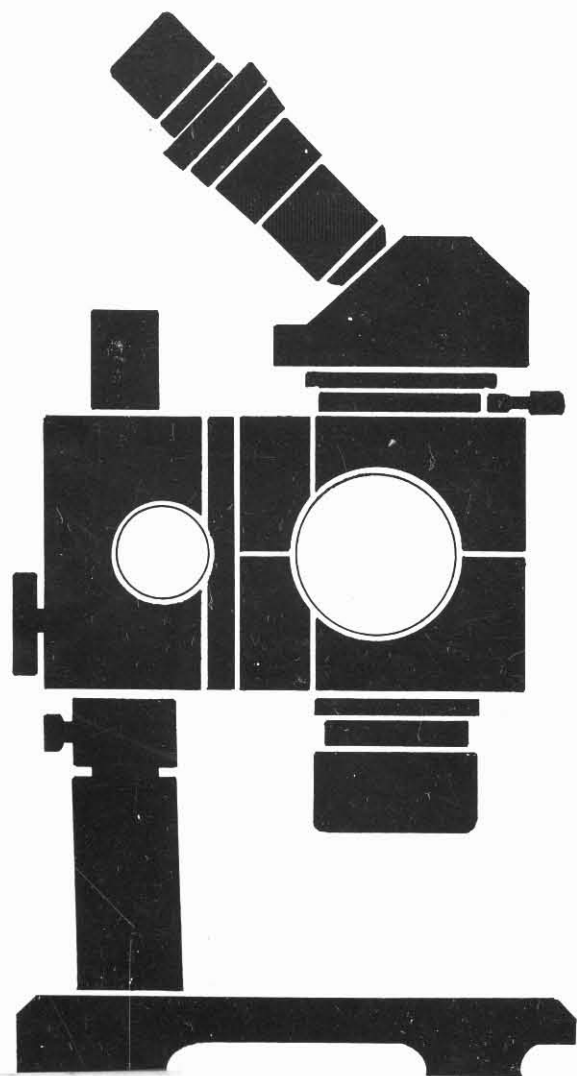


EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA
vinculada ao Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da reforma Agrária
Centro Nacional de Pesquisa de Trigo - CNPT
Passo Fundo, RS
Brasil

 **CANADIAN INTERNATIONAL DEVELOPMENT AGENCY - CIDA**
Agriculture Canada
Swift Current Research Station
Swift Current, Saskatchewan
Canada



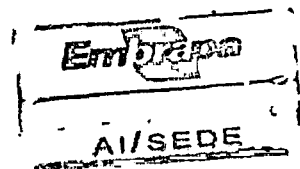
Manual para

LABORATÓRIO

de

FITOPATOLOGIA

Centro Nacional de Pesquisa de Trigo
Passo Fundo, RS
1993



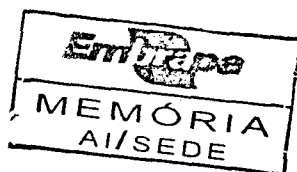
ISSN 0101-6644



EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA
Vinculada ao Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da
Reforma Agrária
Centro Nacional de Pesquisa de Trigo - CNPT
Passo Fundo, RS
Brasil



CANADIAN INTERNATIONAL DEVELOPMENT AGENCY - CIDA
Agriculture Canada
Swift Current Research Station
Swift Current, Saskatchewan
Canada



MANUAL PARA LABORATÓRIO DE FITOPATOLOGIA

Myriam Rosa Fernandez

Centro Nacional de Pesquisa de Trigo
Passo Fundo, RS
1993

EMBRAPA-CNPT. Documentos, 6

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

EMBRAPA-CNPT

Rodovia BR 285, km 174

Fone: (054) 312-3444

Fax: (054) 312-3495

Telex: 54-5319

Caixa Postal 569

99001-970 - Passo Fundo, RS

Tiragem: 500 exemplares

Comitê de Publicações do CNPT:

Sírio Wiethölter (Presidente)

José Maurício Cunha Fernandes

José Roberto Salvadori

João Carlos Soares Moreira

Júlio César Barreneche Lhamby

Walesca Iruzum Linhares

Tratamento Editorial: Fátima Maria De Marchi

Desenhos: Liciane Toazza Duda Bonatto

Revisão de português: Dulci Staggemeier

Versão inglês-português: Clóvis Lopes de Campos

Unidade:	di-Sede
Valor aquisição:	
Data aquisição:	
N.º N. Fiscal/Fatura:	
Fornecedor:	
N.º OC:	
Origem:	Porto
N.º Registro:	01273/08

FERNANDEZ, M.R. Manual para laboratório de fitopatologia. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993. 128p. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 6).

1. Técnicas de laboratório-Fitopatologia.
I. Título. II. Série.

CDD 632

APRESENTAÇÃO

O presente manual para laboratório de fitopatologia foi preparado pela Dra. Myriam Rosa Fernandez, com a significativa contribuição e com o apoio de pesquisadores e de auxiliares do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo-CNPT, notadamente da Área de Fitopatologia, no decorrer do Projeto Cooperativo de Pesquisa em Plantio Direto/"Zero-Tillage Project", sobre manejo conservacionista de solo no sul do Brasil, financiado pela Agência Canadense para o Desenvolvimento Internacional-CIDA/Ministério da Agricultura do Canadá. De maio de 1988 a maio de 1990, a Dra. Fernandez atuou junto à equipe de pesquisadores do CNPT, e, durante este período, desenvolveu atividades de pesquisa em doenças de plantas associadas às práticas de manejo conservacionista do solo. Atualmente, a referida pesquisadora encontra-se trabalhando como fitopatóloga no Ministério da Agricultura do Canadá, na Estação Experimental de Swift Current, em Saskatchewan.

Euclides Minella
Chefe do CNPT

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	9
OBJETIVOS DA FITOPATOLOGIA	10
MANUTENÇÃO BÁSICA DO LABORATÓRIO	11
SEGURANÇA NO LABORATÓRIO	12
ESTERILIZAÇÃO - EXIGÊNCIA BÁSICA PARA O TRABALHO COM MICROORGANISMOS	14
Estabelecimento de condições assépticas	14
Métodos de esterilização	15
(1) <i>Desinfestantes líquidos e suas utilidades</i>	16
(2) <i>Autoclave</i>	16
(3) <i>Ar seco aquecido</i>	18
(4) <i>Esterilização a gás</i>	18
(5) <i>Esterilização de líquidos por filtração</i>	18
(6) <i>Filtros de ar</i>	18
TIPOS DE MEIOS DE CULTURA	19
PREPARO DE MEIOS DE CULTURA	22
PREPARO DE CULTURAS DE FUNGOS E DE BACTÉRIAS	26
CONDIÇÕES PARA CRESCIMENTO DE PATÓGENOS	29
Fungos	29
<i>Temperatura</i>	29
<i>Luz</i>	29
Bactérias	32
Incubadoras	32
ISOLAMENTO DE FUNGOS E DE BACTÉRIAS DE TECIDO VEGETAL INFECTADO	33
Aspectos gerais	33
Métodos de isolamento	34
(1) <i>Indução de crescimento do micélio</i>	35
(2) <i>Esporulação induzida</i>	37
(3) <i>Isolamento direto</i>	38
(4) <i>Técnicas de diluição</i>	38
(5) <i>Isca</i>	41
(6) <i>Inoculação do hospedeiro</i>	41

Isolamento de patógenos do solo	41
(1) <i>Método de plaqueamento</i>	41
(2) <i>Método de diluição</i>	42
(3) <i>Método de armadilha ou de isca</i>	42
DESCONTAMINAÇÃO DE CULTURAS	43
Aspectos gerais	43
Métodos mecânicos	43
<i>Método de estria em placa</i>	43
<i>Método de diluição</i>	46
<i>Método de inversão do ágar</i>	46
Métodos químicos	46
Ácaros	46
ISOLAMENTO MONOSPÓRICO	48
POSTULADOS DE KOCH OU REGRAS DE PROVA DA PATOGENICIDADE	49
TÉCNICAS PARA A INOCULAÇÃO DE PLANTAS	50
Preparo do inóculo de fungos e de bactérias	50
Preparo da suspensão de inóculo e estimativa de sua concentração (densidade do inóculo)	51
Inoculação de folhas e de colmos com fungos e com bactérias	53
Inoculação de plantas com patógenos de raízes e do solo	55
Ambientes controlados	55
COLETA E PRESERVAÇÃO DE PLANTAS INFECTADAS	56
MANUTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE CULTURAS	57
Fungos	57
<i>Culturas de ágar em temperatura ambiente ou em refrigerador</i>	57
<i>Métodos para períodos prolongados</i>	58
(1) Discos de ágar em água esterilizada fria	59
(2) Conservação de culturas em meios em tubos de ensaio com o uso de óleo.....	59
(3) Cultura desidratada	59
(4) Conservação em palha ou em grãos esterilizados	60
(5) Conservação de culturas em solo ou em areia esterilizados ...	60
(6) Liofilização ou secagem a frio	60
Bactérias	61
PARASITAS OBRIGATÓRIOS - FUNGOS CAUSADORES DE FERRUGENS	62

Aspectos gerais	89
Fungos	90
<i>Identificação e classificação de esporos</i>	91
<i>Sintomas causados pelos fungos patogênicos nas plantas hospedeiras</i> ..	94
Bactérias	96
<i>Classificação e identificação de bactérias</i>	97
<i>Sintomas causados pelas bactérias fitopatogênicas</i>	100
APÊNDICES	101
APÊNDICE 1	103
Instrumentos e equipamentos mais comumente usados num laboratório de Fito- patologia	103
APÊNDICE 2	107
Fórmulas de meios de cultura	107
APÊNDICE 3	115
O pH e sua determinação	115
GLOSSÁRIO	117
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	128

Aspectos gerais	62
Coleta de uredosporos	62
(1) <i>Manutenção em folha seca</i>	62
(2) <i>Remoção de uredosporos por batida da folha</i>	62
(3) <i>Sucção</i>	63
Preservação de uredosporos	63
Multiplicação do inóculo dos fungos causadores de ferrugem	63
Inoculação de plantas com os fungos causadores de ferrugem	64
(1) <i>Atomização de suspensão de esporos</i>	64
(2) <i>Inoculação com espátula ou com espátula-lâmina</i>	64
(3) <i>Inoculação com cotonete</i>	65
(4) <i>Inoculação por imersão</i>	65
(5) <i>Inoculação pelo esfregamento de folhas</i>	65
(6) <i>Inoculação com pincel</i>	65
EXAME MICROSCÓPICO	66
Aspectos gerais	66
Técnica de cultura em lâminas	66
MONTAGEM E COLORAÇÃO DE MICROORGANISMOS PARA EXAME MICROSCÓPICO	69
Fungos	69
<i>Soluções para montagem e coloração</i>	70
<i>Montagens permanentes</i>	72
Bactérias	73
<i>Algumas soluções corantes</i>	73
EXAME DA RELAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO COM MICROSCOPIA ILUMINADA	76
Cortes à mão livre	76
<i>Coloração dos cortes à mão livre</i>	78
Montagens inteiras	78
<i>Cloral hidratado</i>	79
<i>Lactofenol</i>	79
MICROSCOPIA	80
Microscópio de dissecação ou lupa	80
Microscópio composto	80
<i>Ajuste do microscópio para iluminação de Köhler</i>	82
<i>Tipos de microscópios de luz</i>	87
CLASSIFICAÇÃO DOS MICROORGANISMOS	89

INTRODUÇÃO

Este manual de práticas de laboratório foi preparado buscando auxiliar as pessoas que trabalham em laboratórios de Fitopatologia. São apresentadas as técnicas básicas de laboratório relativas aos patógenos fúngicos e bacterianos. O objetivo de sua elaboração foi o de sistematizar informações, proporcionando uma melhor compreensão dos motivos que determinam a aplicação de cada uma das técnicas mais freqüentemente usadas num laboratório de Fitopatologia.

Objetiva-se, também, levar aos laboratoristas com prática, e aos iniciantes, conhecimentos que os capacitem a adaptar - ao seu caso particular - qualquer um dos procedimentos aqui apresentados, bem como orientá-los na adoção de técnicas mais avançadas.

OBJETIVOS DA FITOPATOLOGIA

A Fitopatologia estuda as doenças das plantas, os organismos que as causam, as condições ambientais necessárias para que haja a infecção, os mecanismos pelos quais aqueles patógenos provocam as epidemias, as perdas no rendimento e os métodos de prevenção e controle das enfermidades. Para conseguir isso, a Fitopatologia se vale dos conhecimentos básicos de outros ramos da ciência, tais como a Anatomia e a Fisiologia Vegetal, a Microbiologia, a Ecologia etc.

MANUTENÇÃO BÁSICA DO LABORATÓRIO

- (1) Os balcões e o equipamento do laboratório devem ser mantidos sempre sem pó.
- (2) Antes e depois de utilizar uma área do balcão, esta deve ser lavada com álcool ou com outro desinfestante.
- (3) A vidraria deve ser lavada com escova e com detergente, enxaguada várias vezes com água corrente da torneira, três vezes com água destilada e posta para secar à temperatura ambiente ou num forno. A vidraria seca deve ser mantida num ambiente livre de pó. Os vidros, de preferência, devem ter a abertura coberta com papel alumínio, até serem reutilizados. A lavagem inadequada pode provocar problemas como, por exemplo, resíduos de certos detergentes atuando como bactericidas. Se a limpeza for difícil, usar uma solução especial, como a sulfocrômica (dicromato de sódio e ácido sulfúrico).
- (4) Os frascos com soluções devem ser adequadamente rotulados, constando a data de preparo da solução.
- (5) O estoque de material rotineiramente utilizado, como papel-toalha, água destilada, álcool e outros desinfestantes, deve ser verificado diariamente. Os recipientes com água destilada devem ser limpos com periodicidade.
- (6) O funcionamento adequado das estufas e dos fitotrons (luz, temperatura etc.), destiladores e outros deve ser examinado diariamente.
- (7) Os produtos químicos e as substâncias tóxicas devem encontrar-se sempre armazenados em condições de segurança.

SEGURANÇA NO LABORATÓRIO

A segurança no laboratório exige o mesmo tipo de atenção contínua que se dedica à pesquisa. Cada pessoa tem a responsabilidade de conhecer os riscos à saúde e à segurança relacionados com o manuseio dos produtos químicos que utiliza, além dos riscos envolvidos com os equipamentos e as técnicas que está empregando, de modo que possa estabelecer disposições e procedimentos que diminuam a ocorrência de acidentes e que, quando estes ocorram, limitem os seus efeitos e previnam a sua repetição.

O uso de técnicas, de produtos químicos e de equipamentos novos ou diferentes, exige a leitura cuidadosa das instruções. Cada empregado deve conhecer, também, a localização das caixas de primeiros socorros, dos colírios e dos chuveiros de emergência, para uso imediato em caso de acidente.

O supervisor tem a responsabilidade de transmitir todas as instruções necessárias, inclusive as medidas de segurança a serem observadas, além de verificar a execução das tarefas pelos funcionários.

A instituição, da qual o laboratório faz parte, tem a responsabilidade de fornecer as instalações, os equipamentos e prover a sua manutenção, proporcionando um ambiente de trabalho seguro.

Alguns riscos à segurança encontrados nos laboratórios são:

(1) Radiação ultravioleta - a exposição pode causar câncer de pele e dano ocular. Pode-se prevenir o problema pela cobertura da fonte de radiação, pela proteção da pele ou pelo uso de luvas e de máscaras faciais dotadas de vidros absorventes da luz ultravioleta.

(2) Produtos químicos - muitas soluções e substâncias são altamente tóxicas e podem, inclusive, explodir, caso não sejam adequadamente manuseadas, ou causar lesões e queimaduras graves. O máximo de cautela é exigido com a manipulação de produtos químicos tóxicos ou com produtos cujas propriedades toxicológicas sejam desconhecidas. Como regra geral, o rótulo do recipiente deve ser lido sempre antes da solução ser usada e as instruções devem ser estritamente ob-

servadas. As substâncias tóxicas devem ser controladas para que o usuário do laboratório não as absorva, ingira ou inale. A fim de prevenir a inalação de vapores, de gases e de partículas (fumaças, poeiras e aerossóis), essas substâncias devem ser sempre manipuladas no interior de uma capela e não deve haver contato com a pele.

(3) Comidas e bebidas - em nenhuma hipótese deve ser permitido a alguém comer ou beber no laboratório. Os alimentos nunca devem ser guardados num refrigerador onde há culturas ou produtos químicos armazenados.

ESTERILIZAÇÃO - EXIGÊNCIA BÁSICA PARA O TRABALHO COM MICROORGANISMOS

Os fungos e as bactérias podem ser encontrados em todos os lugares: no ar, no solo, nas roupas, nos cabelos, na água etc. Em consequência, a atividade laboratorial, na maioria dos casos, exige técnicas adequadas de esterilização. A contaminação consome tempo e dinheiro, além de alterar os resultados.

Estabelecimento de condições assépticas

As condições de assepsia são obtidas através da adoção de procedimentos que evitam a contaminação de objetos esterilizados e de culturas puras, destruindo-se os microorganismos com o uso de desinfestantes e de outras técnicas disponíveis.

Uma das principais fontes de contaminação é a poeira suspensa no ar. Inúmeros esporos podem ser drasticamente reduzidos, eliminando-se as correntes de ar. Recomenda-se o fechamento de janelas, de portas, o desligamento de ventiladores e de aparelhos de ar condicionado, pelo menos, uma hora antes do início dos trabalhos. Depois de lavar as superfícies de trabalho com uma solução de hipoclorito de sódio comercial a 10 % ou de álcool a 70 %, pode-se estender um tecido umedecido sobre a superfície do balcão para retenção dos agentes contaminadores que se precipitam, evitando que estes, juntamente com as partículas de poeira, se movimentem durante as manipulações. Deve-se lavar bem as mãos antes de iniciar o trabalho.

Além disso, existem inúmeras câmaras assépticas que podem ser utilizadas para prevenir a contaminação. A câmara asséptica mais simples (Fig. 1) consiste de uma caixa feita de material não poroso, com a parte de vidro inclinada para a frente e com uma abertura de, aproximadamente 20 cm, para permitir a livre movimentação das mãos. Na parte interna, podem ser instaladas uma lâmpada fluorescente e uma de luz ultravioleta. Para minimizar a contaminação, deve-se ligar a luz ultravioleta, pelo menos, uma hora antes de iniciar o trabalho (vide seção sobre Condições para Crescimento de Patógenos relativamente ao efeito da luz ultravioleta sobre os microorganismos e a seção sobre Segurança

para a verificação dos cuidados a serem observados). As câmaras equipadas com ar forçado através de filtros são as melhores, porque esses eliminam todos os microorganismos. Os filtros devem ser substituídos a cada três meses.

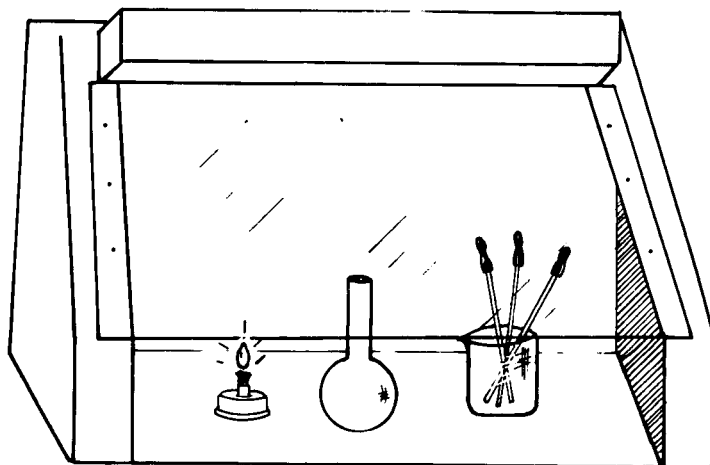


Fig. 1. Câmara asséptica simples.

Métodos de esterilização

A esterilização pela destruição dos microorganismos pode ser obtida por meios químicos (hipoclorito de sódio, álcool) ou físicos (calor, luz ultravioleta). O uso adequado desses tratamentos deve destruir todos os microorganismos. A seleção é determinada pelo seu custo, por sua eficiência e por sua aplicabilidade. Desaconselha-se a escolha de um método apenas pela sua conveniência, ou o emprego de tempo num processo de esterilização desnecessariamente esmerado.

As substâncias e os equipamentos a seguir listados atendem grande parte das necessidades do laboratório:

Substâncias e equipamentos

O que esterilizar

(1) Desinfestantes e esterilizantes líquidos	Superfícies de trabalho, instrumentos, utensílios e substâncias sensíveis ao calor.
(2) Autoclave	Líquidos não sensíveis ao calor (ingredientes dos meios comuns), instrumentos e equipamentos resistentes ao calor, vidraria, lotes de materiais secos.
(3) Forno	Vidraria, instrumentos metálicos resistentes a altas temperaturas.
(4) Esterilizantes gasosos	Equipamentos e substratos sensíveis ao calor.
(5) Filtros de líquidos	Soluções sensíveis ao calor.
(6) Filtros de ar	Ar para câmaras de cultura e de transferência.

