, de acordo com a especificidade de cada fungo que se deseja inocular, depositando uma alíquota da suspensão homogeneizada na câmara de contagem do Hemacitômetro de Neubauer,
- Efetuar a contagem, no microscópio ótico, utilizando um aumento de 100 vezes e registrar, com o auxílio de um contador manual, o número de esporos presentes nos cinco Quadrados Secundários (Q.S.) uniformemente distribuídos nos retículos do hemacitômetro (Figura 14).
- Ajustar, com água destilada, a suspensão, até obter a concentração de 10^n esporos/ml de acordo com a especificidade do fungo que se deseja inocular.
- Pulverizar a área a ser inoculada até o ponto de escorrimento da suspensão de esporos.

- Manter as plantas inoculadas em câmara úmida por um período de 24 horas, para favorecer a germinação dos esporos e penetração do fungo nos tecidos foliares.

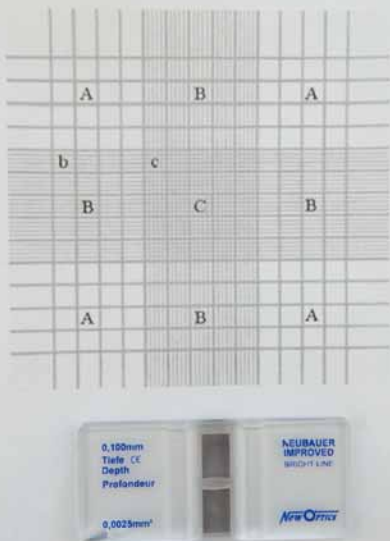


Foto: Leandro Rocha

Figura 14. Câmara de Neubauer ou Hemacitômetro.

Cálculo da concentração do inóculo

Segundo Alfenas et al. (2007) o cálculo da concentração de inóculo é feito mediante o número de estruturas infectivas por mililitro (mL) de suspensão e usam-se, geralmente, as concentrações de 10^3 a 10^6 esporos / mL. A contagem dos esporos é usualmente estimada com o uso de uma lâmina especial, denominada Hemacitômetro ou câmara de Neubauer (Figura 14) ou por meio de um contador automático de esporos. Consultar o procedimento operacional padrão (POP) 014.2.4.06.3.006 de Inoculação de fungos fitopatogênicos em mamoeiro, (EMBRAPA, 2009).

O Hemacitômetro possui as seguintes divisões: Dimensões de cada compartimento de contagem: Q. P. (Quadrado Principal) = 1,0 mm em cada lado. Q. S. (Quadrado Secundário) = 0,2 mm em cada lado. A imagem apresenta cinco Q.P. (A, B, C, D e E). O Q.P. central (E) está subdividido em 25 Q.S.

A concentração de esporos por mililitro (mL) é determinada através da contagem dos esporos em cinco Quadrados Secundários (Q.S.) uniformemente distribuídos nos retículos do hemacitômetro tipo Neubauer. A média das cinco contagens é aplicada na fórmula abaixo para a obtenção da concentração total de esporos na solução, especificando-se a concentração para os esporos do fungo desejado.

Número de esporos totais na solução = número médio de esporos no retículo central x $2,5 \times 10^5$

A concentração da suspensão de esporos é ajustada em água destilada até a obtenção da concentração de 10^6 esporos/mL, utilizando-se a fórmula:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

C_1 = concentração inicial de esporos obtidos a partir da contagem em câmara de Neubauer;

V_1 = volume inicial da suspensão de esporos;

C_2 = concentração desejada de esporos;

V_2 = volume final a ser adicionado para ajustar a concentração desejada.

Comparam-se os valores obtidos na contagem dos esporos em cinco subcompartimentos ou quadrados secundários (Q.S.) do retículo central do hemacitômetro. A soma obtida deve ser multiplicada por 50.000. (Soma de cinco Q.S. x 50.000 = número de esporos/mL). Para a obtenção da suspensão calibrada em 10^6 , essa soma deve atingir o mínimo de 20 esporos, isto é, uma média de quatro esporos por Q.S.

No caso de usar suspensão de micélio triturado, o inóculo deve ser preparado da seguinte maneira:

- Triturar em um homogeneizador do tipo Polytron ou similar, certa quantidade de micélio ou certo número de colônias do patógeno em cultura, em um dado volume de água destilada;
- A suspensão de inóculo (suspensão de esporos ou de micélio triturado) deve ser atomizada sobre o(s) órgão(s) a ser(em) inoculado(s).