(1) *Desinfestantes líquidos e suas utilidades* - o etanol (70-95 %) e o hipoclorito de sódio (10 %), normalmente, são utilizados na desinfestação de balcões e de instrumentos e no isolamento de microorganismos (vide seção sobre Isolamento de Fungos e de Bactérias de Tecido Vegetal Infectado). O procedimento mais utilizado na esterilização de instrumentos consiste em mergulhá-los em álcool a 70 % e flambá-los no fogo, com um bico de Bunsen ou lamparina, até que se tornem vermelhos pelo calor. Isto elimina os agentes contaminantes que se encontram naquela porção do instrumento e que será utilizada na manipulação do organismo e/ou do meio. Deve-se, então, deixar o instrumento esfriar durante uns 15 segundos, ou imergi-lo em água ou em ágar estéril.

(2) *Autoclave* - é bastante utilizada por ser uma forma eficaz e de baixo custo e requerer períodos de tempo relativamente curtos para a destruição dos microorganismos. O tempo mínimo para a esterilização adequada de líquidos é de 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 na autoclave por tempo excessivo, o ágar é hidrolisado, resultando num meio espesso, por vezes inibidor. Os materiais difíceis de serem aquecidos (óleo, solo, semente e pós) devem ser esterilizados em pequenas quantidades, durante períodos mais longos. O período de tempo deve ser aumentado também no caso de materiais altamente contaminados.

As seguintes recomendações são úteis ao se utilizar a autoclave:

- evitar o preenchimento dos recipientes acima de 2/3 de sua capacidade, se não estiverem lacrados, a fim de prevenir o derramamento das soluções ao ferver;

- usar recipientes bem tampados, se o volume dos líquidos for crítico, para evitar a perda de 3 a 5 % pela evaporação, observando, porém, maior tempo de esterilização;

- fechar os frascos com algodão ou com folha de alumínio - não se recomenda o uso de vedantes excessivamente apertados, pois poderão provocar explosões;

- não esvaziar a autoclave rapidamente, na esterilização de líquidos - as buchas poderão explodir, provocando o derramamento de líquidos (ou do meio) ao ferver;

- enrolar as pipetas em jornal ou em papel de embrulho. As placas de Petri de vidro podem ser colocadas em lotes de seis, ou mais, em sacos de papel de tamanho apropriado, envoltas em jornais ou em folhas de alumínio;

- não deixar material embrulhado com papel no fundo da autoclave;

- não tampar excessivamente os recipientes vazios e secos, colocando-os invertidos ou dispondo-os na lateral da autoclave;

- não embrulhar o lote muito apertado; deixar espaço suficiente entre os materiais;

- não encher a autoclave com materiais que exijam tempos de esteriliza-

ção muito diferentes;

- verificar as propriedades de sensibilidade ao calor das substâncias a serem esterilizadas, antes de colocá-las na autoclave. É aconselhável que a esterilização com autoclave, ou por filtração ou a gás, de líquidos com carboidratos (sacarose, glicose etc.), de substâncias de crescimento e de antibióticos, seja feita separadamente.

(3) *Ar seco aquecido* - este processo requer mais tempo do que a autoclave, porém é preferível para a vidraria, devido à ausência de resquícios de umidade. O tempo exigido para a esterilização varia de 60 minutos, a 170°C, a aproximadamente 16 horas, a 121°C.

(4) *Esterilização a gás* - é utilizada, principalmente, no tratamento de substâncias sensíveis ao calor. Usam-se com maior frequência o óxido de propileno e o óxido de etileno. O material deve ser colocado num recipiente lacrado (jarra de vidro ou saco plástico), onde deve permanecer por 16 horas (óxido de propileno) ou por seis a oito horas (óxido de etileno). Consulte a seção de Segurança para o manuseio dessas substâncias.

(5) *Esterilização de líquidos por filtração* - a esterilização por filtração (membrana ou filtro de vidro silicoso) pode constituir-se em excelente meio para eliminar microorganismos dos líquidos com o mínimo de alteração nas propriedades do material. É especialmente útil no caso das substâncias sensíveis ao calor. Os filtros mais utilizados são de porcelana, de colódio e de membranas de celulose. Normalmente, a filtração é auxiliada por um sistema de vácuo ou de pressão.

(6) *Filtros de ar* - são utilizados nas câmaras de fluxo laminar ou em câmaras assépticas, onde se manipula o material para cultivo ou para transferência. Esses filtros mantêm o ar livre de microorganismos e devem ser substituídos a cada três meses.

TIPOS DE MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura (vide fórmulas no Apêndice 2) são substâncias ou soluções que proporcionam o desenvolvimento de um organismo ou mais. Há uma grande quantidade de meios utilizados no isolamento, na manutenção e na propagação de culturas puras de bactérias e de fungos fitopatogênicos. Um meio adequado para o desenvolvimento de fitopatógenos deve incluir as fontes disponíveis de carbono, de nitrogênio, de sais inorgânicos, e, dependendo do organismo, até mesmo de vitaminas e de outros fatores de crescimento.

A maioria dos meios de cultura se enquadra em três categorias: (1) sintético, (2) semi-sintético e (3) natural. Os meios sintéticos são constituídos de ingredientes cuja composição e concentração químicas são conhecidas. Esses meios são úteis nos estudos fisiológicos e descritivos, quando se torna necessário repetir exatamente um lote anterior do meio ou registrar os efeitos da retirada ou do acréscimo de determinada substância. Os meios semi-sintéticos assemelham-se aos meios sintéticos quanto a possuírem um conjunto conhecido de ingredientes, porém apresentam a diferença de que, pelo menos alguns dos ingredientes, são de composição desconhecida ou variável. Um meio sintético, no qual todos os ingredientes são definidos quimicamente, pode ser transformado em semi-sintético, acrescentando-se determinada substância, como extrato de levedura. Sabe-se que o extrato de levedura contém certas vitaminas, mas desconhecem-se as quantidades exatas ou a existência de outras substâncias que podem estar presentes. O resultado é um meio cuja composição é relativamente previsível, porém não é completamente conhecida quimicamente. Os meios semi-sintéticos são amplamente utilizados nos trabalhos de rotina e oferecem opção entre os meios sintéticos e os naturais. Os meios naturais são compostos, parcial ou integralmente, por produtos naturais, como partes de plantas (folhas, brotos, raízes, sementes 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 o são um pedaço de carne ou de pão. Os meios naturais, normalmente, são muito bons e proporcionam a esporulação de fungos que, de outra forma, poderia não ocorrer. Sua principal desvantagem é que po-

dem diferir, significativamente, de lote para lote e, assim, não fornecem resultados experimentais confiáveis.

De um modo geral, os meios pobres em carboidratos e ricos em substâncias de origem vegetal induzem, ou aumentam, a esporulação de fungos fitopatogênicos. Os substratos sem fontes de nutrientes, como o ágar-água, são comumente usados quando se deseja que o desenvolvimento do patógeno em estudo se dê a partir dos nutrientes presentes no tecido contaminado, do qual se está tentando isolar esses organismos.

Certos fungos patogênicos, como os agentes causais das ferrugens, do oídio, os nematóides patogênicos e as viroses, ainda não foram cultivados com êxito num meio de cultura.

Tanto os meios sólidos como os líquidos são usados na cultura "**in vitro**" de fungos e de bactérias patogênicas e seu uso depende do tipo de informação que se pretende obter. As culturas líquidas são usadas principalmente para aumentar o inóculo de bactérias e de fungos e para estudar a taxa de desenvolvimento e as propriedades fisiológicas dos organismos quando, por exemplo, toda a colônia tem que ser recuperada para pesagem ou para extração química, ou quando o próprio meio de cultura tem de ser analisado quanto a alterações químicas. Os meios líquidos raramente são usados para fins de identificação, porque poucos fungos esporulam bem nestas soluções. Os organismos em cultura líquida podem ser cultivados em meio parado (estacionário) ou em meio agitado, num aparelho agitador contínuo ou em ar estéril borbulhante. A agitação proporciona aeração e uniformidade no processo de desenvolvimento de organismos.

Os meios sólidos, normalmente, são utilizados no isolamento de bactérias e de fungos para fins de identificação e de preservação de culturas. Os meios sólidos são preparados acrescentando-se ágar (normalmente 1,5 %, embora possa usar-se 0,75 a 2 %) aos outros componentes dos meios de cultura. O ágar é um polissacarídeo complexo obtido de algas e, basicamente, não tem nenhum valor nutritivo. O ágar possui a propriedade bastante útil de formar um gel relativamente claro abaixo de 40°C. Funde-se a 80°-100°C e tolera as altas temperaturas de esterilização sem se destruir.

Nas primeiras tentativas para isolar um fitopatógeno desconhecido, com freqüência, utiliza-se um "meio padrão de isolamento". Por exemplo, ágar nutritivo (AN), para bactérias, e ágar-água (AA) ou batata-dextrose-ágar (BDA), para fungos. Outros meios mais específicos também podem ser usados tanto para fungos como para bactérias. O exame microscópico do tecido infectado, freqüentemente, indica o "tipo" de patógeno envolvido - fungo, bactéria ou actinomiceto - sugerindo, desta forma, os meios prováveis a serem utilizados.

Os meios seletivos podem ser utilizados para a purificação de culturas ou para o isolamento de organismos de crescimento lento.

A alteração do pH do meio impede o desenvolvimento de certos microorganismos. A maioria dos fungos cresce melhor em condições ácidas (pH 5,5-6,0), enquanto que o crescimento de bactérias é, geralmente, favorecido por condições aproximadamente neutras (pH 6-8).

Nos tempos atuais, os antibióticos bactericidas são bastante utilizados no isolamento seletivo de fungos do solo e de material contaminado. Quase todas as bactérias são sensíveis a esses produtos, embora nenhum antibiótico seja eficaz contra todas. Os antibióticos usados devem ser solúveis e estáveis no meio e atóxicos para os organismos a serem desenvolvidos na cultura. De um modo geral, esses produtos devem ser esterilizados por filtração e acrescentados ao ágar resfriado antes de este solidificar. No trabalho de isolamento de rotina, normalmente, usa-se uma mistura de antibióticos, quase sempre estreptomicina, clorotetraciclina ou neomicina, embora a presença isolada da estreptomicina iniba o desenvolvimento da maioria das espécies de bactérias, sem afetar a maioria dos fungos. O Rosa de Bengala (corante) atua também como inibidor do crescimento de bactérias e inibe ou retarda o desenvolvimento de inúmeros fungos.

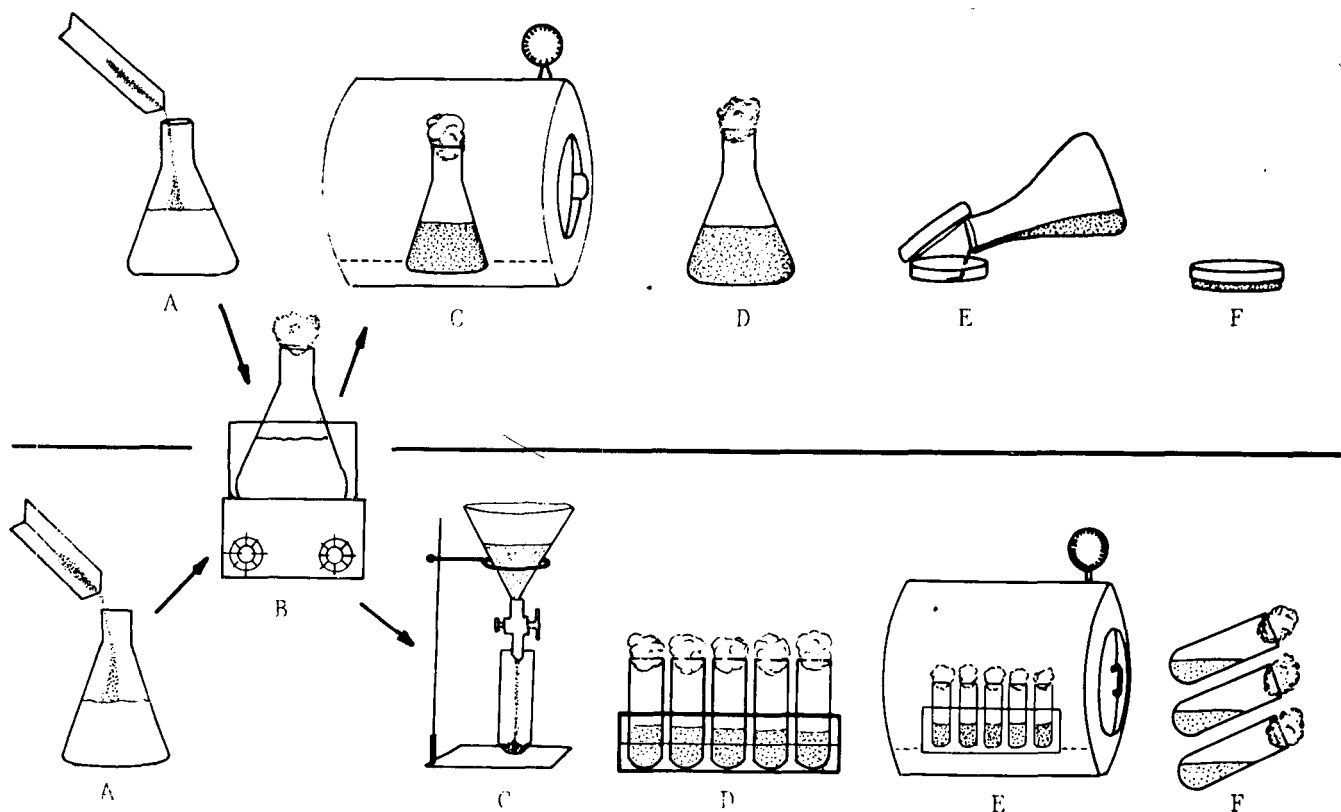
Outros inibidores mais comumente usados nos meios de cultura são os fungicidas comerciais, os corantes, os detergentes e certos produtos naturais, como o oxygall. Dependendo de sua concentração, esses materiais podem inibir completamente alguns organismos ou retardar o desenvolvimento de fungos de rápida disseminação, permitindo, desta forma, a localização de organismos de crescimento lento.

PREPARO DE MEIOS DE CULTURA

A maioria dos meios rotineiramente usados nos estudos fitopatológicos pode ser preparada facilmente. De modo geral, observa-se o seguinte procedimento (Fig. 2): os ingredientes, nas quantidades indicadas na fórmula ou na receita, são colocados num beaker (copo griffin e Berzelius) ou num frasco Erlenmeyer, com capacidade para 1,5 a 2 vezes o volume final do meio. Inicialmente, os ingredientes são acrescentados um pouco de cada vez a uma parte do volume necessário de água, com constante agitação, com a finalidade de dissolvê-los completamente e impedir a formação de grânulos. Utiliza-se uma folha de alumínio ou um tampão de algodão para fechar o frasco ou o beaker.

A seguir, dissolve-se o ágar em água quente, o que pode ser feito imergindo-se o frasco em banho-maria fervente. Após um período variável conforme a concentração, o ágar terá se dissolvido e a suspensão mostrar-se-á clara. Depois da adição dos ingredientes já preparados e da verificação do volume final, agita-se e coloca-se o meio na autoclave, por um período de aproximadamente 20 minutos, a 121°C (vide processo de autoclavagem na seção de Esterilização). No caso de haver grandes quantidades em um só recipiente, será necessário maior tempo de esterilização para que as partes centrais sejam adequadamente aquecidas. É importante que o meio de cultura seja esterilizado no mesmo dia em que foi preparado.

Após a esterilização, deixa-se o frasco esfriar e, então, passa-se a movimentá-lo em rotação para misturar o ágar; não se deve agitá-lo logo após a sua retirada da autoclave, pois o conteúdo encontra-se em ponto de ebulição e um movimento repentino pode provocar sua fervura. Durante o aquecimento, os meios de cultura podem forçar o tampão para fora do frasco, derramando o conteúdo, situação que pode provocar queimaduras e torná-lo contaminado e inutilizável.



(Adaptado de Agrios, 1978)

Fig. 2. Preparo de meios nutritivos sólidos em placas de Petri (I) e em tubos de ensaio inclinados (II).

A = colocar os ingredientes pré-pesados do meio nutritivo em tubo contendo água destilada e dissolvê-los; B = ferver o ágar em banho-maria até dissolvê-lo; IC = o ágar é adicionado ao meio nutritivo e autoclavado; ID = deixar esfriar; IE = colocar o meio em placas de Petri; IF = o meio solidifica-se nas placas.

IIC = o meio é colocado num funil e vertido nos tubos; IID = os tubos são colocados no suporte e fechados com tampões de algodão; IIE = os tubos são autoclavados; IIF = os tubos são colocados na posição inclinada para o meio solidificar.

O meio deve ser transferido para as placas de Petri antes de solidificar, enquanto se encontra relativamente quente, ao redor de 50°C (nesta temperatura, pode-se manter o frasco junto ao antebraço). Se o meio de ágar tornar-se sólido, este pode ser derretido pelo aquecimento em banho-maria. Antes da transferência, o gargalo da garrafa deve sempre ser flambado numa chama para eliminar esporos extraviados que, porventura, ali se encontrem. Levanta-se a tampa da placa de Petri, inclinadamente, apenas o suficiente para inserir o bocal do frasco (Fig. 3). A tampa da placa não deve ser agitada no ar. Quando o ágar tiver se transformado em gel, as placas deverão ser invertidas para evitar-se a condensação na tampa. Após, as placas devem ser embaladas e mantidas em posição invertida, preferencialmente num refrigerador.

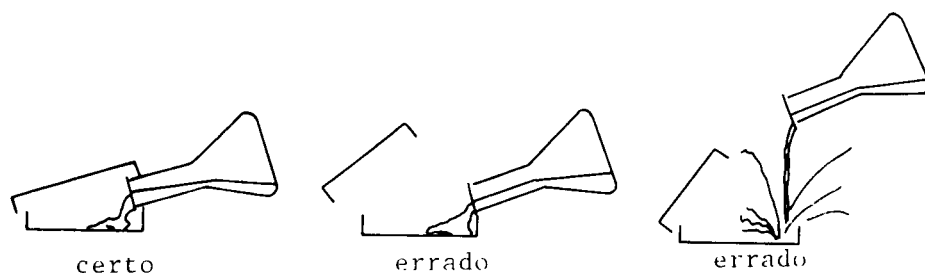


Fig. 3. Técnica de derramamento em placas.

Se for necessário utilizar o meio de ágar em tubos, estes devem recebê-lo antes da esterilização; após colocar cerca de 6 a 8 ml, os tubos são vedados com tampões de algodão, esterilizados e deixados para solidificar, mantendo-os em ângulo aproximado de 30° (Fig. 2). Ao distribuir o ágar nos tubos, não permitir que a ponta do recipiente encoste nas paredes dos tubos de ensaio. O ágar que se depositar nas laterais deixa pegajosos os tampões de algodão, dificultando sua remoção e a reposição. Do mesmo modo, isto facilita o desenvolvimento dos contaminantes nas laterais, em direção ao meio.

O meio pode ser ajustado para um pH ótimo, com vistas ao cultivo de bactérias ou de fungos, antes da esterilização (vide seção sobre pH e sua deter-

minação no Apêndice 3). Para tornar o meio ácido ou alcalino num nível desejado, acrescentar ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), respectivamente, gota a gota, não esquecendo de que são necessários 1 a 2 minutos para a estimativa correta do pH final, com o uso de papel indicador ou de medidor de pH. É vantajoso ajustar o pH num meio previamente aquecido. Deve ser considerado, também, que a cada esterilização haverá uma redução de 0,1 a 0,2 no pH (isto é, tornando-o mais ácido). Os meios de ágar também podem ser acidificados acrescentando-se uma ou duas gotas de ácido láctico a 50 % a cada placa de Petri, antes de o meio derretido ser transferido para as placas.

De modo geral, os antibióticos devem ser esterilizados por filtração e adicionados ao ágar esterilizado, após esfriar e antes de este solidificar.

PREPARO DE CULTURAS DE FUNGOS E DE BACTÉRIAS

A transferência das culturas de placas para tubos, de tubos para placas, de placas para placas ou de tubos para tubos é feita de modo similar, usando-se uma câmara asséptica de transferência para evitar a contaminação. Antes de iniciar o procedimento, deve-se limpar a área de trabalho e esterilizar os instrumentos, conforme detalhado anteriormente (consulte a seção sobre Esterilização). Uma chama e álcool a 95 % devem estar sempre à disposição.

Manusear o tubo, ou a placa com a cultura a ser transferida, com uma mão e a alça de transferência com a outra (Fig. 4). Ao realizar uma transferência de bactérias de tubos, raspar a alça ao longo da colônia, retirando-a sem tocar nas laterais do tubo. Passar o bocal do tubo numa chama e repor a tampa de algodão. Após, o tubo com o meio estéril é aberto, estriado e fechado de modo similar. Ao realizar uma transferência de fungos de placas, usar uma agulha esterilizada no calor para recortar uma pequena porção (cerca de 1 mm) da margem da colônia. Transferir, então, o quadrado retirado da margem da colônia para uma placa com meio estéril, assegurando-se de que a tampa seja aberta apenas o suficiente para permitir a passagem da agulha, e proceder à transferência. A colocação do inóculo no centro da placa provocará um desenvolvimento radial; a maturação e a esporulação ocorrerão no centro da colônia, progredindo em direção à margem, onde se encontra o micélio mais jovem. Caso o inóculo seja colocado em vários lugares na placa, ou em toda a superfície, por meio de uma suspensão de esporos, haverá uma rápida produção de esporos uniformemente distribuídos sobre todo o meio.