Suspensão de inóculo injetada no caule

As suspensões de inóculo (esporos ou micélio triturado) desejadas, devem ser injetadas no caule de mudas podendo ser empregado para patógenos que causam murchas vasculares, como *Fusarium oxysporum* em maracujá. A técnica é bastante usada para *Ceratocystis fimbriata* que infecta vários hospedeiros como a mangueira, a batata-doce, o inhame, entre outros. Antes de iniciar a inoculação, fazer um corte transversal no caule (1,0 a 2,0 cm de comprimento), por onde o inóculo deve ser injetado com o auxílio de uma seringa ou micropipeta. A área inoculada é recoberta com fita adesiva. O sintoma deve ser expresso de acordo com a agressividade e virulência do patógeno e o nível de resistência/suscetibilidade do hospedeiro, mas, em geral, no intervalo de 7 a 30 dias as plantas inoculadas manifestam sintomas de murcha e/ou descoloração vascular.

Inoculação com cilindros ou cubos de cultivos artificiais contendo micélio do patógeno

A técnica de inoculação com cilindros baseia-se em colocar sobre o órgão da planta a ser inoculado, cilindros (discos) ou cubos de cultivo artificial contendo micélio do patógeno com ou sem estruturas reprodutivas. A seguir, a planta toda ou apenas o órgão inoculado deve ser mantida em câmara úmida. Esta técnica pode ser usada para inoculações de fungos em quaisquer órgãos da planta. No caso de inoculações em folhas, inflorescência e frutos, o patógeno deve ser cultivado em meios à base de ágar. No caso de inoculações em órgãos lenhosos (tronco e raiz) o inóculo consistirá de cilindros ou cubos de casca ou pedaços de galhos finos, previamente colonizados pelo patógeno em laboratório.

No caso de cilindros ou cubos de culturas do patógeno, seguir os seguintes passos:

- Usar o meio de cultura BDA ou malte-ágar contendo o patógeno a inocular;

- Dois a três centímetros abaixo do ponto de inoculação, deve-se colocar uma mecha de algodão embebido em água;
- Recobrir toda essa área com uma bandagem plástica, a fim de oferecer condições de câmara úmida favoráveis à infecção.
- A câmara úmida deve ser removida entre 28 e 30 dias após a inoculação, e entre 5 a 6 meses da inoculação os resultados devem ser avaliados, devendo-se medir o comprimento e a largura da lesão em nível da casca e do lenho.

Infestação de solo e inoculação de raízes

As maneiras básicas de infestação do solo com o patógeno são duas:

- A suspensão de inóculo (esporos, clamidósporos, escleródios, microescleródios ou micélio triturado) deve ser vertida sobre certa quantidade de solo necessária para formar camadas superficiais de até 4,0 cm de espessura em sementeiras ou recipientes. O resultado satisfatório da

inoculação depende da capacidade competitiva do patógeno com a microbiota, temperatura e umidade do solo ou substrato. Após verter o inóculo, incorporar a porção de solo e, a seguir, misturar solo-inóculo e espalhar sobre a sementeira ou recipiente. Posteriormente, fazer o plantio ou semeadura do hospedeiro.

- Verter o inóculo em solo que já tenha o hospedeiro. Em seguida, fazer a escarificação superficial do solo para facilitar a incorporação do inóculo. Nesse caso, avaliar o tombamento de pós-emergência.

A inoculação de raízes com suspensão de inóculo pode ser feita também de duas maneiras:

- Com a planta no local – Retirar o solo que recobre as raízes e verter sobre elas a suspensão. Em seguida, voltar com o solo, recobrando-as.
- Com a planta arrancada – As mudas devem ser arrancadas, lavadas em água corrente e imersas na suspensão de inóculo

dentro de um recipiente durante um tempo variável, a ser determinado por experimentação prévia. Após imersão, as mudas devem ser replantadas.

Exame microscópico

O microscópio óptico de luz (Figura 15) é um equipamento cuja finalidade é produzir uma imagem ampliada e detalhada de alta resolução de organismos microscópicos que não possa ser detectada pelo olho humano. Em certas situações, em observações de cortes histológicos, o equipamento permite a visualização de estruturas fúngicas no interior do tecido vegetativo (como hifas vegetativas, vesículas e outros) de maneira a estudar a interação fungo-planta e identificar os patógenos isolados (PEREIRA; PEREIRA, 2007).

O microscópio é um equipamento de precisão, construído utilizando-se propriedades físicas e funciona com um conjunto de lentes (ocular e objetiva) que ampliam a imagem



Foto: Leandro Rocha

Figura 15.
Microscópio óptico

transpassada por um feixe de luz, correspondendo às dimensões da imagem e do objeto, a distâncias existentes entre a lente e o ponto de onde se forma a imagem e entre a lente e o ponto de onde se encontra o objeto.

No laboratório de fitopatologia o uso da técnica de microscopia óptica é amplamente utilizada como a etapa final de identificação

dos micro-organismos patogênicos. Para a utilização do microscópio óptico, o usuário deve ser treinado por pessoal capacitado e somente quando considerado apto, poderá utilizar o mesmo. O manuseio e cuidados com o microscópio óptico devem ser consultados no laboratório em forma de um procedimento operacional padrão, POP 014.2.4.06.4.001, intitulado “Procedimento de operação de microscopia” (EMBRAPA, 2011c).

Procedimento de operação de microscópio

A Figura 16 mostra o diagrama do microscópio óptico detalhando as suas partes componentes para auxiliar o usuário na sua utilização, de acordo com os itens de procedimento a seguir:

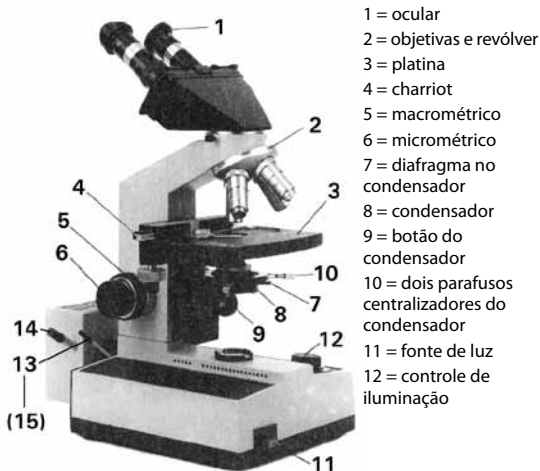
- Levantar o tubo com o ajuste macrométrico, girando-o em sentido anti-horário, até que as objetivas estejam distantes da platina (base das lâminas);
- Caso não esteja devidamente colocada para a primeira observação, colocar a ob-

- jetiva de 4X na posição de uso (sempre começar com a lente de menor aumento);
- Colocar a lâmina com o espécime a ser observado sobre a platina, de modo que o espécime localize-se no centro da abertura da platina, fixando-a com a pinça da platina;
 - Ligar a lâmpada do aparelho na chave situada na parte frontal da base do microscópio e regular a intensidade de luz, com auxílio do diafragma situado abaixo da platina. Caso seja necessário maior intensidade de luz, ligar a lâmpada auxiliar na chave localizada no lado direito da base do microscópio e, com auxílio do botão deslizante situado à frente da referida chave, regular a intensidade da luz;
 - Observando lateralmente, empregar o ajuste macrométrico para levar a objetiva de menor aumento (4X) até cerca de 5,0 mm da lâmina;
 - Olhar pelas duas oculares, com os dois

olhos abertos. Vagarosamente, regular (levantando ou abaixando) o tubo do microscópio, com auxílio do ajuste macrométrico, até que o espécime na lâmina entre em foco;

- Realizar um ajuste fino do foco, com auxílio do ajuste micrométrico;
- Movimentar a platina com auxílio dos botões de deslocamento, até selecionar uma área desejável para estudo detalhado;
- Selecionar uma lente objetiva que possibilite o estudo do espécime, girando a objetiva, sem pular lentes, e regulando o foco com o ajuste micrométrico;
- Atentar para o fato de que a lente de 100X é uma lente de imersão a óleo e, portanto, não deve ser utilizada sem o referido óleo aplicado sobre a lamínula;
- Após o estudo do espécime, retornar à objetiva de menor aumento (4X) e levantar o tubo do microscópio com o ajuste macrométrico;

- Reduzir a intensidade da luz e desligar a fonte de luz. Retirar a lâmina da platina. Cobrir com as tampas correspondentes as oculares e a fonte de luz. Retirar a tomada da fonte de força e cobrir o equipamento com a capa protetora.



Fonte: POP 014.2.4.06.3.012
 (EMBRAPA MANDIOCA E
 FRUTICULTURA. 2011D).

Figura 16. Microscópio óptico e diagrama do equipamento.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant Disease Epidemiology. California, Academic Press, **Plant Pathology**, v. 5, 2005. p. 266-289.
- ALFENAS, A. C. ; MAFIA, R. G. Isolamento de Fungos Fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Lavras: UFV, 2007. p. 53-90.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A. Inoculação de Fungos Fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R.G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p. 117-137.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G. Produção, Determinação e Calibração da Concentração de Inóculo em Suspensão. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p. 103-116.
- AMORIM, L.; SALGADO, C. L. Diagnose. In: BERGAMIN FILHO, K. H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 1995. p. 224-232.
- BEDENDO, I. P. Ambiente e doença. In: BERGAMIN FILHO, K. H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 1995. p. 331-341.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. Importância das doenças de plantas. In: BERGAMIN FILHO, K., H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**, 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, , 1995. p. 13-33.