Observação: os tampões de algodão devem permanecer removidos pelo menor espaço de tempo possível e as placas de Petri devem ser abertas apenas o suficiente para permitir a inserção da agulha. Jamais colocar os tampões de algodão ou as tampas sobre a mesa, pois contaminar-se-ão. A extremidade dos tampões e a alça não devem encostar na mão do operador, na mesa, ou em qualquer objeto não esterilizado; os tubos devem ser mantidos nivelados ou inclinados até um máximo de 30°, em relação à posição horizontal, enquanto abertos, a fim de se evitar a precipitação de agentes contaminadores para dentro

do tubo. Aqueles que caem na borda ou nas proximidades internas desta são destruídos pela flambagem, antes de o tampão ser recolocado.

A placa e o tubo devem ser identificados com uma caneta, indicando-se o tipo de cultura e a data. Deve-se envolver as laterais das placas com uma película de parafina, a fim de vedar as aberturas.

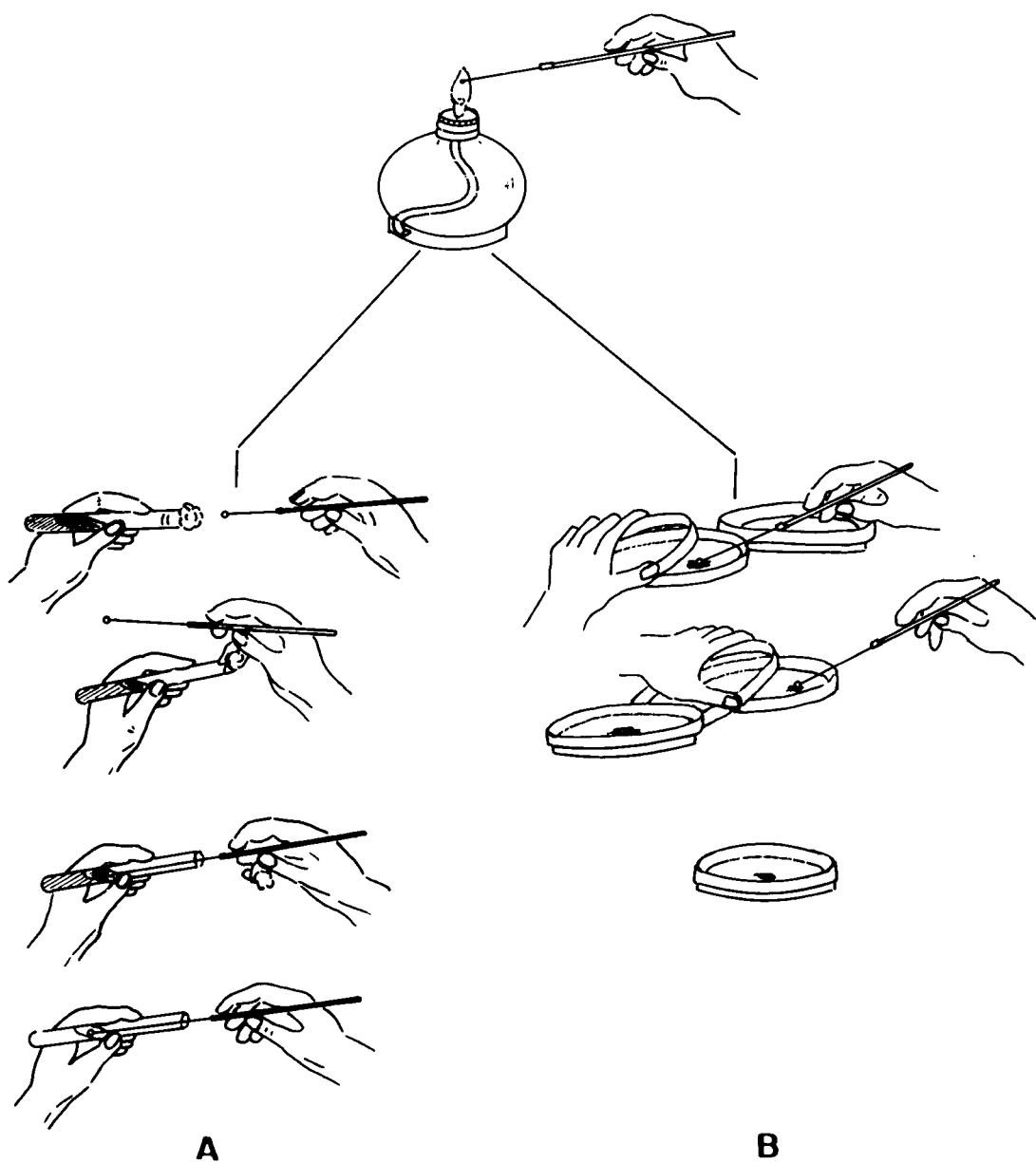


Fig. 4. Técnicas de transferência de fungos e de bactérias de um tubo para outro (A) ou de uma placa de Petri para outra (B). Observe como são manipulados os tubos, os tampões de algodão, as placas e as agulhas de transferência ou as alças.

CONDIÇÕES PARA CRESCIMENTO DE PATÓGENOS

Fungos

Todos os microorganismos requerem um conjunto de condições ambientais (aeração, luz, umidade, temperatura etc.) no qual podem se desenvolver e esporular melhor. Todavia, inexistem um conjunto único de condições para todas as culturas de fungos patogênicos e as condições adequadas para cada organismo terão de ser estabelecidas. Classificam-se as condições que proporcionam o crescimento vegetativo e a esporulação em mínimas e máximas, nas quais, quando excedidas, não há crescimento. Condições ótimas são aquelas em que se verifica melhor desenvolvimento. Estas condições ótimas podem ser amplas ou restritas. Vale lembrar que, com frequência, se obtém a esporulação em condições adversas àquelas exigidas para o crescimento vegetativo.

Temperatura

Embora cada fungo tenha uma temperatura ótima de desenvolvimento, normalmente a maioria dos fungos isolados da natureza desenvolve-se bem à temperatura ambiente (20°-25°C). A temperatura pode ser controlada em câmaras, em pequenas incubadoras ou em banho-maria. A oscilação da temperatura deve ser sempre mantida no mínimo, utilizando-se termostatos de precisão e circulação adequada de ar e de água.

A quantidade de calor radiante emitido pelas lâmpadas e os problemas decorrentes deste fato variarão conforme o tipo de lâmpada utilizado, além de outros fatores. Com frequência, pode-se reduzir ou eliminar a influência do calor radiante aumentando-se a distância entre a lâmpada e o microorganismo na placa de cultivo, ou colocando-se um filtro de vidro de absorção ou refletor de calor.

Luz

As fontes simples de luz são:

(1) Luz visível (380-750 nm) - são boas fontes as lâmpadas fluorescentes "luz do dia". As lâmpadas incandescentes com filamento de tungstênio emitem muito calor e isto pode causar problemas à cultura.

(2) UV próximo (NUV) (300-380 nm) - as lâmpadas fluorescentes "luz do sol" emitem um espectro contínuo (260-400 nm) que apresenta sua emissão máxima em 320 nm. A lâmpada fluorescente de "luz negra" também emite um espectro contínuo, porém em ondas de luz um pouco mais longas (310-420 nm), tendo sua emissão máxima ao redor de 360 nm. Outra fonte prontamente disponível de UV próximo de comprimento de onda longo é a lâmpada fluorescente "luz do dia"; porém, a quantidade emitida varia consideravelmente, dependendo se a lâmpada é de "tipo frio", "padrão", "tipo quente" etc.

(3) UV distante (FUV) (200-300 nm) - a lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão ou "germicida" emite uma linha de espectro com, aproximadamente, 85 % da sua radiação total emitida em 253 nm.

É importante que se tenha presente que o rendimento de algumas lâmpadas, como as fluorescentes, varia significativamente, segundo as alterações que se verificam na temperatura ambiente.

A luz pode estimular a reprodução sexuada e a assexuada em quase todos os fungos e o seu efeito está intimamente ligado à nutrição e à temperatura. A maioria dos fungos sensíveis à luz esporula quando expostos à luz contínua, porém existem alguns, denominados esporuladores diurnos, que exigem um período escuro, seguido de um período de luz. Os comprimentos de onda ultravioleta (UV) e de ultravioleta próximo (NUV) inferiores a 340 nm, normalmente, induzem a esporulação, porém dosagens excessivas poderão inibi-la.

As recomendações gerais para induzir a esporulação de fungos com luz são as seguintes:

(1) usar lâmpadas fluorescentes de luz negra que emitam radiação NUV num espectro contínuo de 320 a 420 nm, ou lâmpadas fluorescentes frias, tipo "luz do dia", que também emitam NUV;

- (2) colocar duas lâmpadas (40 W cada) na posição horizontal, afastadas 20 cm, 40 cm acima da placa com a cultura;
- (3) usar um ciclo alternado luz-escuro de doze horas;
- (4) usar placas ou tubos de plástico ou de vidro, que permitam a passagem de UV.

Em condições de alternância de luz e escuro sob temperatura constante, com frequência, ocorre um pronunciado zoneamento nas colônias desenvolvidas em meio de ágar. Este zoneamento pode ser resultado do estímulo ou do retardamento do crescimento provocado pela luz, bem como dos efeitos desta sobre a pigmentação, sobre a produção das estruturas de frutificação e de esclerócios.

As "lâmpadas germicidas", ou lâmpadas de vapor de mercúrio de baixa pressão, são utilizadas com frequência nos estudos de mutação e de efeito letal em fungos, porque são de baixo custo e emitem a maior parte de sua energia em 253 nm. Os efeitos letais do UV, geralmente, são atribuídos aos comprimentos de onda entre 200-300 nm. O efeito do UV distante na sobrevivência dos fungos depende de muitos fatores. Os esporos, por exemplo, são muito mais resistentes aos efeitos letais do UV do que o micélio vegetativo. Da mesma forma, a sensibilidade dos esporos é, seguidamente, relacionada com a cor; os esporos pigmentados, freqüentemente, sobrevivem a exposições mais longas ao UV distante do que os esporos hialinos. Além disso, a espessura da parede do esporo também pode estar vinculada à habilidade dos fungos em tolerar a radiação. A resposta de determinados fungos à luz UV depende também da sua condição fisiológica no momento em que se procede à irradiação. Por exemplo, os esporos hidratados são mortos mais prontamente pelo UV distante do que os esporos secos. As condições fisiológicas das hifas são influenciadas pela idade, pela nutrição, pela presença de produtos de metabolismo, pela concentração de íons hidrogênio do substrato, pela temperatura, pelo tratamento prévio de luz etc., sendo importante, então, que se façam todas as tentativas no sentido de padronizar e de controlar o maior número possível de variáveis principais.

Bactérias

Para a reprodução de bactérias, a temperatura é da maior importância. A temperatura ótima para o desenvolvimento de bactérias fitopatogênicas encontra-se entre 25°-30°C. Elas param de se reproduzir entre 33°-40°C.

Incubadoras

Existe uma grande variedade de incubadoras que podem ser usadas na cultura de microrganismos, nas quais a temperatura e a luz são reguláveis. Esses equipamentos variam muito quanto às dimensões, quanto ao custo e quanto à eficiência.

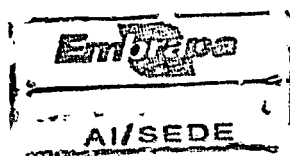
ISOLAMENTO DE FUNGOS E DE BACTÉRIAS DE TECIDO VEGETAL INFECTADO

Aspectos gerais

Ao encontrar-se uma planta infectada, o primeiro passo é tentar isolar o organismo causador da enfermidade, tanto para fins de identificação como para determinação das características de desenvolvimento, ou, então, para estudos adicionais. Isolar um organismo significa mantê-lo afastado de todos os outros organismos, inclusive do que lhes é suscetível. Isto se denomina cultura pura.

O sucesso do isolamento depende da seleção adequada de porções do material vegetal infectado e, normalmente, da rápida utilização deste. É provável que os tecidos amostrados durante a fase ativa de uma infecção contenham apenas o patógeno responsável por essa infecção, embora as superfícies desses tecidos, em regra, encontrem-se contaminadas por organismos saprófitas. O isolamento de tecido seriamente deteriorado ou de porções mais antigas de tecidos enfermos é uma tarefa difícil, tendo em vista que organismos secundários, de crescimento mais acelerado, podem estar presentes ou que o patógeno tenha morrido. Se não for utilizado logo, o material infectado deve ser mantido sob refrigeração, armazenando-o seco, na maioria dos casos, a fim de conservá-lo por maior tempo.

Independentemente do hospedeiro do qual se pretende isolar o patógeno, é essencial que este seja colocado em um novo ambiente que favoreça o seu desenvolvimento, superando seus concorrentes saprófitas. Em regra, isto é mais difícil de se conseguir com fungos e com bactérias do solo do que com aqueles que contaminam os tecidos das plantas vivas. Um isolamento bem sucedido de uma cultura depende, basicamente, da capacidade da técnica em separar determinado organismo de outros. No isolamento inicial de fungos, é importantíssimo que os primeiros estádios de desenvolvimento sejam observados atentamente. Com frequência, o fungo que se busca encontra-se acessível no início do desenvolvimento e pode ser transferido com facilidade. Mais tarde, todavia, pode estar completamente coberto por outros microorganismos não desejados. 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.

Métodos de isolamento

Os métodos utilizados no isolamento de fungos, e para o desenvolvimento destes em meio de cultura, dependem de seu hábito de crescimento, de seu modo de nutrição e de sua ecologia. Por exemplo, os organismos de desenvolvimento lento, com frequência, são obtidos mais prontamente pelo isolamento direto de esporos do que através do tecido em cultura de ágar nutritivo. Devido ao fato de produzirem grandes quantidades de unidades reprodutivas, as bactérias são isoladas mais eficientemente quando colocadas em cultura com diluições de tecido da planta infectada do que quando esta cultura é feita com partes intactas do tecido. Assim, antes de se iniciar o isolamento, o tecido da planta deve ser examinado, a fim de se verificar se não há corpos de frutificação, micélio ou células bacterianas.

Uma vez que as bactérias e os fungos são, muito provavelmente, onipresentes como contaminadores, é importante que ambos sejam excluídos dos procedimentos, o máximo possível, não apenas da superfície do tecido enfermo como, também, da área de trabalho e do equipamento que será utilizado (vide seção de Esterilização). Além dos métodos antissépticos, normalmente usam-se desinfestantes, meios seletivos e técnicas especiais, com a finalidade de se estabelecer e de manter as culturas puras dos fungos.

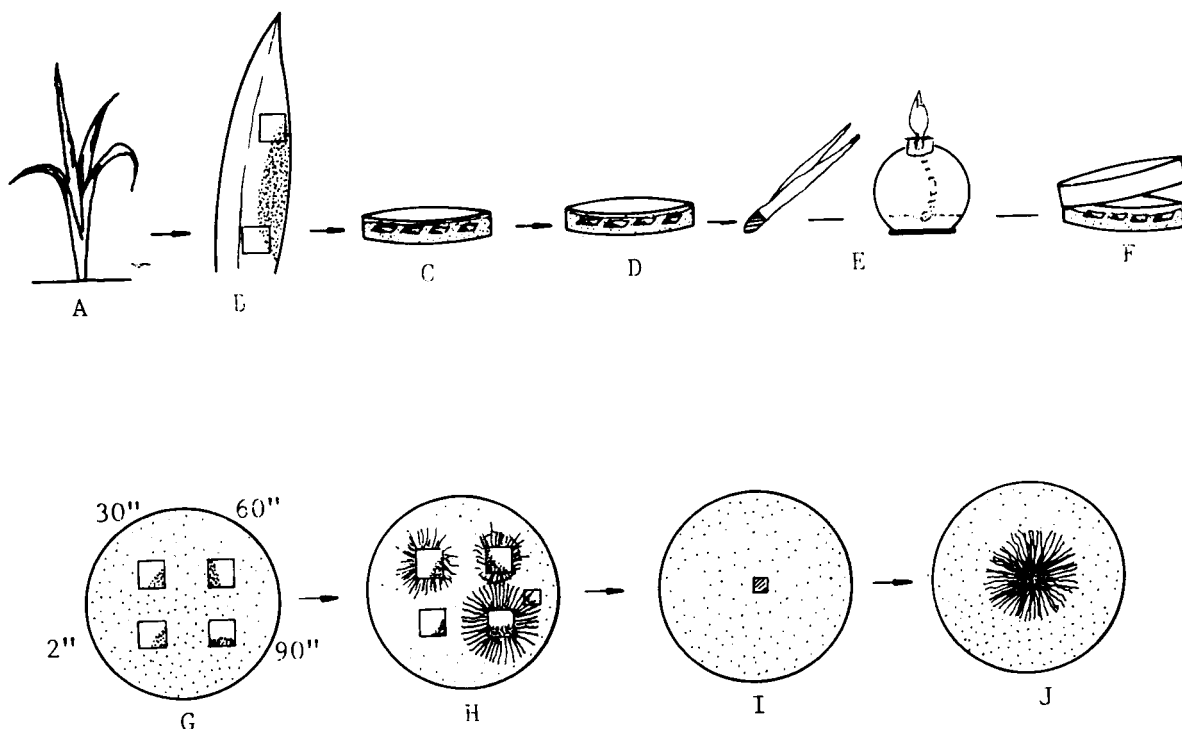
Via de regra, recomendam-se os seguintes métodos:

<u>Método</u>	<u>Recomendação</u>
(1) Indução de crescimento do micélio	Para infecções profundamente instaladas e fungos de fraca esporulação.
(2) Esporulação induzida	Basicamente para fungos de manchas foliares.

- (3) Isolamento direto Organismos que estejam esporulando em material infectado num estado relativamente puro e para alguns organismos de crescimento lento.
- (4) Técnica de diluição Para grandes quantidades de unidades reprodutivas de bactérias e de outros microorganismos.
- (5) Isca Para organismos (normalmente existentes no solo) capazes de se desenvolver mais competitivamente em certos materiais.
- (6) Inoculação do hospedeiro Parasitos obrigatórios ou altamente contaminados e/ou organismos de crescimento muito lento.

(1) *Indução de crescimento do micélio* - Certos organismos que não frutificam prontamente no tecido hospedeiro e/ou são localizados basicamente nos tecidos internos, ou se encontram na presença de muitos outros contaminantes, podem ser isolados colocando-se partes do tecido interno em ágar nutritivo ou em ágar-água (Fig. 5).

A técnica utilizada pode ser adaptada de acordo com o tipo de material, realizando-se experiências, até encontrar-se o método mais adequado. Em geral, lava-se bem o material em água corrente, enxaguando-o depois em água destilada e agitando-o para secar. Após, o material é imerso em hipoclorito de sódio comercial a 10 %, ou em outro desinfestante, de cinco segundos a alguns minutos, lavado em água destilada estéril e agitado para retirar o excesso de líquido. O período de tempo em que o tecido é mantido no desinfestante varia segundo o tipo de tecido que está sendo usado. Por exemplo, o período adequado para tecidos retirados de madeira, ou para sementes duras, pode ser muito maior do que aquele requerido para tecidos macios, como folhas, brotos ou plântulas. É essencial que se experimentem diferentes períodos de tempo para identificar aqueles que melhor funcionam, lembrando que o tempo de aplicação do desinfes-



(Adaptado de Agrios, 1978)

Fig. 5. Isolamento de fungos fitopatogênicos de tecido vegetal infectado.

A = planta infectada;

B-C = segmentos da margem da lesão colocados em hipoclorito de sódio a 10 % durante períodos diferentes;

D = segmentos enxaguados em água destilada esterilizada;

E = pinça esterilizada na chama, usada para transferência dos segmentos;

F = segmentos colocados em meio nutritivo numa placa de Petri;

G = segmentos colocados em meio nutritivo na ordem de tempo de imersão em hipoclorito de sódio;

H = na imersão correta (no exemplo 90'') apenas o patógeno sobrevive no centro do segmento e estende-se para fora do tecido;

I-J = obtém-se uma cultura pura do patógeno realizando-se a subcultura de um segmento do patógeno desenvolvido na placa anterior, colocando-o numa nova placa contendo meio nutritivo.

tante deve ser suficiente apenas para matar os organismos externos. Se a infecção for bem recente e os tecidos da superfície se encontrarem relativamente livres de invasores secundários, o uso de desinfestantes pode ser desnecessário. Com frequência, a lavagem desses tecidos, substituindo-se várias vezes a água destilada estéril, é um método bastante satisfatório para se remover a contaminação da superfície.

Após, pode-se colocar o tecido diretamente na placa de Petri, previamente preparada com ágar nutritivo, como BDA, ou em ágar-água. Caso as bactérias sejam numerosas, devem-se usar antibióticos ou meios acidificados para reduzir o número de colônias (vide seção sobre Tipos de Meios de Cultura). Normalmente, as placas são mantidas à temperatura de 20°-25°C, a fim de permitir o desenvolvimento do patógeno para fora do tecido e seu crescimento como uma colônia no meio de cultura. Após o desenvolvimento, utiliza-se uma agulha de transferência para passar pequenas porções do ágar contendo o micélio da borda das colônias em desenvolvimento para os tubos de ensaio, ou para as placas com BDA, a fim de obter-se culturas puras do patógeno.

Caso se esteja trabalhando com tecidos de madeira ou com frutos, após desinfestar a superfície, conforme indicado anteriormente, retira-se a camada externa do tecido, usando-se uma faca ou lâmina previamente flambada. O instrumento deve ser flambado cada vez que se fizer uma incisão. Pequenas partes localizadas na margem do tecido infectado devem ser escavadas com uma faca ou com uma pinça.

(2) *Esporulação induzida* - Quase todos os fungos que atacam as partes aéreas de uma planta esporularão no hospedeiro, caso sejam mantidas a umidade e a temperatura adequadas. O método a ser utilizado depende do tipo de material e da severidade da infecção causada por organismos secundários.

O método empregado com maior frequência consiste na colocação do material numa câmara úmida, feita com uma caixa de plástico, ou numa placa de Petri com várias camadas de papel de filtro colocadas no fundo, que são umedecidas com água estéril e sobre as quais coloca-se o material (Fig. 6). Os contaminadores de superfície podem ser removidos com uma boa lavagem em água corrente.

Outro método utilizado consiste em cortar uma parte do tecido com a lesão e uma porção do tecido sadio e mergulhá-los em hipoclorito de sódio a 10 % ou

em outro desinfestante, em períodos de tempo diferentes, conforme indicado anteriormente. Se o patógeno for de crescimento lento e houver contaminadores, após desinfestar a superfície do tecido, cortá-lo em pedaços bem pequenos e secá-los com papel de filtro estéril; usando uma pinça, agite-os para retirar o excesso de líquido e coloque cinco ou seis pedaços, bem separados, num papel de filtro esterilizado umedecido, ou em ágar-água. O ágar-água mantém um suprimento mais uniforme de umidade e é utilizado para estimular a esporulação e para retardar o crescimento de organismos secundários.

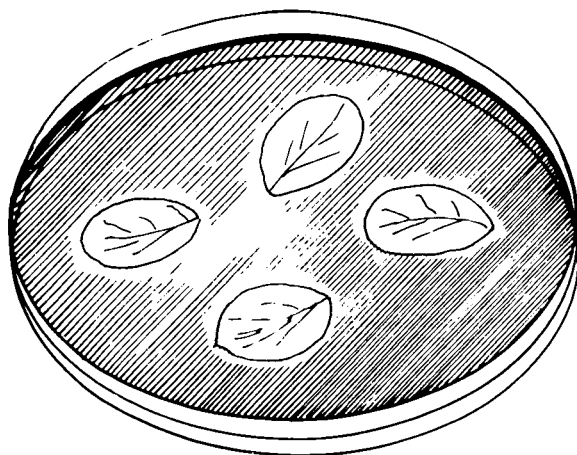


Fig. 6. Folhas dispostas numa câmara úmida que consiste em uma placa de Petri com papel de filtro umedecido colocado no fundo.

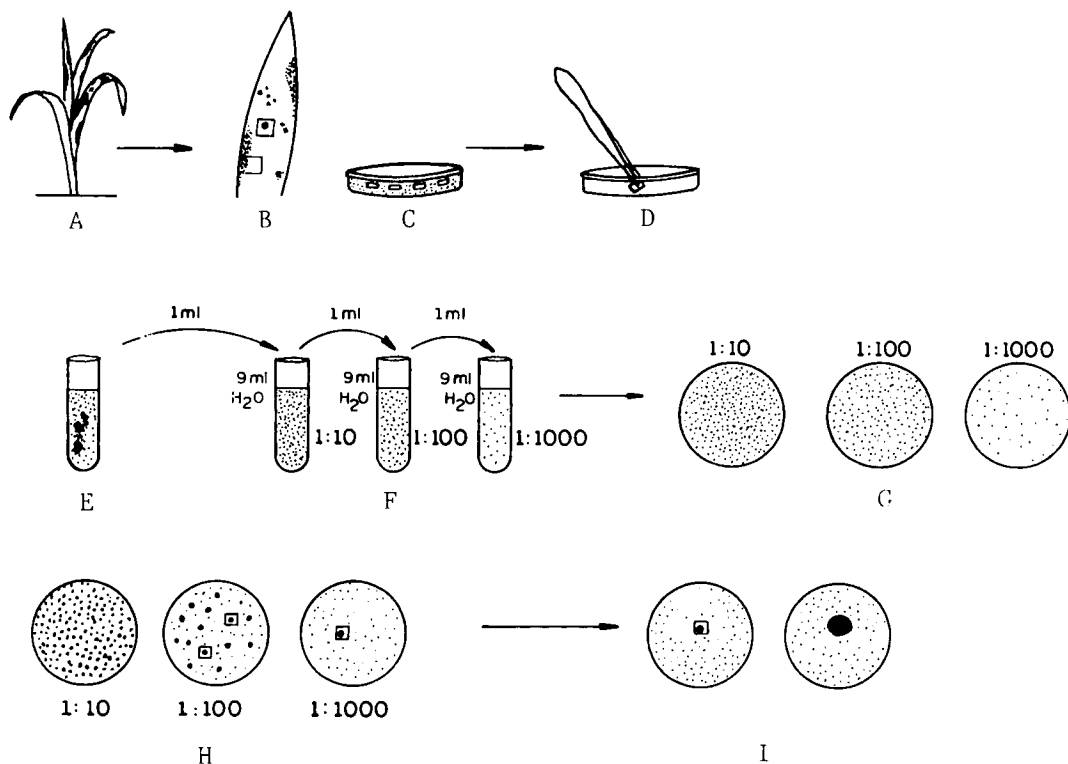
(3) *Isolamento direto* - Quando o fungo estiver esporulando no tecido infectado, os esporos ou os corpos frutíferos podem, com o auxílio de um microscópio estereoscópico (ou lupa), ser removidos com uma agulha fina, com microespátula ou com alça. Os esporos podem ser depositados por movimento estriado da agulha sobre o ágar ou adicionados a uma ou duas gotas de água estéril sobre a superfície do ágar e ser procedida a estriagem das gotas.

(4) *Técnica de diluição* - Este método é usado para isolar bactérias patogênicas ou qualquer outro organismo que produza grandes quantidades de unidades reprodutivas, como é o caso dos fungos de grande esporulação. Da mesma forma, os organismos de crescimento mais lento que, normalmente, são sobrepujados por outros em plaqueamentos de tecido, podem ser detectados por este método. Uti-

liza-se esta técnica também para separar organismos que crescem juntos numa cultura, como fungos contaminados com leveduras ou com bactérias.

Observar o seguinte procedimento: colocar quatro gotas de água destilada, separadas e equidistantes, numa placa de Petri e uma gota de água em cada uma das outras quatro ou cinco placas. Retirar uma pequena parte do tecido infectado da planta afetada, utilizando um escalpelo esterilizado, colocando-a em uma das gotas existentes na primeira placa. Após, esmagar o tecido infectado com o escalpelo. Passados cinco a dez minutos (tempo necessário para que as bactérias se separem do tecido da planta), usar uma alça de transferência, previamente flambada e resfriada, para transferir uma porção de água contendo as bactérias da primeira gota para a segunda, na mesma placa. Agitar bem a segunda gota com a alça de transferência e, sem colocá-la na chama, transferir uma alça cheia da segunda para a terceira gota, e assim sucessivamente. Repetir esse procedimento com as placas restantes, obtendo uma diluição progressiva da quantidade de bactérias existentes na primeira gota. Após, acrescentar o ágar nutritivo fundido e resfriado a cada placa, inclinando-as e girando-as para obter uma distribuição uniforme das bactérias no ágar.

Caso se tenha interesse em averiguar a quantidade de esporos ou de bactérias por grama da amostra original, observar o seguinte procedimento (Fig. 7): triturar um determinado peso seco (por exemplo, 1 grama) de material, distribuindo-o em 9 ml de água destilada colocada em um tubo de ensaio. Usando uma pipeta esterilizada, transferir 1 ml dessa solução para um segundo tubo que contenha 9 ml de água, também esterilizada. Isso resulta numa diluição de 10^{-2} da massa de esporos ou de bactérias existente no material original, sendo possível repetir o processo até se atingir diluições de 10^{-3} , 10^{-4} , ou mesmo superiores, se necessário. Coloca-se uma alíquota de 1 ml da diluição na superfície dos meios de ágar, espalhando-a uniformemente. Alternativamente, poder-se-ia usar uma pipeta e passar a diluição para uma placa de Petri, acrescentando-se o meio de ágar fundido e resfriado, conforme descrito acima. Obter-se-á maior precisão preparando várias placas para cada uma das diluições.



(Adaptado de Agrios, 1978)

Fig. 7. Isolamento de bactérias fitopatogênicas de tecido vegetal infectado.
A = planta infectada;
B-C = cortar pequenas áreas infectadas ou a margem das áreas maiores; colocar em hipoclorito de sódio a 10 % durante períodos diferentes;
D = usando uma pinça esterilizada, lavar os segmentos de tecido em água destilada;
E = colocar as partes de tecido em tubos com água esterilizada e mace-
rar;
F = preparar a diluição seriada transferindo 1 ml de suspensões de bactérias de um tubo para o seguinte;
G = colocar 1 ml de cada diluição em placas de Petri; adicionar o ágar derretido depois de esfriá-lo; agitar levemente e deixar endurecer;
H = em poucos dias surgirão colônias isoladas em uma das placas, ou em mais;
I = realizar a subcultura nas placas.

Decorridos alguns dias de incubação, surgirão colônias com densidades variadas, dependendo da diluição feita. Nas placas preparadas com as diluições mais altas, os organismos crescerão em colônias individuais, que se desenvolvem presumivelmente de esporos ou de células bacterianas isoladas. A estimativa mais precisa da concentração de um organismo numa amostra é obtida em diluições que promovem o surgimento de 50 a 100 colônias por placa. A quantidade presente na amostra original pode ser calculada aproximadamente, selecionando-se as placas que apresentam 40-100 colônias e anotando-se a contagem das colônias. De posse dessa informação, realiza-se o seguinte cálculo:

Quantidade de colônias, por grama de amostra original =

$$\frac{\text{número de colônias/placa}}{\text{fator de diluição}}$$

(5) *Isca* - Inúmeros fungos possuem exigências nutricionais bastante específicas e são especializados no uso de materiais que outros utilizam com dificuldade ou não utilizam. Tira-se vantagem desse fato introduzindo determinada substância no ambiente para colonização e, posteriormente, recuperando-a para isolamento do fungo que a colonizar. Alguns produtos normalmente utilizados como iscas são: cenoura, pedaços de maçã, madeira e pólen.

(6) *Inoculação do hospedeiro* - Quando os materiais infectados se encontram severamente contaminados, ou há dificuldades para isolar o organismo usando-se meios comuns, ou no caso de parasitos obrigatórios, pode-se purificar o organismo através da inoculação direta do hospedeiro. Desta forma, selecionam-se só os organismos parasitas.

Isolamento de patógenos do solo

(1) *Método de plaqueamento* - Colocar pequenas porções do solo suspeito de conter o patógeno numa placa com meio de ágar, usando a ponta de uma espátula ou escalpelo esterilizados numa chama de álcool. Após, colocam-se as placas numa incubadora, observando-as em intervalos regulares. As placas com solo original normalmente são preparadas num meio não nutritivo, como ágar-água.

O desenvolvimento do fungo é menos intenso em ágar-água do que em BDA e é mais fácil transferir partes das colônias individuais do primeiro do que do último. Quando o patógeno é um fungo, o crescimento das bactérias contaminantes pode ser evitado acidificando-se o meio, conforme indicado na seção Tipos de Meios de Cultura. Quando o patógeno a ser isolado for uma bactéria, usar o ágar nutritivo ou outro meio especial (vide seção sobre Tipos de Meios de Cultura e consultar as fórmulas no Apêndice) acrescentando-se um fungicida (benomyl ou cycloheximide), a fim de se evitar a contaminação com fungos não desejáveis.

(2) *Método de diluição* - Misturar bem o solo com água esterilizada e deixar assentar. Após, observar procedimento similar ao indicado na seção Técnica de Diluição: misturar bem um volume de sobrenadante com nove volumes de água, obtendo uma diluição de 1/10; fazer várias diluições seriadas adicionais e acrescentar um volume pequeno e conhecido a uma placa de Petri esterilizada. Colocar o meio de ágar fundido, já resfriado a aproximadamente 37°C, nas placas. Um ou dois dias depois, pode-se repicar, individualmente, as colônias de organismos para outros meios de cultura.

(3) *Método de armadilha ou de isca* Usando o procedimento indicado na seção de Isca nos Métodos de Isolamento, verifica-se, por exemplo, que um dos fungos do solo mais facilmente isolável com essa técnica é *Thielaviopsis basicola*: algumas partículas de solo são colocadas sobre a superfície de uma rodela de cenoura esterilizada, as placas são incubadas e podem ser observadas uma semana mais tarde.

DESCONTAMINAÇÃO DE CULTURAS

Aspectos gerais

A contaminação de culturas é sempre um problema a ser enfrentado no laboratório. Os piores contaminantes, normalmente, são os fungos, porém as bactérias e as leveduras também podem ocorrer, principalmente quando se tentam isolamentos de produtos naturais. As colônias de bactérias e de leveduras desenvolvem-se na superfície das culturas novas e simplesmente suprimem o crescimento destas últimas. Os actinomicetos também podem aparecer nas culturas: eles produzem grandes quantidades de esporos e são difíceis de eliminar.

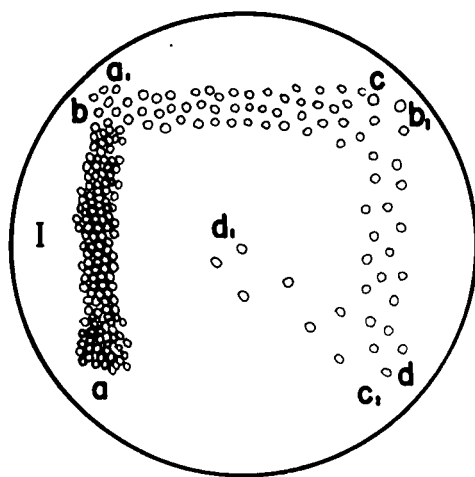
A contaminação pode originar-se de fontes diferentes. Primeiramente, a área de trabalho deve ser mantida a mais limpa possível, conforme indicado na seção sobre Esterilização. No entanto, apesar de a limpeza ser essencial, esta não evita completamente a contaminação. Caso não se obtenha uma cultura pura, mediante o uso das técnicas anteriormente discutidas (vide seção de Isolamento de Fungos e de Bactérias de Tecido Vegetal Infectado), será necessário utilizar um dos procedimentos de "descontaminação". Há duas formas de se realizar a purificação de culturas: mecânica ou química. Na primeira, o organismo em questão é separado fisicamente do restante, enquanto, na segunda, depende da fisiologia do organismo. Com freqüência, podem-se obter vantagens com o uso simultâneo destas técnicas.

Métodos mecânicos

O modo mais simples de separação de fungos é distribuir seus esporos sobre o meio de cultura, de modo que as colônias resultantes não se desenvolvam juntas durante certo período. O método de estria em placa é usado com essa finalidade.

Método de estria em placa - É um procedimento muito simples e confiável, usado para separar bactérias ou fungos dos propágulos de outros organismos (Fig. 8). Consiste em colocar a mistura de esporos em um lado de uma placa de Petri com ágar (é melhor utilizar 2,5 % de ágar, a fim de tornar o meio firme e fácil de

estriar sem perfurar a superfície com a alça) e estriar aquele lado para cima e para baixo, até que os esporos se encontrem uniformemente espalhados ao longo de uma linha. Esterilizar a alça, deixa-la esfriar e fazer uma segunda estria em ângulo reto em relação à primeira, ao longo do outro lado da placa. Dessa operação resulta uma segunda linha contendo menos esporos do que a primeira. Repetir esse procedimento uma terceira vez, fazendo surgir uma outra linha. Caso seja necessário, traçar uma quarta linha, cuidando para que esta não cruze sobre a primeira. Decorridos um ou dois dias, uma das estrias apresentará várias colônias isoladas que podem ser transferidas. As estrias iniciais estarão muito populosas e as subseqüentes mais diluídas.



(Fonte: Malloch, 1981)

Fig. 8. Técnica de estriagem. O inóculo de esporos (I) é estriado entre os pontos a-a1; usando uma alça esterilizada, traçar uma segunda estria entre b-b1, observando ângulo reto em relação à primeira estria, seguindo um terceiro ângulo reto entre c-c1. Fazer uma quarta estria, d-d1, no centro. Cada estria posterior contém menos esporos e colônias resultantes do que aquela que a precedeu.

Este procedimento pode ser realizado também de modo um pouco diferente (Fig. 9). Traçar a primeira estria até que esta quase atinja a metade da placa. Esterilizar a alça e estriar para frente e para trás, em ângulos retos em relação à primeira estria. Não estriar repetidamente numa mesma área; tracejar uma linha em zigue-zague. Girar a placa 90° e repetir a operação com a alça esterilizada. Cuidar para não tocar na primeira estria. Girar a placa 90° mais uma vez e estriar novamente com uma alça esterilizada, tocando apenas nas últimas estrias feitas.

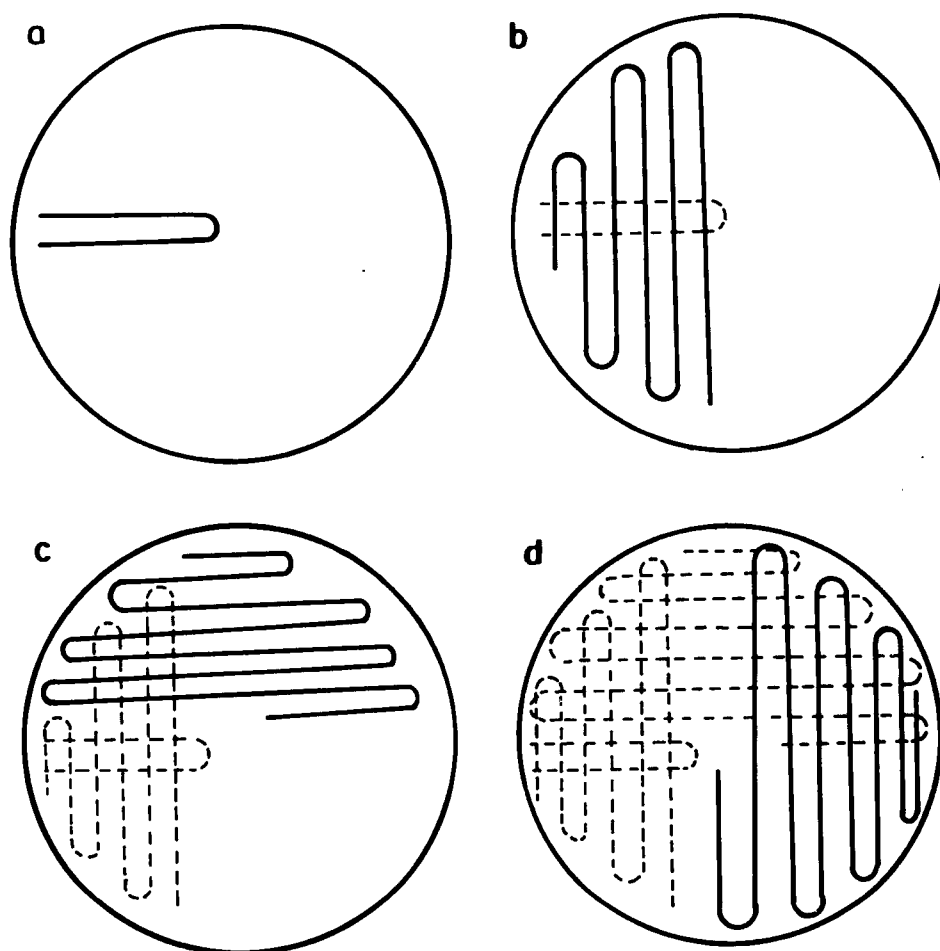


Fig. 9. Execução de estrias em meio de cultura em uma placa de Petri. As linhas contínuas indicam as novas estrias a serem feitas, e as linhas tracejadas mostram a localização das estrias feitas anteriormente.

Método de diluição - Pode-se atingir um resultado semelhante ao método de estria em placa usando-se diluições, conforme comentado na seção que trata das técnicas de isolamento. Este método mostrar-se-á mais útil do que a técnica da estriagem, nos casos em que as leveduras e as bactérias superem em crescimento o fungo que se deseja isolar. Entretanto, algumas vezes, o número de células de leveduras e de bactérias excede tanto ao de esporos do fungo desejado que as diluições tornam-se inúteis.