BIOSSEGURANÇA em laboratórios biomédicos e de microbiologia. 3. ed. rev. e atual. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2004. p. 29-64. (Série A. normas e manuais técnicos).

BRASIL. Decreto nº 5.759, de 17 de abril de 2006. Promulga o texto aprovado na 29 Conferência Internacional de Proteção de Plantas da FAO. **Presidência da República Federativa do Brasil**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004_2006>. Acesso em: 05 jun. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Meios de cultura em microbiologia**, Rio de Janeiro, 119 p., 1954. (Serviço de Informação Agrícola. Série didática n. 14),

BRASIL. Portaria nº 267, de 07 de junho de 2010. Credencia o Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura para realizar análises na Área de Diagnóstico Fitossanitário em amostras oriundas do controle oficial e programas específicos do MAPA, através do Art. 1º. Diário Oficial [da] **República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 09 jun. 2010, n. 108, Seção 1, p.3.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA.
Procedimento Operacional Padrão (POP)
014.2.4.06.3.006, **Inoculação de fungos fitopatogênicos em mamoeiro**. Cruz das Almas, 2009. 5 p. rev.00.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA.
Procedimento Operacional Padrão (POP)
014.2.4.06.3.003, **Procedimento técnico** para rotulagem de reagentes soluções e resíduos. Cruz das Almas, 2010a. 10 p. rev.00.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA.
Procedimento Operacional Padrão (POP)
014.2.4.06.3.012. **Preparo de meio de cultura em Bata Dextrose e Ágar**. Cruz das Almas, 2010b. 4 p.rev.01.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA.
Procedimento Operacional Padrão (POP)
014.2.4.06.4.006. **Procedimento de operação de Forno Pasteur**. Cruz das Almas, 2011a. 5 p. rev.01.

_____. Procedimento Operacional Padrão (POP)
014.2.4.06.3.012, **Isolamento, incubação**, e repicagem de micro-organismos fitopatogênicos. Cruz das Almas, 2011b. 4 p.rev.00,

_____. Procedimento Operacional Padrão (POP)
014.2.4.06.4.001. **Procedimento de operação de Microscópio**, 2011c. 5 p. rev.01.

_____. Procedimento Operacional Padrão (POP) 014.2.4.06.4.004. **Procedimento de operação de balança**, 2012a. 5 p. rev. 02.

_____. Procedimento Operacional Padrão (POP) 014.2.4.06.4.003. **Procedimento para operação da autoclave vertical**, 2012B. 7 p. rev. 02.

_____. Procedimento Operacional Padrão (POP) 014.2.4.06.4.005, **Procedimento de operação da Câmara de Fluxo laminar Pasteur**, rev. 02. 2012c. 8 p.

_____. Procedimento Operacional Padrão (POP) 014.2.4.06.4.002, **Procedimento de operação da Estufa de Germinação tipo B.O.D.**, 02. 2012d. 9 p. rev.

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO. Princípios gerais de controle. In: BERGAMIN FILHO, K.; H. AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 692-709.

MANUAL de manutenção para equipo de laboratório. Washington: OPS, 2005. p. 61-83.

MANUAL de segurança biológica em laboratório. 3. ed. Genebra: OMS, 2004. p. 87-99.

PEREIRA, O. L. ; PEREIRA, J. F. Microscopia e suas Aplicações no Estudo das Interações Fungo-Planta. In: ALFENAS, A. C. ; MAFIA, R. G. (Ed.).

Métodos em Fitopatologia. Lavras: UFV, 2007. p. 221-252.

SALGADO, C. L. ; AMORIM, L. Sintomatologia. In: BERGAMIN FILHO; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia.** 3. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 212-223.

ZAUZA, E. A. V, ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia.** Lavras: UFV, 2007. p. 23-51.

Outros lançamentos:

- Controle alternativo de doenças do mamoeiro.
- Controle alternativo das doenças dos Citros.

Esta publicação está disponível no site da Unidade e em exemplares impressos.

Feedback
do Produtor
e Consumidor



Questionário de Opinião

Entre em contato com nossa equipe pelo link www.embrapa.br/fale-conosco, indique o número do CGPE, que se encontra no fundo da capa e responda as seguintes questões:
Queremos saber sua opinião.

1. Esta publicação contém informações que ajudaram na sua atividade?
() Sim () Não () em parte Sugestões: _____
2. Qual tema você gostaria que fosse abordado numa próxima publicação?

Visite nossa página na internet:
www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/

Embrapa

Mandioca e Fruticultura

Embrapa

Mandioca e Fruticultura



Foto: Hermes Peixoto Santos Filho

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE 13041