Método de inversão do ágar - Esta técnica pode ser utilizada para separar fungos de bactérias e de actinomicetos. Numa colônia mista de superfície que contenha fungos e bactérias, os fungos se desenvolvem para baixo, para dentro do ágar, enquanto as bactérias permanecem na superfície. Para inocular uma placa contendo ágar nutritivo padrão, espalhar uma suspensão de esporos em sua superfície. Com um escalpelo, remover um anel convexo de ágar na parte lateral da placa e inverter todo o disco de ágar restante, a fim de que sua superfície repouse de modo perfeitamente plano na base da placa de Petri. Após a incubação, o fungo se desenvolve através do ágar para produzir micélio aéreo na superfície, enquanto as bactérias e os actinomicetos são confinados à interface entre o ágar e a base da placa.

Métodos químicos

Podem-se usar, também, produtos químicos ou explorar diferenças nutricionais existentes entre os microorganismos. A técnica básica consiste em usar antibióticos para desestimular as bactérias, conforme já foi discutido (vide seção sobre Tipos de Meios de Cultura). O meio Rosa de Bengala de Martin contém o corante Rosa de Bengala, que atua como inibidor do crescimento de bactérias e de muitos fungos, podendo ser adicionado a qualquer meio. Os meios seletivos também podem ser usados, dependendo do fungo que se pretende isolar (vide fórmulas no Apêndice 2).

Ácaros

Os ácaros constituem um dos piores agentes de contaminação. Eles são se-

res diminutos, por vezes com menos de 0,1 mm de comprimento, e podem assumir cores diversas. Aqueles que mais comumente contaminam as culturas são de coloração branca a creme e se movem com lentidão. Alimentam-se de fungos e movem-se de uma colônia para outra, deslocando, neste processo, esporos de fungos e de actinomicetos e células bacterianas. Uma vez instalados numa coleção de culturas, são extremamente difíceis de serem controlados; normalmente, deve-se retroceder e reisolar todas as culturas, a fim de purificá-las. Às vezes, todas as culturas podem ser perdidas.

Se houver ácaros numa placa ou tubo, separá-la(o) das(os) demais imediatamente e procurar isolar o fungo numa cultura pura, livre de ácaros, colocando-a durante vários dias numa caixa vedada contendo naftalina ou paradiclorobenzeno. Estas substâncias provocarão a morte dos ácaros, preservando os fungos, embora os agentes contaminadores introduzidos pelos ácaros igualmente sobrevivam. É melhor livrar-se da cultura contaminada, esterilizando a placa ou o tubo.

ISOLAMENTO MONOSPÓRICO

Após isolar-se um fungo de um hospedeiro, é altamente recomendável que se purifique a estirpe, de modo a se obter uma série de culturas de esporos individuais. Este procedimento assegura a presença não só de uma única espécie, mas, também, de uma única raça da espécie.

Observam-se os seguintes passos: distribuir os esporos contidos numa gota de água na superfície do ágar (3 a 4 %), usando uma alça de Drigalsky ou uma espátula. Após a germinação, com o auxílio de microscópio, localizar um esporo separado. Usando uma agulha histológica ou uma microlança, cortar um pedaço do ágar que o contém. Transferi-lo, então, para uma placa de Petri ou para um tubo com ágar. Cuidar para não encostar o pedaço de ágar ou o instrumento de transferência em nada que possa contaminá-los. Este método pode ser utilizado no laboratório, sem necessidade de uma câmara de esterilização.

Outro método usado é o isolamento de colônias individuais derivadas de esporos isolados. Após preparar uma placa de isolamento com esporos bem dispersos, conforme indicado antes, estes são localizados com a placa invertida, marcando-se aqueles adequadamente isolados. Incubar a placa e deixar desenvolver até que as colônias se tornem visíveis. Com um pequeno escalpelo, remover cada colônia livre de contaminação para um meio de ágar adequado.

POSTULADOS DE KOCH OU REGRAS DE PROVA DA PATOGENICIDADE

Quando um patógeno é detectado numa planta doente, ele é identificado por referências existentes em manuais especiais; caso se confirme que esse é relatado para aquela espécie vegetal, o diagnóstico da enfermidade pode ser considerado completo. 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:

- (1) O patógeno tem que ser encontrado associado às plantas doentes examinadas;
- (2) O patógeno deve ser isolado e cultivado em cultura pura;
- (3) O patógeno da cultura pura deve ser inoculado em plantas sadias da mesma espécie ou da mesma variedade da qual foi isolado e na qual deve produzir o mesmo tipo de sintoma encontrado anteriormente;
- (4) O patógeno deve ser reisolado em cultura pura e suas características devem ser exatamente iguais às aquelas observadas no item 2.

Se todos os passos acima forem seguidos com resultados positivos de inoculação, o patógeno isolado é apontado como o agente responsável pela doença.

O uso desses postulados exige testes rigorosos com plantas testemunhas adequadas, não inoculadas e não tratadas, submetidas a idêntico rigor como as plantas inoculadas ou tratadas. Via de regra, é necessário repetir os experimentos para se estabelecer sua validade.

Os postulados de Koch são viáveis com alguns patógenos, tais como fungos, bactérias e nematóides. Por outro lado, como os vírus e os fungos biotróficos não podem ser cultivados em meios de cultura artificiais, é mais difícil a prova de patogenicidade pela observação estrita dos postulados de Koch. No entanto, isto é possível pela inoculação em plantas sadias com técnicas especiais (vide seção de Parasitas Obriótizos).

TÉCNICAS PARA A INOCULAÇÃO DE PLANTAS

Com a finalidade de testar a patogenicidade dos fitopatógenos, de estudar os processos de infecção ou para qualquer outro propósito experimental, são realizadas inoculações artificiais no laboratório, em casa de vegetação e no campo.

Preparo do inóculo de fungos e de bactérias

O inóculo de fungos ou de bactérias é preparado pelo cultivo em meio de ágar (vide seção sobre Preparo de Meios de Cultura), em placas de Petri ou em frascos, conforme comentado anteriormente. Dependendo do patógeno, esse inóculo pode se desenvolver em outro substrato, por exemplo, em grãos de trigo. Outros grãos, integrais ou moídos grosseiramente, que proporcionam fontes nutricionais satisfatórias são a aveia, a cevada, o centeio, o arroz, a ervilha, o feijão e a soja (desidratados ou naturais). Por exemplo, para se obter grandes quantidades de inóculo de certos patógenos, como *Gibberella zeae*, um substrato comumente utilizado é o colmo da planta de milho, e para *Helminthosporium sativum* são os grãos de sorgo. Observa-se o seguinte procedimento no preparo de inóculo de partes vegetais: colocam-se cerca de 25 ml de água e 8 g de grãos num frasco Erlenmeyer de 150 ml de capacidade. Os grãos são deixados de molho por 16 h, decantando-se o excesso de água e, depois, levados à autoclave por 30 minutos ou mais. Após esfriar, introduz-se assepticamente uma suspensão de esporos ou uma parte de ágar com o patógeno no substrato e este é incubado durante uma semana, aproximadamente. Deve-se acrescentar água esterilizada ao substrato, caso este comece a secar. A fim de estimular a esporulação e de evitar a formação de micélio, os frascos devem ser agitados manualmente, durante alguns segundos, todos os dias.

Pode-se, também, preparar o inóculo de bactéria em meios de cultura líquidos, agitando-os continuamente durante o seu desenvolvimento, a fim de provocar a aeração e a renovação de nutrientes na superfície do meio.

Preparo da suspensão de inóculo e estimativa de sua concentração (densidade do inóculo)

As suspensões de esporos de fungos e de células de bactérias podem ser preparadas do seguinte modo: acrescentar um volume conhecido de água destilada esterilizada às placas de Petri, aos tubos de ensaio ou aos frascos que contêm o patógeno em cultivo. Os frascos e os tubos são agitados para se obter uma suspensão de esporos. No caso de placas e também de tubos de ensaio, os esporos dos fungos ou as células das bactérias são transferidos para a água pela raspagem do substrato, usando-se um escalpelo flambado. A suspensão em água de todas as colônias a serem utilizadas pode ser coletada num recipiente esterilizado, determinando-se o volume final. Tendo em vista que uma quantidade razoável de micélio, ou de outros materiais que não sejam esporos, é normalmente transportada junto, é necessário filtrar a suspensão através de uma ou de mais camadas de gaze, dependendo do tamanho e da morfologia dos conídios. No caso de bactérias desenvolvidas em cultura líquida, elas devem ser separadas dos meios por centrifugação ou por filtração.

Para se estimar a concentração de esporos, deve-se fazer uma contagem destes usando uma câmara de Neubauer, também denominada hemocitômetro, utilizada na contagem de células sanguíneas, assim como o é na de esporos e na de células de algas (Fig. 10). Essa câmara é formada por uma lâmina de microscópio especial, mais espessa do que as comuns, dotada de uma câmara com 0,1 mm de profundidade. A base de cada uma dessas câmaras é marcada com uma grade "Neubauer" de 9 mm quadrados (3 mm de cada lado), subdivididos em nove quadrados principais de 1 mm de lado. Para determinar a concentração de esporos numa suspensão, coloca-se uma gota desta sobre a grade e abaixa-se, cuidadosamente, uma lamínula sobre ela, de forma que não haja formação de bolhas de ar entre a lâmina e a lamínula. Se os esporos forem grandes, conta-se sua quantidade em cinco câmaras, as quatro dos cantos e a do meio. Tendo em vista que o volume em cada quadrado principal é de $0,1 \text{ mm}^3$, a concentração de esporos, em quantidade de esporos por ml, é calculada da seguinte maneira: a soma de esporos em cinco quadrados principais X 2000. Se os esporos forem pequenos, usa-se o quadrado central principal, que é subdividido em 25 quadrados pequenos de 0,2 mm

de cada lado. Cada um desses, por sua vez, é dividido em 16 quadrados menores, com 0,05 mm de cada lado. Calcula-se, então, a quantidade de esporos por ml do seguinte modo: quantidade de esporos no quadrado central principal X 10.000. Pode-se simplificar essa operação, contando-se a quantidade de esporos em apenas uma parte do quadrado principal. Por exemplo, se apenas cinco quadrados pequenos forem contados, calcula-se o número de esporos por ml assim: soma de esporos em cinco quadrados pequenos X 50.000; ou, se oito quadrados pequenos forem contados: soma de esporos em oito quadrados pequenos X 31.250.

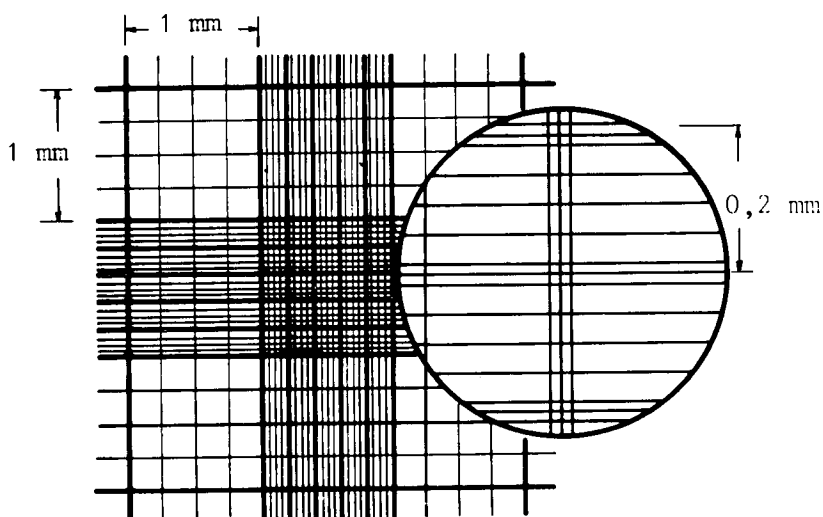


Fig. 10. Grade "Neubauer" - Os quadrados principais são de 1 mm e os secundários são de 0,2 mm.

A suspensão de esporos pode, então, ser ajustada àquela concentração desejada, através da fórmula: $V_f = V_i \times \frac{C_e}{C_d}$, onde: V_f = volume final da suspensão; V_i = volume inicial conhecido da suspensão; C_e = concentração de esporos encontrada com a câmara de Neubauer; e C_d = concentração de esporos desejada.

Inoculação de folhas e de colmos com fungos e com bactérias

Se as bactérias ou os fungos que estão sendo usados são capazes de penetrar diretamente ou através de aberturas naturais, a infecção ocorrerá após a suspensão das células da bactéria, ou de esporos do fungo, ter sido depositada sobre a superfície, por exemplo, da folha de uma planta suscetível, desde que as condições ambientais tenham sido satisfeitas. As folhas, os colmos e outros órgãos aéreos das plantas podem ser inoculados com suspensões de esporos de fungos ou de células de bactérias da seguinte maneira (Fig. 11): acrescenta-se uma gota de agente umidificante, como Tween 20, à suspensão dos esporos do fungo ou de bactéria (preparada conforme indicado antes). A suspensão é colocada num atomizador limpo com o qual se pulverizam as plantas. Essas plantas devem ser mantidas numa câmara, ou numa sala com a temperatura próxima à ótima, para o desenvolvimento do inóculo usado. A maioria dos esporos dos fungos e muitas células de bactérias exigem umidades relativas próximas a 100 %, para melhor desenvolvimento nas áreas de infecção, bem como para penetração e para infecção subseqüentes. Portanto, as plantas inoculadas, normalmente, têm que ser mantidas em câmaras úmidas, sob campânulas, ou envoltas em sacos plásticos umedecidos, durante 12-48 horas, após a inoculação. No caso das bactérias, obtêm-se melhores resultados quando as plantas são inoculadas em casa de vegetação, de preferência entre as 9 horas da manhã e as 3 horas da tarde, período em que é mais provável que seus estômatos encontrem-se abertos.

Para inocular plantas com fungos ou com bactérias que causam infecções sistêmicas (como os organismos que provocam murcha), nos casos em que as infecções permanecem localizadas (como no carvão do milho), e quando a penetração ocorre apenas através de lesões (como na galha da coroa), podem-se injetar suspensões de esporos de fungos ou de células de bactérias nos tecidos suscetíveis da planta, com o auxílio de uma agulha hipodérmica esterilizada. Plantos infectados com esses organismos também podem ser inseridos nos colmos, para que a inoculação tenha êxito.

Se forem necessários ferimentos para que ocorra a penetração, pode-se usar uma agulha esterilizada com algodão absorvente enrolado em sua volta. Mo-

lha-se a agulha numa suspensão de inóculo do patógeno usando-a, em seguida, para perfurar a planta, deixando, desta forma, uma gota de suspensão no orifício.

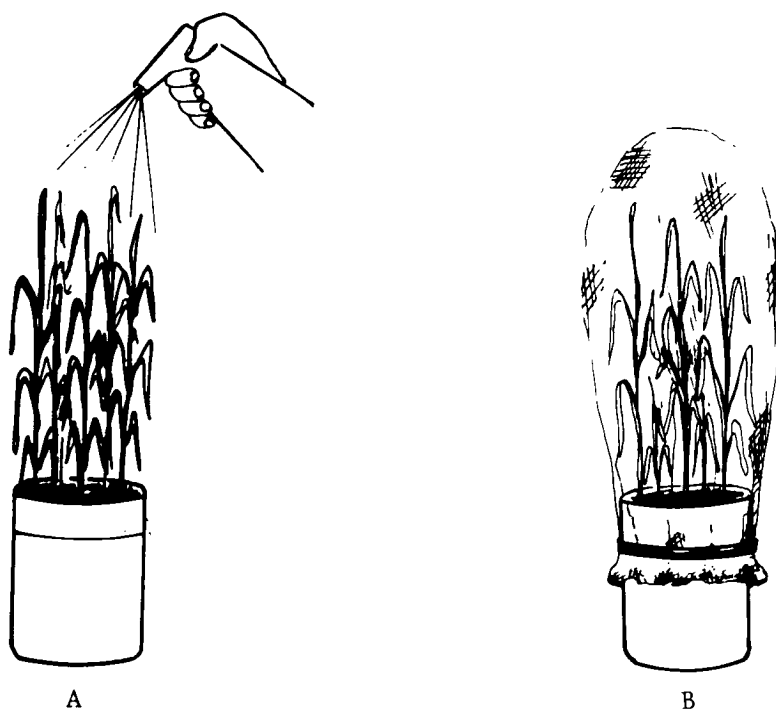


Fig. 11. Inoculação de plantas por atomização. (A) Pulverizar uma suspensão de células bacterianas ou de esporos de fungo sobre as plantas usando um atomizador. (B) Cobrir as plantas com um saco plástico umedecido, a fim de manter alta umidade.

Para inocular espigas de trigo com *Gibberella zeae*, o agente causal da giberela, usa-se uma agulha hipodérmica, injeta-se uma gota da suspensão de esporos, com cerca de 4×10^3 conídios/ml, na espigueta central, durante a antese. Normalmente, inoculam-se duas a três espigas por planta. Após, mantêm-se as plantas numa temperatura aproximada de 25°C e alta umidade, conforme comen-

tado anteriormente.

Inoculação de plantas com patógenos de raízes e do solo

No caso de fungos que causam tombamento ou murcha, ou de fungos e de bactérias que invadem as raízes, pode-se incorporar o inóculo ao solo no qual são colocadas as sementes ou as plantas. Podem ser usados os seguintes tipos de inoculação: suspensões de células de bactérias ou de esporos de fungos, um pequeno quadrado de meio de cultura infectado com os organismos, micélio de fungos triturado com água num liquidificador, ou fungos desenvolvidos em grãos esterilizados de cereais.

Ambientes controlados

Há uma grande quantidade de estruturas e de equipamentos, variando desde as casas de vegetação até as câmaras de crescimento, que podem ser utilizados para controlar o ambiente, especialmente a temperatura, a luz e a umidade. Esses equipamentos diferem em sua capacidade e em sua eficiência no controle de cada um desses parâmetros e seu custo varia consideravelmente.

COLETA E PRESERVAÇÃO DE PLANTAS INFECTADAS

O material para exames futuros pode ser mantido como cultura viva ou como material seco. Muitos espécimes podem ser mantidos sob refrigeração, um pouco acima de 0°C. Os patógenos desses espécimes podem ser isolados após um período de armazenamento de várias semanas. O material a ser armazenado deve ser cuidadosamente selecionado no campo e envolvido em papel encerado, ou colocado em sacos de plástico. Essas coleções podem ser acondicionadas em latas grandes, ou em jarras de vidro, e armazenadas.

Alguns materiais são armazenados em melhores condições se forem prensados e desidratados. O material vegetal pode ser mantido temporariamente entre folhas de jornal ou em sacos de plástico e, após, transferido para uma prensa, onde é desidratado; posteriormente, pode ser armazenado, sob baixa umidade, num refrigerador.

Às vezes, pode ser necessário guardar o material molhado. O formol-ácido acético-álcool (FAA) é um bom agente mortífero e fixador. Para o preparo do FAA, mistura-se 5 ml de formalina comercial + 5 ml de ácido acético glacial + 90 ml de etanol a 50 % ou 70 %. Após um tratamento de uma hora, pelo menos, com FAA, pode-se armazenar o material permanentemente em formalina comercial a 5 %.

MANUTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE CULTURAS

Uma vez obtida uma cultura pura, e que esta esteja se desenvolvendo bem num recipiente adequado, ela pode ser armazenada. Não há um método universal para a conservação de fitopatógenos. A escolha do método deve basear-se na natureza do patógeno, nas vantagens e nas desvantagens de cada método e nas instalações disponíveis.

Fungos

Culturas de ágar em temperatura ambiente ou em refrigerador - O método mais simples de armazenamento, para se manter um fungo numa forma viável e numa cultura pura, consiste em transferi-lo a intervalos determinados para tubos de cultura com meios de ágar, recentemente preparados. Este método de preservação por transferências periódicas exige meios que permitam: um mínimo de crescimento do micélio e um máximo de esporulação; que as transferências sejam realizadas usando-se esporos (as transferências de micélio devem se restringir a fungos que não esporulam); que as transferências sejam feitas apenas das porções mais jovens da colônia; e, que, se forem utilizados tubos de cultura com tampa rosqueada, não se aperte muito a tampa.

No entanto, as culturas armazenadas em temperatura ambiente exigem constantes cuidados e atenção em sua manutenção, pois tendem a secar rapidamente, dependendo do clima local. O período de tempo entre as transferências das culturas de ágar, em tubo de ensaio, para os meios recém preparados, varia conforme o tempo de sobrevivência do fungo e depende da temperatura de armazenamento e da umidade. Quando o material é armazenado em condições que permitem uma rápida desidratação das culturas, as transferências devem observar intervalos curtos. Sempre é aconselhável que se armazenem culturas em estoque em dois locais diferentes, em amostras duplicadas, para assegurar a manutenção da cultura e evitar perdas.

Os fungos insensíveis ao frio devem ser refrigerados, entre 4° e 10°C, depois de a colônia haver coberto a superfície de ágar. Nessas condições, a

taxa de crescimento, o desenvolvimento excessivo do micélio aéreo e a secagem do fungo são reduzidos. Para evitar ou reduzir ainda mais a secagem das culturas armazenadas, passa-se o tubo numa chama e empurra-se o tampão de algodão para a posição logo abaixo da boca do frasco, cobrindo-a com tampas de metal, com folha de alumínio, com plástico ou com parafina. No caso de baixa temperatura, isto diminui a necessidade de se transferir os fungos para novos meios, quando comparado à temperatura ambiente, porque essas culturas permanecem viáveis durante mais tempo. Normalmente, o período de transferência varia entre seis e oito meses. As culturas também podem ser preservadas, com sucesso, colocando-as em congelamento profundo (-10° a -20°C). Um freezer doméstico atende satisfatoriamente essa finalidade. Em qualquer um desses métodos, considerando-se que alguns fungos são sensíveis ao frio, seria necessário manter duplicatas das culturas, por outros meios, durante pelo menos uma ou duas transferências, antes de se confiar no armazenamento a frio.

É importante lembrar que, quanto mais tempo o fungo for mantido na cultura em condições artificiais, maior será a possibilidade de ocorrerem alterações, não apenas nas suas características nutricionais e fisiológicas como também nas morfológicas. Um fenômeno comum que ocorre com fungos fitopatogênicos, mantidos em meios artificiais durante longos períodos, consiste na perda de sua patogenicidade ou, pelo menos, verifica-se um decréscimo em sua virulência. Depois de muitas transferências em vários meios, diminui a intensidade da esporulação. Além das alterações genéticas que podem ocorrer durante o processo de cultura, há uma profusão de nutrientes no meio que diferem dos nutrientes fornecidos pelo hospedeiro original ou pelo substrato. Essa modificação ou degeneração da cultura em estoque, com frequência, pode ser corrigida colocando-se o fungo em cultura, em condições de poucos carboidratos (por exemplo, no solo) ou no substrato original, ou passando por um hospedeiro vegetal adequado várias vezes, isto é, inoculando uma planta suscetível e reisolando o fungo.

Métodos para períodos prolongados - Para evitar as transferências frequentes de fungos, ou sua colocação em meios de cultura artificiais durante períodos

prolongados, podem ser usados os seguintes métodos:

(1) Discos de ágar em água esterilizada fria - Discos de inóculo retirados das margens da colônia são colocados em tubos com água esterilizada e armazenados no refrigerador. Ao se utilizarem novamente as culturas, retiram-se os discos da água, colocando-os em meios de ágar recentemente preparados.

(2) Conservação de culturas em meios em tubos de ensaio com o uso de óleo - Deve-se usar parafina refinada ou óleo mineral, após um período de esterilização de cerca de 45 minutos e da secagem com calor seco a 100°C. Em condições de assepsia, verte-se o óleo esterilizado sobre a cultura ativa em desenvolvimento. A cultura deve ser totalmente coberta pelo óleo, porém, este não deve cobrir a superfície da colônia de fungos em mais do que 1 cm, pois isto afetará a aeração. As culturas em óleo podem ser armazenadas à temperatura ambiente, num refrigerador ou numa câmara fria. Os tubos e os frascos têm que ser armazenados com a parte superior voltada para cima.

Para reativar as culturas, drenar o excesso de óleo, remover a massa de micélio com esporos e estriar num meio adequado. A primeira cultura desenvolver-se-á lentamente, devido à presença do óleo; serão necessárias duas a três transferências para se recuperar a taxa de crescimento original. Além disso, o excesso de óleo pode ser removido com água destilada, antes de estriar.

Esta técnica evita o ressecamento da cultura e reduz a taxa de metabolismo do organismo. No entanto, o crescimento ainda continua e, às vezes, ocorre variação nas características bioquímicas e morfológicas das raças conservadas durante longos períodos. É importante inspecionar regularmente a viabilidade dos isolados.

(3) Cultura desidratada - O patógeno pode ser cultivado em cultura e, quando as colônias se encontram plenamente desenvolvidas, o meio é retirado com um escalpelo esterilizado, colocado entre duas folhas de papel absorvente esterilizado e posto para secar num dessecador que contenha cloreto de cálcio ou outro dessecante, numa temperatura de 0° a 20°C. Após a secagem, o material é

colocado em recipientes lacrados e armazenado num refrigerador ou à temperatura ambiente, em baixa umidade. O período de sobrevivência é superior ao obtido com ágar.

(4) Conservação em palha ou em grãos esterilizados - Alguns fungos podem se desenvolver em palha ou em grãos esterilizados na autoclave. Esses materiais são inoculados com o fungo e, após a incubação, são dessecados, preferencialmente, num dessecador mantido num refrigerador. Após, os materiais são colocados num refrigerador ou num freezer.

(5) Conservação de culturas em solo ou em areia esterilizados - Em regra, esse método assegura a sobrevivência do fungo durante um longo tempo. O solo a ser usado deve passar pela autoclave durante uma hora, ou durante 20 minutos, em dois dias consecutivos. Duas variantes podem ser utilizadas:

a) Acrescentar uma suspensão de esporos, numa pequena porção de água esterilizada, ao solo seco esterilizado e, após, misturar no tubo, secar rapidamente ao ar, à temperatura ambiente, deixando a tampa frouxa durante alguns dias; após, guardar o material num refrigerador. Na realidade, isto é conservação de esporos.

b) Adicionar uma suspensão de esporos ao solo esterilizado umedecido e incubar este material, a fim de permitir o desenvolvimento do organismo. Desta forma, são mantidos o micélio e as unidades propagativas da segunda geração. A secagem ocorre lentamente.

(6) Liofilização ou secagem a frio - Este é um bom método de manutenção para a maioria dos fungos, especialmente daqueles que formam esporos em grande quantidade. O princípio da liofilização reside na redução do teor de água do esporo para 2 a 3 %, através da secagem a alto vácuo, e do armazenamento na ausência de oxigênio e de vapor de água. A secagem é realizada num estado de frio. Quando as células são secadas nessas condições, permanecem em dormência durante longos períodos e, ao serem reconstituídas ou retornarem aos meios normais, via de regra, desenvolvem-se bem.

As etapas básicas da liofilização são: a) pré-congelamento de uma suspensão de células; b) secagem a vácuo em estado congelado, à baixa temperatura; c) secagem contínua a vácuo, à temperatura ambiente; d) lacre das ampolas a vácuo.

Os organismos que serão liofilizados devem ser colocados em cultura sob condições ótimas. As culturas de fungos devem ser incubadas a fim de favorecer a esporulação e a maturação dos esporos. Normalmente, as suspensões de células são preparadas num colóide, como o leite desnatado ou soro, ou em glicose ou sacarose a 10 %. A maior parte dos uredosporos da ferrugem são liofilizados sem um colóide.

Bactérias

De um modo geral, em condições de laboratório, as bactérias fitopatogênicas retêm sua virulência durante um longo período de tempo, porém algumas espécies perdem sua viabilidade relativamente rápido. Em regra, as bactérias do gênero *Pseudomonas* são capazes de manter sua viabilidade por muitos meses, sem a necessidade de transferência, enquanto que as *Xanthomonas* perecem em uma ou duas semanas em meios bacteriológicos comumente utilizados.

Os métodos usados com maior frequência para a conservação de culturas são: óleo mineral e liofilização ou secagem rápida em estado frio, conforme anteriormente comentado para os fungos.

PARASITAS OBRIGATÓRIOS - FUNGOS CAUSADORES DE FERRUGENS

Aspectos gerais

Como os parasitas obrigatórios não podem ser cultivados em meios de cultura artificiais, as técnicas usadas em seu manuseio diferem de modo considerável daquelas descritas anteriormente. Somente os agentes causais das ferrugens serão discutidos nesta seção. As técnicas descritas serão aquelas comumente usadas com os fungos causadores de ferrugens do trigo, porém a maioria delas são aplicáveis, também, aos fungos de ferrugens de outras espécies de plantas.

Embora a maioria destes fungos produza cinco tipos distintos de estruturas frutíferas, com cinco formas diferentes de esporos, os uredosporos são os mais importantes na maioria dos estudos patológicos das ferrugens do trigo. Estes esporos são produzidos repetidamente na planta hospedeira, durante o crescimento desta.

Coleta de uredosporos

As seguintes técnicas podem ser utilizadas na coleta de esporos dos fungos causadores de ferrugens:

(1) *Manutenção em folha seca* - Esta é a técnica mais simples para a preservação de uredosporos e não requer equipamento especial. É empregada, principalmente, para coletas a campo e consiste em se cortar folhas com sintomas, colocando-as em envelopes de papel encerado. As folhas são, assim, prensadas e deixadas secar completamente. Não mais do que 6 a 8 folhas devem ser colocadas em cada envelope, de modo que a umidade seja reduzida e a prensagem facilitada. As folhas coletadas, normalmente, secam, de modo adequado, em 24 horas, à temperatura ambiente. Cuidado deve ser tomado para não se expor o material coletado à temperatura extremamente alta, em qualquer momento.

(2) *Remoção de uredosporos por batida da folha* - Os órgãos severamente infec-

tados são batidos com um bastão, enquanto mantidos sobre um funil, papel encerrado, folha de alumínio, ou outro recipiente qualquer. Os uredosporos, então, podem ser transferidos, por gravidade, para frascos próprios de armazenagem. Esta técnica requer relativamente poucos equipamentos e é útil nos casos em que grandes quantidades de uredosporos devem ser coletadas e quando não é necessário um grau elevado de pureza, como ocorre na coleta de esporos em casa de vegetação que se destinam a inoculações a campo.

(3) *Sucção* - Esta técnica requer frascos para coleta e equipamento para produção de vácuo. Oferece a vantagem de se ter os uredosporos acondicionados imediatamente, em condições ideais de armazenagem, logo após a coleta, reduzindo-se, assim, o tempo de manuseio e o risco de contaminação. A massa de uredosporos deve ser secada antes de ser armazenada. A exposição por 24 h à temperatura ambiente e à umidade relativa moderada é, normalmente, suficiente para a sua secagem.

Preservação de uredosporos

Uma vez que a viabilidade dos esporos dos fungos causais de ferrugens decresce com o tempo, é sempre importante mantê-los em condições de temperatura e de umidade relativa baixas. As coleções de uredosporos, sob refrigeração, permanecem viáveis por três a seis meses. Em climas secos, a secagem ao ar por 24 a 36 h geralmente é suficiente. Em áreas mais úmidas, um dessecador pode ser necessário, de modo preferencial, para substâncias como o cloreto de cálcio ou a sílica gel. Os esporos devem ser secados, no laboratório, sem receber calor solar. Para preservação por tempo longo, recomenda-se a liofilização (vide seção de Manutenção e Preservação de Culturas).

Multiplicação do inóculo dos fungos causadores de ferrugens

A multiplicação do inóculo dos fungos causadores de ferrugens pode ser feita pela inoculação artificial de plântulas ou de plantas adultas. As plântulas, desenvolvidas em vasos ou em bandejas, em casa de vegetação, são inocu-

ladas no estágio de primeira folha. Os esporos são coletados quando a infecção atinge seu desenvolvimento máximo, normalmente 10 a 14 dias após a inoculação sob condições ótimas. A multiplicação do inóculo pode ser obtida mais rapidamente, empregando-se plantas adultas em vez de plântulas. As plantas cultivadas em vasos, em casa de vegetação, devem ser inoculadas no estágio de perfilhamento ou de emborrachamento.

O inóculo das ferrugens é coletado usando-se qualquer uma das técnicas descritas anteriormente.

Inoculação de plantas com os fungos causadores de ferrugens

Antes da inoculação, as folhas são esfregadas brandamente, para remover a camada de cera existente em sua superfície.

(1) *Atomização de suspensão de esporos* - Uma suspensão de uredosporos em óleo ou em água, à qual o agente umidificante foi acrescentado (uma a duas gotas de Tween 20 por litro de água), é pulverizada levemente sobre as plantas com um atomizador.

(2) *Inoculação com espátula ou com espátula-lâmina* - Esta é uma técnica útil quando se tem pequena quantidade de inóculo disponível. Os uredosporos de preservações secas, ou os de uma única pústula em folhas verdes, são transferidos diretamente com o emprego de uma espátula, cuja ponta tenha sido umedecida com água estéril, para as folhas a serem inoculadas. Deve-se tomar cuidado para não ferir a folha. Outra opção consiste em transferir, com a espátula, os uredosporos para uma pequena gota de água sobre uma lâmina de microscopia e, então, distribuí-los sobre a superfície da água por agitação enérgica com a ponta da espátula. A seguir, os esporos são transferidos para as folhas, umedecidas previamente, pela distribuição das gotículas de água sobre a superfície da folha, usando-se o dedo polegar, ou o indicador, para suporte da folha contra a lâmina. Tanto as mãos como a espátula devem ser limpas antes de cada inoculação. A imersão da espátula em acetona proporciona esterilização satisfatória.

(3) *Inoculação com cotonete* - Os esporos são colocados numa extremidade do cotonete. Posteriormente, uma gota de água ou de óleo mineral é acrescentada a ele. Os esporos são, assim, transferidos para as folhas pelo esfregamento com o cotonete.

(4) *Inoculação por imersão* - Esta é uma técnica fácil e rápida para a inoculação de um pequeno número de plantas, quando se dispõe de quantidades limitadas de uredosporos. Estes são postos a flutuar na superfície da água contida num beaker ou num copo descartável. As plântulas a serem inoculadas, cultivadas em vasos, são invertidas e as folhas imersas dentro da suspensão. Os uredosporos aderem às folhas no momento em que elas são retiradas da água.

(5) *Inoculação pelo esfregamento de folhas* - Quando se dispõe, como inóculo, de plântulas com a frutificação ativa, a inoculação é feita pela inversão das plântulas infectadas sobre as plântulas a serem inoculadas e por esfregamento leve das folhas umas contra as outras. Esta é uma técnica útil quando se tem muitas plantas para inocular e quando se dispõe de grande quantidade de inóculo.

(6) *Inoculação com pincel* - Um pincel pequeno, de pêlo de camelo, pode ser usado para a distribuição de uma suspensão de esporos em água sobre as folhas.

Após as plantas terem sido inoculadas com qualquer uma das técnicas anteriormente descritas, elas são cuidadosamente pulverizadas com água e mantidas sob alta umidade relativa, no mínimo de 6 a 8 horas, em ambiente escuro, à temperatura de 18°C a 25°C. Findo o período de incubação, as plantas devem ser mantidas sob fotoperíodo de 12 horas.

EXAME MICROSCÓPICO

Aspectos gerais

Muitos fungos e suas estruturas são prontamente visualizados através de um microscópio de dissecação ou lupa. O tecido infectado ou a placa de ágar podem ser observados diretamente com este tipo de microscópio, sem haver inversão de imagem. Os detalhes das estruturas dos fungos e a relação desses patógenos com os tecidos e com as células da planta hospedeira são mais bem observados por meio do microscópio composto (vide seção de Microscopia).

As características de desenvolvimento de uma colônia de fungos em cultura, num meio de ágar, podem ser observadas, diretamente, através do microscópio, colocando-se a placa de Petri, sem a tampa, sobre a platina do microscópio, tendo ou não sido colocada uma lamínula sobre a margem de avanço da colônia de fungos. Os organismos e suas estruturas também podem ser observados preparando-se lâminas de microscópio. Pode-se preparar uma lâmina de microscópio sem perturbar a colônia, colocando-se uma lamínula esterilizada sobre a superfície do ágar numa placa de Petri, dispondo-a próxima a uma cultura em desenvolvimento, de modo que a hifa cresça por cima da superfície da lamínula. O micélio, ao atingir uma área de baixa nutrição, freqüentemente, é estimulado para produzir esporos. Decorridos 1 ou 2 dias, pode-se retirar a lamínula e invertê-la numa solução de montagem adequada, ou examiná-la ao microscópio diretamente. As estruturas fúngicas também podem ser montadas nas lâminas diretamente do meio de ágar (vide seção de Montagem e Coloração de Fungos para Exame Microscópico).

Técnica de cultura em lâminas

Algumas variações do exame microscópico incluem a colocação de culturas de ágar em lâminas de microscópio (Fig. 12). A técnica de cultura em lâminas é útil para se determinar o modo pelo qual os esporos são produzidos, bem como para se observar as características do micélio, dos esporos e dos esporóforos. As estruturas de esporulação não são perturbadas e os esporos permanecem liga-

dos aos esporóforos, facilitando sua identificação. Assim, este método se torna especialmente útil naquelas estruturas que tendem a se desintegrar durante a montagem.

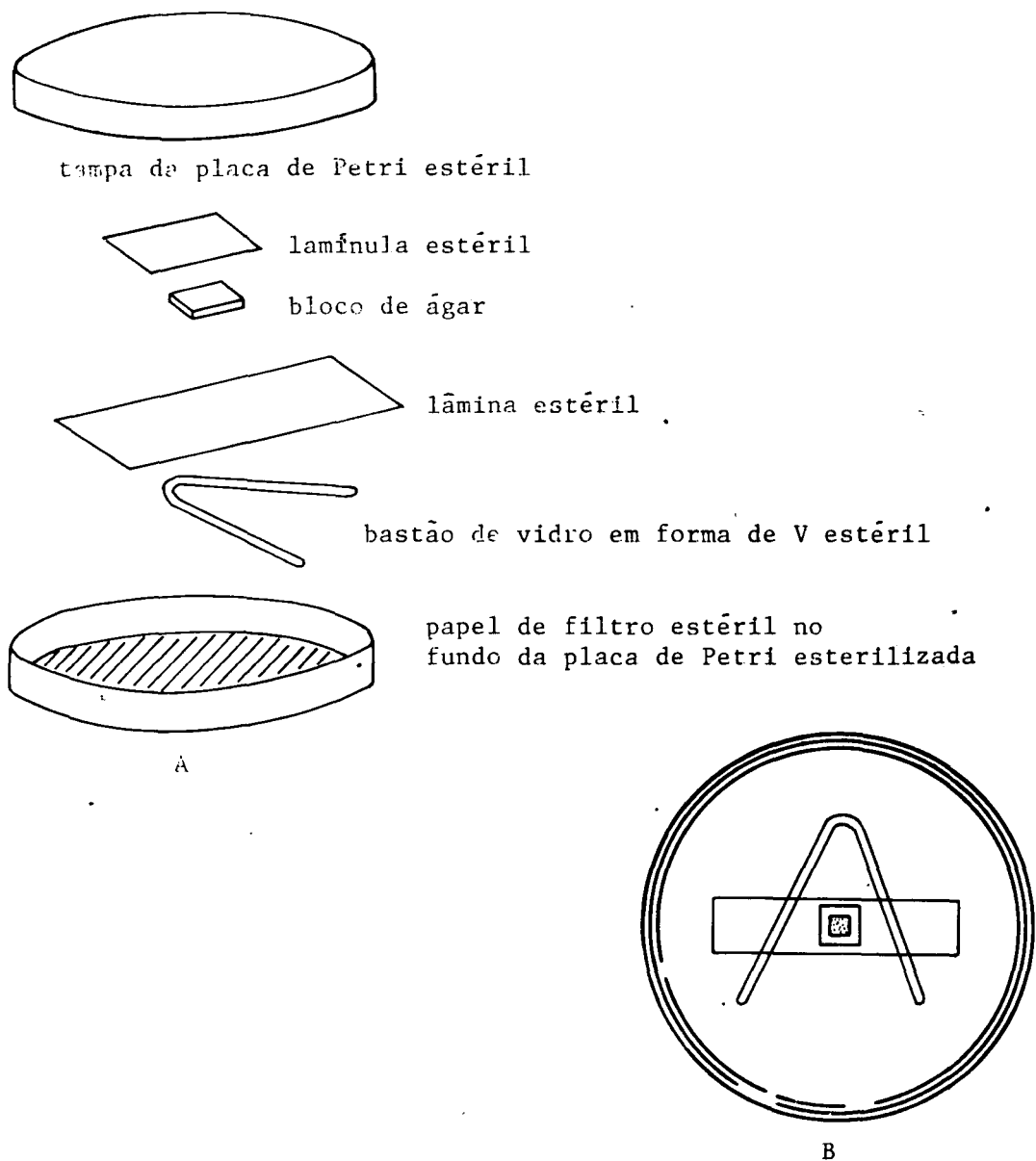


Fig. 12. Diagrama esquematizado para o preparo de cultura em lâminas (A); visto de cima (B).

Colocam-se dois discos de papel filtro umedecidos numa placa de Petri, sobre os quais são dispostas uma vareta de vidro em forma de V, uma lâmina de microscópio e uma lamínula. A placa de Petri e o seu conteúdo são autoclavados. Usando-se um escalpelo esterilizado, corta-se o ágar-água, ou o BDA (2-3 % de ágar), colocado em placas de Petri, em quadrados menores do que a lamínula. Após, transfere-se um bloco de ágar para a lâmina esterilizada da placa de Petri. Pequenas porções de micélio ou de esporos são transferidas assepticamente de uma cultura do fungo para o ponto mediano de cada um dos quatro lados do bloco de ágar, recobrando-o, após, com a lamínula esterilizada. Umedece-se o papel de filtro com uma solução aquosa de glicerina a 5 %, ou com água, para manter a umidade na placa. As placas são mantidas a 20° - 25°C durante alguns dias, para permitir o crescimento do fungo em direção à lamínula e a esporulação. O bloco de ágar é descartado e a lamínula é montada numa gota de solução de montagem adequada, numa lâmina limpa. Os fungos desenvolvidos na lâmina também podem ser montados.

Alternativamente, o fungo pode ser cultivado numa camada de 1,5 mm de espessura de um meio de ágar adequado, colocado numa placa de cultura. Retira-se uma pequena parte de ágar da margem da colônia em desenvolvimento, colocando-a em incubação numa lâmina esterilizada. Cobre-se o bloco de ágar com uma lamínula grande e esta é colocada numa placa de cultura esterilizada e revestida com papel filtro umedecido, conforme indicado anteriormente. Quando se verificar um crescimento adequado, observar o procedimento acima.

As culturas também podem ser estabelecidas em películas de ágar, como segue: colocam-se uma ou duas gotas de ágar derretido no centro de uma lâmina, que é mantida dentro de uma placa de Petri, espalhando-as numa camada fina sobre o terço central ou sobre a metade, usando a margem de outra lâmina. Obter-se-á uma película mais uniforme, aquecendo-se a placa e a lâmina sobre uma lâmpada. Após o ágar haver solidificado, os esporos e o micélio são colocados na película de ágar e esta é posta na incubadora. Pode-se examinar o desenvolvimento do fungo ao microscópio em qualquer momento, diretamente, com baixa ou com alta magnificação, colocando-se uma lamínula flambada na área selecionada. O material pode ser cuidadosamente retirado com uma agulha flambada, antes de se recolocar a lâmina na placa de Petri.

MONTAGEM E COLORAÇÃO DE MICROORGANISMOS PARA EXAME MICROSCÓPICO

Fungos

De um modo geral, usa-se água da torneira ou água destilada no preparo das montagens para o exame preliminar de tecidos infectados ou da estrutura dos patógenos. A água utilizada para fins de montagens deve encontrar-se livre de sedimentos. Caso seja guardada num frasco conta-gotas, a água deve ser substituída com frequência, tendo em vista que, mesmo neste tipo de recipiente, ela acumula detritos rapidamente. Para a montagem do material raspado da superfície das lesões: colocar uma gota d'água numa lâmina limpa; mergulhar a ponta limpa de um escalpelo afiado na gota d'água, raspar levemente a superfície da lesão e transferir esse material para a gota na lâmina (é essencial que a ponta do escalpelo não contenha esporos de manipulações anteriores). Retirar o excesso de água com um papel de filtro, com papel-toalha limpo ou com papel absorvente. Cobrir e examinar.

O exame microscópico preliminar de estruturas de fungos, inseridas internamente em tecido vegetal, pode ser preparado com montagens esmagadas: colocar uma gota d'água, ou de outro fluído de montagem, numa lâmina limpa; usando a ponta limpa de um escalpelo, retirar uma pequena parte do tecido que contém a estrutura fúngica (como picnídio ou peritécio) e mergulhá-lo na gota; partir o tecido com um escalpelo e esmagá-lo com o lado plano do instrumento; cobrir e esmagar com uma pressão leve ou bater na lamínula com o cabo do escalpelo.

Para preparar montagens de fungos em culturas de ágar, colocar uma gota do meio de montagem, ou de água, numa lâmina; usando uma agulha de dissecação, ou de inoculação, retirar uma pequena porção da colônia, próxima à margem, removendo-a juntamente com uma camada fina da superfície de ágar. Se a colônia estiver espessa e lanosa, talvez não seja necessário retirar o ágar. Colocar a parte da colônia no meio de montagem e, com o auxílio de uma segunda agulha, raspá-la para que os filamentos fiquem bem espalhados. Colocar uma lamínula sobre a montagem, baixando um lado antes do outro para permitir a saída de bolhas de ar.

Em regra, é bastante difícil umedecer o micélio aéreo com água, em decorrência da alta tensão superficial. Conseqüentemente, quando o micélio é montado em água, para exame ao microscópio, verifica-se que boa parte dele encontra-se entremeado com bolhas de ar, prejudicando a visibilidade. Caso o micélio seja antes imerso numa solução de baixa tensão, como glicerina a 50 %, as bolhas de ar são retiradas. Pode-se, então, imergir o micélio em água e examiná-lo.

Existem outras soluções para montagem que podem ser usadas com fungos. Algumas dessas colorem o material ou é possível adicionar-lhes um corante, caso se deseje. As estruturas de fungos tornam-se mais claras e aparentes se forem montadas em soluções como lactofenol-azul de algodão, KOH ou fucsina acidulada. Uma ou duas gotas desses produtos são acrescentadas à lâmina e o material é depositado sobre o líquido de montagem, conforme descrito anteriormente, e, após, é coberto com uma lamínula. O material também pode ser montado em água e a solução pode ser adicionada à montagem, colocando-se uma gota da solução na lâmina, na margem da lamínula. Após, a gota da solução é absorvida por baixo da lamínula, usando-se um pedaço de papel de filtro que é colocado em contato com a água na margem oposta da lamínula.

Soluções para montagem e para coloração

Abaixo são apresentadas algumas soluções para montagem e para coloração.

- (1) Glicerina-água: uma mistura de 50 % de glicerina pura e 50 % de água destilada;
- (2) Meio de Hoyer: solubilizar 30 g de goma arábica em 50 ml de água e adicionar 200 g de cloral hidratado. Deixar a solução em repouso durante vários dias, agitando-a ocasionalmente, até que o material se dissolva. Acrescentar 20 g de glicerina. É útil tanto para montagens temporárias como para permanentes;
- (3) Solução de KOH (hidróxido de potássio): usar uma concentração de 2 a 10

%. Tendo em vista que um precipitado desenvolve-se rapidamente, quando mantido num frasco, a solução deve ser filtrada antes do uso. A solução de KOH mostra-se especialmente útil nos casos de espécimes desidratados; para raspagens de lesões de material desidratado, para o exame direto dessas lesões com microscópio binocular e para o amaciamento de tecidos desidratados em geral;

(4) Lactofenol: 20 g de fenol (cristais), 20 ml de ácido láctico, 40 g de glicerina e 20 ml de água destilada. Aquecer em fogo brando para obter uma rápida mistura no preparo deste meio. É útil não apenas como meio de montagem, mas atua, também, como solução mortífera e fixadora. Restaura a turgidez do material desidratado. Armazena-se melhor o lactofenol em frascos de vidro marrom escuro. Certos corantes podem ser adicionados à mistura (vide abaixo);

(5) Lactofenol - azul de algodão: 100 ml de lactofenol, 1 a 5 ml de solução aquosa de azul de algodão a 1 % e 1 a 2 ml de ácido acético glacial;

(6) Lactofenol - fucsina acidulada: 100 ml de lactofenol, 1 a 5 ml de solução aquosa de fucsina acidulada a 1 % e 1 a 20 ml de ácido acético glacial;

(7) Lactofenol - anilina azul + fucsina acidulada: 10 ml de lactofenol, 1 a 5 ml de fucsina acidulada, 1 a 5 ml de anilina azul (de solução aquosa a 1 %) e 1 a 20 ml de ácido acético glacial;

(8) Lacto-fucsina: 0,1 g de fucsina acidulada em 100 ml de ácido láctico;

(9) Misturas de corantes de fenol: adicionar a 15 ml de fenol, 0,5 a 1 ml de solução aquosa de anilina azul a 1 %, ou de fucsina acidulada, e 4 ml de ácido acético a 30 %. Em fenol-ácido fucsínico, pode-se acrescentar 2 ml de FeCl_3 a 30 %. Se ocorrer excesso de coloração, substituir a mistura de corantes por lactofenol, adicionando-o a um lado da lâmina e retirando-o do outro lado com papel absorvente;

(10) Azul de trypan: dissolver 0,1 a 0,5 g de azul de trypan em 100 ml de áci-

do acético a 45 %. Os espécimes de paredes finas colorem-se rapidamente, porém, no caso de fungos que têm paredes espessas, pode-se apressar o processo pelo aquecimento. Depois disso, substituir o corante por lactofenol;

(11) Solução de Melzer: 100 g de cloral hidratado, 5 g de iodeto de potássio, 1,5 g de iodo e 100 ml de água destilada. A coloração do amido torna-se azulada e, desse modo, muitas estruturas que se tornam azuis são consideradas positivas para a reação amilóide. Aquelas cuja coloração é vermelha, são positivas para a reação dextrenóide;

(12) Floxina a 1 %: 1 g de floxina em 100 ml de água destilada. Filtrar antes de usar. Colore de vermelho o citoplasma das hifas;

(13) Vermelho congo a 1 %: 1 g de vermelho congo em 100 ml de água destilada. Filtrar antes de usar. Colore as paredes das células das hifas.

(14) Azul de tolueno: 0,5 g de azul de tolueno em 100 ml de etanol a 70 %, para observação dos núcleos de fungos. Pode-se melhorar o contraste entre os núcleos e o citoplasma, adicionando-se etanol ou água destilada ao material colorido.

Tendo em vista que muitas dessas soluções são prejudiciais às lentes da objetiva do microscópio, estas não devem ser atingidas. Se isso ocorrer, limpe-as cuidadosamente e, em seguida, use água destilada. Nas lentes difíceis de limpar, pode-se usar xileno (consulte as instruções de manuseio na seção de Segurança).

Montagens permanentes

Para se fazer uma preparação permanente, deve-se ter o cuidado de usar, de forma precisa, as quantidades certas dos líquidos de montagem para que, quando a lamínula for colocada, o líquido flua apenas para a beira da lamínula e não para fora desta; caso contrário, será impossível realizar a operação de lacre. A lamínula utilizada deve ser a menor possível.

Neste momento, lacrar a lamínula com a lâmina, usando esmalte de unhas, passando uma camada fina de esmalte incolor ao redor da lateral da lamínula. Deixar secar e passar uma segunda camada por cima. As camadas subseqüentes devem ser aplicadas com esmalte colorido, pois este é mais encorpado e mais fácil de visualizar. Deve-se aplicar até que a beira afiada da lamínula não seja mais visível como uma saliência na camada de esmalte. As lâminas cuidadosamente lacradas desta forma durarão muitos anos.

Bactérias

Algumas soluções corantes.

(1) Coloração negativa, de fundo ou de contraste - Esta técnica demonstra a presença, o tamanho e a forma das bactérias patogênicas em tecido vegetal infectado. Uma gota de 2 % da solução corante vermelho congo em água destilada é colocada numa lâmina limpa. Uma pequena parte (1-2 mm²) do tecido infectado é retirada, com um escalpelo esterilizado, da margem do tecido sadio e do infectado e colocada na gota da solução de vermelho congo, onde é cortada e esmagada com o escalpelo. Agitar para distribuir bem as bactérias pelo corante. Após um a dois minutos, as bactérias já se difundiram e as partes do tecido são retiradas da lâmina e a solução corante que resta é espalhada numa película fina sobre a lâmina. Deixar o corante secar, sem aquecê-lo. A película seca recebe duas a três gotas de álcool ácido (três gotas de HCl concentrado em 30 ml de etanol a 95 %). O álcool ácido faz com que o corante se torne azul. Deixar o álcool evaporar. Adicionar uma gota de óleo de imersão à porção colorida da lâmina; esta é examinada diretamente com as lentes de óleo de imersão do microscópio, sem cobrir com a lamínula. Caso não se tenha lentes de óleo de imersão, uma gota de óleo mineral coberta com a lamínula pode ser usada com lente de alta magnificação. As bactérias aparecem como células não coloridas (brancas), curtas, em forma de vareta, contra um fundo azul. Se o corante não for espalhado em camada bem fina sobre a lâmina, esta aparecerá preta ou azul escuro forte e as bactérias não serão visíveis. Caso se use muito tecido vegetal no preparo da lâmina, o corante pode ser precipitado e não proporcionar o

resultado esperado. Para se determinar o tamanho e a forma de um patógeno, podem-se usar bactérias de uma cultura de ágar, em vez de tecido vegetal.

(2) Azul de metileno - Preparar uma solução diluída das bactérias de uma cultura de ágar numa pequena gota d'água sobre uma lâmina limpa. Espalhar esta gota numa área de bom tamanho, usando a agulha de inoculação. Deixar a água evaporar e, após, passar a parte inferior da lâmina rapidamente por uma chama de gás, para que as bactérias adiram à lâmina. Aplicar uma gota do corante à mancha, deixando em repouso durante alguns minutos. O corante é preparado com 0,3 g de azul de metileno e 30 ml de álcool etílico, dissolvidos e misturados com 100 ml de água destilada.

(3) Coloração de Gram - As bactérias podem ser identificadas, com base nas características da colônia, em certos meios de ágar e em testes-chave, como a coloração de Gram. As características do corante de Gram estão relacionadas com as propriedades estruturais e químicas das paredes das células e servem como um passo rápido e básico na identificação de bactérias fitopatogênicas.

Observar o seguinte procedimento:

a) secar ao ar uma película de bactérias, espalhada bem fina numa lâmina limpa, sem aquecer. As bactérias devem ser retiradas de uma colônia com 18 a 24 horas de desenvolvimento em ágar. Aquecer levemente a parte inferior da lâmina duas vezes para a fixação das bactérias;

b) preencher a mancha com uma solução corante de violeta gensiana (2 % de violeta gensiana e 1 % de oxalato de amônio em água destilada), durante um minuto;

c) decorrido este tempo, enxaguar em água corrente da torneira durante alguns segundos, retirar o excesso de água e secar levemente com papel-toalha;

d) preencher a mancha com uma solução de iodo (1 g de I elementar e 2 g de KI em 300 ml água destilada), durante 1 minuto;

e) drenar a lâmina e adicionar gotas de etanol a 95 % a uma das extremidades da lâmina, enquanto ela é mantida inclinada para que o etanol escorra sobre a sua superfície. Continuar a lavar até que o álcool fique incolor, indicando que o corante parou de sair. Se isto for feito durante muito tempo, as bactérias Gram-positivas perdem a cor.

f) secar;

g) enxaguar em água corrente durante uns 2 segundos;

h) recobrir a lâmina com solução de safranina (2,5 % de safranina em etanol a 95 %), durante 30 a 60 segundos, a fim de obter a contracoloração das bactérias;

i) lavar, brevemente, em água corrente da torneira. Secar com papel absorvente e examinar em imersão de óleo.

O processo de coloração de Gram separa as bactérias em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas retêm o corante violeta primário, depois de serem lavadas com álcool, apresentando uma coloração que varia de púrpura a azul escuro. As bactérias Gram-negativas perdem a coloração violeta após a lavagem com álcool e adquirem a cor de contracoloração.

Os aspectos mais importantes da coloração são: uso de reagentes com menos de um ano de fabricação (se a solução de iodo não for acondicionada num frasco de vidro marrom escuro, ou armazenada num local escuro, o produto perde a cor e a eficácia); uso de bactérias recentemente desenvolvidas, idealmente na fase exponencial (as células em fase estacionária podem apresentar uma reação Gram-variável); uso de grupos positivos e negativos conhecidos para fins de controle; as manchas de bactérias têm de apresentar grupos bem distintos, devendo-se evitar aglomerados.

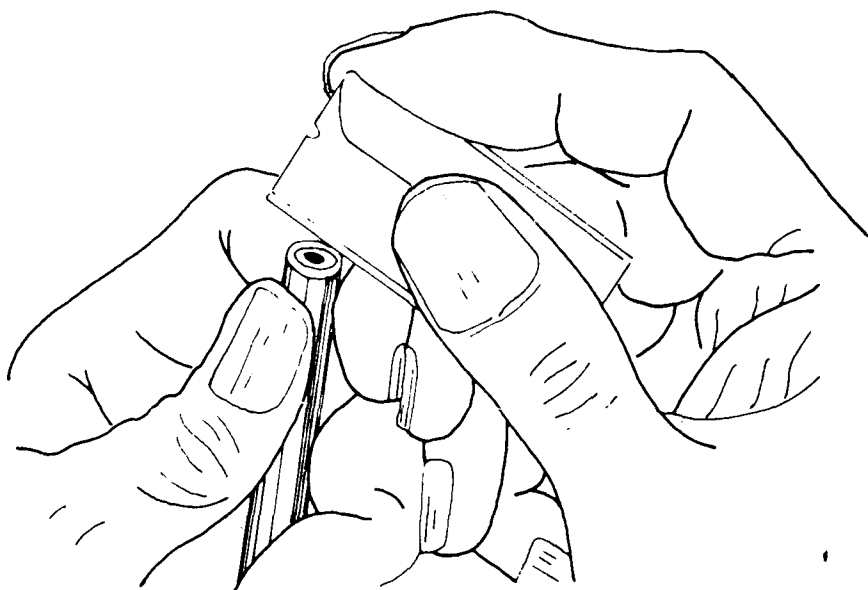
EXAME DA RELAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO COM MICROSCOPIA ILUMINADA

As relações patógeno-hospedeiro podem ser estudadas usando-se cortes à mão livre, fixados ou não, ou montagens inteiras. A fixação do tecido pode ser feita usando-se o FAA, conforme indicado na seção de Coleta e Preservação de Plantas Infectadas. Para outros métodos de fixação, consulte as fontes apropriadas.

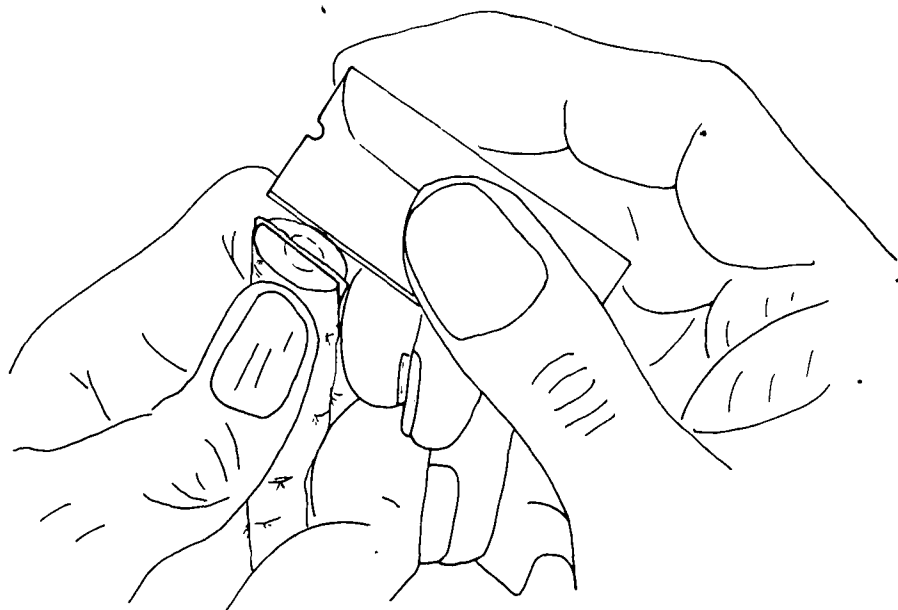
Cortes à mão livre

Os cortes à mão livre podem ser usados para a observação de fungos parasitas, no interior dos tecidos do hospedeiro, ou para o exame de corpos frutíferos dos fungos maiores. Se o material a ser seccionado for suficientemente firme e grande (colmos frescos, pedaços de frutas, raízes, folhas grossas), segure-o firmemente entre o polegar e o indicador, projetando um pouco a superfície a ser cortada e, ajustando uma lâmina bem afiada no dedo indicador, corte-o com um movimento oblíquo na direção do operador (Fig. 13). Não tente realizar um corte completo através de toda a espessura do material; corte as secções em forma de cunha e tão finas quanto possível. Corte vários segmentos, antes de retirar a lâmina. Essas secções acumular-se-ão na lâmina. Transporte as secções para a água ou para o corante a ser usado, num vidro de relógio ou numa placa de Petri. Às vezes, a operação pode ser facilitada se a superfície do material for mantida úmida com gotas d'água. Com a alça de transferência ou com uma pinça curvada, transfira os segmentos mais finos para uma gota d'água - ou para outro fluído de montagem - colocada numa lâmina limpa. Cubra com a lamínula e examine.

Se o material a ser seccionado for mais frágil, como é o caso dos espécimes desidratados, das folhas finas ou dos colmos finos, proceda do seguinte modo: usando um escalpelo afiado, separe, até uma profundidade de 1,5 cm, ou mais, um pedaço quadrado de cenoura, ou de outro material que possa ser usado como apoio, e insira o espécime na fenda, dirigindo-o. Segurando firme o pedaço de cenoura entre o polegar e o indicador, coloque a lâmina na parte superior do dedo e corte a cenoura e o espécime com um movimento em direção ao



A



B

Fig. 13. Corte à mão livre de material vegetal = (A) colmos, raízes, frutos e folhas espessas; (B) para cortar folhas delicadas e colmos finos, usa-se um pedaço de cenoura ou outro material de apoio.

operador. Após, prossiga segundo descrito acima. Geralmente, a operação é facilitada embebendo-se o material a ser seccionado em água ou em KOH diluído, antes de inseri-lo na fenda.

Os cortes de material vegetal também podem ser feitos com um micrótomo.

Coloração dos cortes à mão livre.

Os espécimes não fixados podem ser colocados numa placa com uma solução corante, como vermelho de rutênio (0,01 % de solução aquosa), ou azul de tolueno (0,05 % em solução tampão de fosfato 0,1 M, pH 6,8). O desenvolvimento do processo de coloração é observado ao microscópio. Quando se verificar uma coloração suficiente, o material é retirado e lavado, durante 1 ou 2 minutos, com água destilada e montado em glicerina ou em outro líquido de montagem.

Os cortes de tecido fixados podem ser coloridos com azul de algodão e/ou fucsina acidulada. Para colorir com fucsina acidulada, os segmentos são cobertos numa lâmina com lacto fucsina acidulada a 0,05 % e aquecidos numa chama, até que o líquido desprenda vapor, durante alguns minutos (não deixar ferver). O excesso de corante é drenado e coloca-se uma gota de azul de algodão a 0,25 % em lactofenol sobre cada segmento. Após, aquecer o material até que este solte vapor (sem ferver). O excesso de corante é lavado e a montagem é feita em glicerina.

Montagens inteiras

As montagens inteiras proporcionam uma compreensão mais clara das relações patógeno-hospedeiro em três dimensões, desde a germinação até a penetração e a colonização do tecido.

A clorofila e outros pigmentos da planta são extraídos fervendo-se o tecido ou o órgão vegetal em álcool a 80 % e, após, procedendo-se ao seu clareamento. Este processo oferece uma visão mais definida da hifa do fungo entre as células hospedeiras ou dentro dessas. Há métodos diferentes que podem ser usados na clarificação de tecido vegetal. É importante lembrar que o uso dessas

técnicas pode desalojar os esporos dos fungos ou as células das bactérias da superfície da folha.

(1) *Cloral hidratado* - O tecido vegetal permanece embebido numa solução aquosa saturada de cloral hidratado (250 g de cloral hidratado em 100 ml de água destilada) de um a sete dias. O aquecimento do espécime na solução de cloral hidratado apressa o processo de clarificação, porém tem de se usar chama bem branda. A coloração diferencial do tecido hospedeiro e do micélio é obtida dissolvendo-se azul de algodão a 0,1 %, ou azul de metileno, e fucsina acidulada a 0,2 %, na solução de cloral hidratado. Os espécimes já clarificados podem ser coloridos em azul de algodão a 0,1 %, ou em azul de trypan em lactofenol, e aquecidos de dois a três minutos. Usa-se, após, um líquido de montagem para montar os espécimes.

(2) *Lactofenol* - Os materiais vegetais são imersos num preparo de lactofenol (cristal de fenol: ácido láctico: glicerina; 1:1:1) durante 12 horas ou mais. Esses materiais podem ser coloridos com azul de algodão a 0,1 % ou com fucsina acidulada em lactofenol, de oito a dez horas, e, após, descoloridos em ácido láctico. Depois de enxaguados em lactofenol, os materiais são montados. A fervura em lactofenol, durante 15 a 30 minutos, torna os espécimes transparentes num período de tempo muito mais reduzido. Para clarear e colorir os espécimes em um só processo, mergulhe-os em lactofenol contendo azul de algodão a 1 % e cozinhe-os lentamente por, aproximadamente, três minutos. Os espécimes são enxaguados com água destilada e montados.

MICROSCOPIA

Microscópio de dissecação ou lupa

Este instrumento ótico é usado para observações de material vegetal infectado com magnificação relativamente pequena. Em sua amplitude inferior de magnificação, este aparelho apresenta o mesmo poder de lentes manuais, porém vai muito além em sua amplitude superior (x20-x100). Como a imagem não é invertida, este tipo de instrumento é empregado para dissecação, por exemplo, de estruturas de fungos de tecidos infectados para estes serem, posteriormente, observados sob magnificações maiores com o microscópio composto.

Microscópio composto

Este equipamento ótico produz uma imagem ampliada e detalhada que pode ser detectada pelo olho. Todo microscópio composto consiste de um sistema de lentes: a objetiva, que produz uma imagem ampliada de alta resolução, e um sistema de lente ocular, que amplia a imagem produzida pelas lentes objetivas, porém não melhora a resolução dessa imagem (Fig. 14).

(1) Fonte de luz - A fonte de luz tanto pode ser externa como interna. A fonte de luz deve estar associada à lente (o condensador do campo) para focalizar a imagem dos filamentos da lâmpada na íris localizada embaixo da platina (diafragma do condensador). A intensidade de luz é controlada pela íris de campo (=diafragma de campo = diafragma da lâmpada), situada em frente à lâmpada.

(2) Objetivas - As objetivas determinam a resolução do microscópio. Para qualquer aparelho, a resolução obtida depende do comprimento de onda da luz (quanto mais curto for o comprimento de onda, maior será a resolução) e da abertura angular das lentes objetivas. A abertura angular determina o ângulo do cone de luz que pode entrar na objetiva: quanto maior for o ângulo, maior será a resolução.

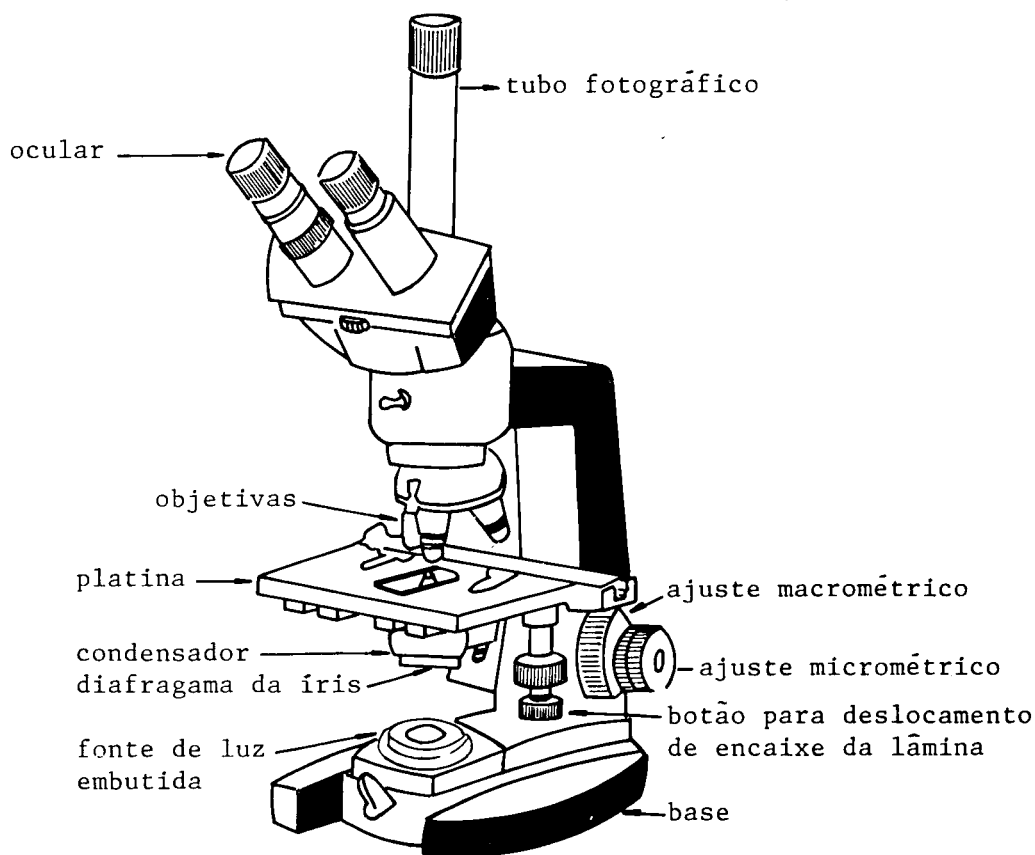


Fig. 14. Microscópio composto

A abertura angular das lentes objetivas é, normalmente, descrita em termos de sua Abertura Numérica (A.N.): $A.N. = i \text{ seno } u$, sendo $u = 1/2$ do ângulo do cone de luz de entrada e i = índice de refração do meio entre a objetiva e a lâmina.

Se há ar entre a objetiva e a lâmina, a A.N. maior do que 1 não pode ser alcançada [porque i do ar = 1, e o maior seno de u possível é 1 ($90^\circ = 1$)]. Na prática, a A.N. é limitada não somente pelo ar circundando a objetiva, mas também pelo vidro da lâmina usada para cobrir o espécime. Acrescentando-se óleo entre a lente objetiva e a lâmina, permite-se um u maior, o que

aumenta o poder de resolução e o brilho da imagem. O óleo também aumenta a resolução devido ao seu índice de refração ser mais alto. A alta resolução somente é importante quando são usadas objetivas de maior aumento; assim, as objetivas destinadas ao uso com óleo (objetivas de imersão em óleo), normalmente, têm um aumento de, no mínimo, 100 vezes. Nunca imerja a objetiva no óleo, a menos que tenha certeza de que ela seja própria para este fim.

(3) Condensador - A principal função do condensador é produzir um amplo cone de luz para a objetiva. Cada condensador tem uma A.N. máxima, a qual deve combinar, ou ser maior, com aquela da objetiva. Semelhantemente à objetiva, um condensador pode somente alcançar uma A.N. maior do que 1 se for acrescentado óleo entre ela e a lamínula. A função da íris, embaixo da platina, é ajustar a A.N. àquela apropriada para a objetiva em uso.

(4) Ocular - A lente ocular aumenta a imagem e a focaliza próxima ao olho. Não faz sentido aumentar a imagem além do necessário, para se ver todas as características que a resolução do microscópio pode visualizar. O aumento máximo útil da ocular, para qualquer objetiva, pode ser calculado através da fórmula: $1000 \text{ (A.N. da objetiva) / magnificação da objetiva}$. Aumentos maiores possibilitam uma imagem maior, porém não melhoram a resolução.

Ajuste do microscópio para iluminação de Köhler

Quando se ajusta um microscópio composto, procura-se reproduzir uma imagem de boa qualidade do espécime, para estudo ou para fotomicrografia.

Para uma melhor imagem, todos os microscópios de luz devem ser ajustados para a iluminação de Köhler, e o diafragma da íris ajustado à abertura numérica da objetiva.

(1) Ajustamento de um microscópio de aumento pequeno usando uma lâmpada comum externa com abertura fixa.

a) Colocar o microscópio de frente para o operador, com o braço voltado na

direção da pessoa e com a base em ângulo reto à mesa.

- b) Levantar o tubo com o ajuste macrométrico até que as objetivas estejam distantes da platina.
- c) Colocar a objetiva de 10 X na posição de uso.
- d) Colocar uma lâmina sobre a platina, de modo que o espécime localize-se no centro da abertura da platina.
- e) Colocar a lâmpada a, aproximadamente, 20 cm do espelho, de modo a refletir em seu centro em vez de iluminar a platina. Usar a superfície plana do espelho e o maior diâmetro da abertura de campo.
- f) Movimentar o condensador de baixo da platina para cima, o máximo possível, e colocar o diafragma da íris do condensador na posição de abertura máxima.
- g) Observar lateralmente e empregar o ajuste macrométrico para levar a objetiva de menor aumento (10 X) até cerca de 5 mm da lâmina.
- h) Remover a ocular e olhar para dentro do tubo do microscópio. Ajustar o espelho até que a fonte de luz esteja visível no centro do campo de visão.
- i) Reposicionar a lente ocular removida e olhar através dela, mantendo os dois olhos abertos. Vagarosamente, levantar o tubo do microscópio, com auxílio do ajuste macrométrico, até que o espécime na lâmina entre em foco.
- j) Deixar a objetiva focalizada e mover o botão de foco do condensador até visualizar os bordos da abertura de campo focados nitidamente.
- k) Ajustar o espelho para conduzir a imagem da fonte de luz ao centro do campo.
- l) Para obter a área correta da luz, iluminar o espécime e ajustar a distância da lâmpada ao espelho, de modo que a abertura de campo preencha apenas o campo. Reajustar o condensador de modo que a abertura de campo apenas desapareça do campo visual. Se o filamento da lâmpada ou a escrita na superfície do globo está em foco, desfocar o condensador levemente e essas imagens desaparecerão.

m) Para permitir que uma quantidade suficiente de luz entre na objetiva, ajustar o diafragma da íris do condensador do seguinte modo: remover a lente ocular e ajustar de modo que cerca de $3/4$ do fundo da lente objetiva sejam preenchidos com a luz. Repor a lente ocular.

(2) Alta magnificação usando objetivas secas (40 X).

a) Sempre iniciar o exame de qualquer lâmina com a objetiva de menor aumento. Isto permite o ajuste correto do microscópio e a seleção de uma área desejável para estudo detalhado.

b) Certificar-se de que a parte da lâmina a ser examinada está no centro de visão do campo de menor aumento. Se uma lâmina do tipo Lumley estiver sendo usada, girar a lâmpada de modo que a maior das duas aberturas no lado da lâmina esteja direcionada ao espelho. Centrar a imagem desta abertura no campo de visão e empregar o botão de focagem do condensador para se certificar de que a imagem está nitidamente focalizada.

c) Girar a objetiva de maior aumento (40 X) para a sua posição. Ao adotar este procedimento com a objetiva de 40 X, é recomendado observar, cuidadosamente, pelo lado, para certificar-se que ela não vai focalizar a lâmina.

d) Usar o botão de ajuste micrométrico para focalizar nitidamente o objeto. Quando usar aumentos maiores, manter os dedos no botão de ajuste micrométrico e movê-lo continuamente para a frente e para trás, por uma distância curta. Assim fazendo, podem-se ver partes do objeto a diferentes profundidades.

e) Ajustar o diafragma da íris do condensador pelo método usado para o menor aumento (item 1m).

(3) Aumento maior empregando objetiva de imersão em óleo.

a) Com o espécime corretamente iluminado e focalizado com a objetiva de 40 X, usar o espelho para selecionar a menor abertura de campo, centrando-o no campo de visão. Lentamente, girar a objetiva de imersão para a sua posição de uso e verificar se ela não vai encostar na lâmina.

b) Colocar uma gota de óleo sobre a lâminula, exatamente sobre a parte iluminada do espécime, e girar a lente de óleo, com cuidado, sobre a gota de óleo.

c) Focalizar o espécime cuidadosamente; é mais seguro levar a lente o mais próximo possível, observando lateralmente e, então, girar o ajuste micrométrico para cima até focalizar o espécime.

d) Ajustar o diafragma da íris do condensador e a abertura de campo, do mesmo modo como foi feito para as objetivas de 10 X e de 40 X (itens 1l e 1m).

e) Limpar as lentes secas com papel de boa qualidade. Não raspar com força sobre as lentes secas.

(4) Ajustamento de um microscópio avançado (com iluminação embutida ou com fonte externa de ajuste da intensidade luminosa e com abertura de campo variável).

a) Acender a lâmpada e ajustá-la a uma intensidade luminosa confortável.

b) Posicionar o espécime na platina.

c) Posicionar a abertura de campo e a íris do condensador em suas dimensões máximas.

d) Focalizar o espécime com a objetiva de 10 X.

e) Fechar a abertura de campo quase completamente. .

f) Usando o botão de focagem do condensador, focalizar a imagem da abertura de campo fechada, até que esteja razoavelmente nítida no lugar do espécime. Observar que a imagem do orifício desenvolve franjas fora do foco vermelho ao azul, à medida que é focalizado para cima e para baixo com o botão de focagem do condensador. A cor verde indica uma focagem adequada. Não desfoque o condensador para controlar a intensidade de iluminação.

g) Abrir a abertura de campo.

h) Remover uma lente ocular.

i) Examinar o plano focal de fundo da objetiva, olhando dentro do tubo. Fechar a íris do condensador, até que cerca de $3/4$ do campo da visão sejam mantidos claro. Com alguns microscópios binoculares, é difícil ver a imagem da íris do condensador no plano focal de fundo da objetiva. Neste caso, fechar completamente a íris do condensador, então abri-la lentamente e observar o aumento do círculo de luz. Haverá uma posição na qual, ao se abrir ainda mais o diâmetro da íris, não se aumentará mais o círculo de luz: fechar um pouco a íris a partir daquela posição.

j) Recolocar a lente ocular no tubo.

k) Fechar a abertura de campo, até que ela não mais projete luz sobre o campo de visão.

l) Ajustar a intensidade luminosa. Nunca mover o condensador ou a íris ou a abertura de campo para controlar a intensidade de luz.

m) O espécime está agora iluminado adequadamente para a lente objetiva de 10 X. Para qualquer outra objetiva de maior aumento (não envolvendo óleo de imersão), girar cuidadosamente a objetiva desejada para sua posição, cuidando para não tocar a lâmina ou o seu suporte. Focalizar o espécime, remover uma lente ocular, reajustar a íris do condensador, como descrito anteriormente (4i) (é necessário abri-lo quando se procede de aumentos menores para maiores), recolocar a lente ocular e fechar a íris da abertura de campo, conforme descrito anteriormente (k). Ajustar a intensidade, até encontrar a melhor resolução e o contraste mais adequado.

n) Para lente de imersão em óleo, certificar-se de que uma parte do espécime está no centro do campo visual, como visto com a última lente objetiva seca usada. Isto vai assegurar que há uma parte do espécime no campo visual que está sendo focado. Remover a lente seca para um lado, girando-a vagarosamente para a posição sobre o espécime; observar com atenção, olhando lateralmente, para ter certeza de que ela não encostará na lamínula. Agora, girá-la levemente para um lado e colocar uma gota de óleo de imersão sobre o espécime e, cuidadosamente, girar a lente até que esta entre em contato com o óleo e fique na posição correta de uso. Proceder a focagem do espécime. Remover a lente ocu-

lar, como já descrito, e proceder como em i a l. Sempre remover o óleo da lente e da lamínula ao findar o trabalho. Usar papel de lente para esta finalidade.

o) Para materiais vivos ou para aqueles sem corantes, ou nos materiais fixados fracamente corados, o contraste do espécime é tarefa difícil. Não sendo necessária uma resolução perfeita de um espécime, o qual não se pode ver por falta de contraste, pode-se sacrificar um pouco de resolução em favor do aumento de contraste. Se, pela seqüência dos procedimentos descritos nos passos a-1, não se pode ver o espécime sob baixas intensidades luminosas, fechar a íris do condensador. Não desfocar o condensador. Se o contraste do espécime ainda está muito fraco, pode ser necessário corá-lo, recorá-lo ou, talvez, usar um microscópio de contraste de fase ou microscópio de Nomarski.

Tipos de microscópios de luz

Os diferentes tipos de microscópios são:

(1) Campo brilhante - Como indicado anteriormente, as imagens produzidas pelos microscópios comuns de luz, em geral, carecem de contraste. O contraste entre as diferentes porções do espécime pode ser obtido tanto pelo uso de corantes como pelo uso de outros recursos óticos. Este último é particularmente útil na observação de células vivas.

(2) Campo escuro - O objeto é iluminado por um cone de luz oco, de tal modo que somente a luz dispersada pelo espécime entra na objetiva. Usando este tipo de ótica, os anéis de difração podem, algumas vezes, ser detectados a partir de objetos abaixo da resolução do microscópio.

(3) Contraste de fase - A mudança de fase, induzida pela diferença entre o índice de refração do espécime comparado ao do meio de montagem, é aumentada pela passagem de um cone de luz oco através do espécime e pela passagem de raios que não são difratados pelo espécime, através de um anel de fase. Isto altera os raios não difratados $1/4$ de um comprimento de onda adiante da luz

que não passa através do anel. Desde que, em média, um espécime retarda a luz difratada $1/4$ de um comprimento de onda, os raios difratados e os não difratados terminam uma metade de comprimento de onda fora da fase. A interferência entre a luz difratada e a não difratada produz uma imagem do espécime com contraste aumentado, porém com halos óbvios ao redor de cada estrutura.

(4) Contraste de interferência (Nomarski) - Este microscópio produz uma imagem de três dimensões, sem halos. É usada luz polarizada e o condensador divide o plano de luz em dois raios polarizados dispostos em ângulos retos. Estes viajam juntos e em paralelo através do espécime. Um prisma de Wöllaston combina os dois raios que, então, passam para o analisador. Este coloca os dois planos de vibração paralelos um ao outro, de modo que a interferência pode ocorrer. O efeito tridimensional é obtido porque os raios, passando muito próximos através do espécime, produzem um efeito estereoscópico. O grau de realce tridimensional é função das diferenças dos índices de refração nas bordas do espécime.

(5) Fluorescência - Este é o fenômeno pelo qual a luz de um comprimento de onda curto é absorvida por uma substância e é remetida num comprimento de onda mais longo. Em microscopia de fluorescência, a luz azul, ou ultra-violeta, é produzida pelo uso de uma lâmpada adequada e de filtros de excitação específicos que excluem a luz de comprimentos de onda indesejáveis. Após a passagem através do espécime, os comprimentos de onda correspondentes àqueles produzidos pelo filtro de excitação são impedidos de alcançar o olho por meio do filtro, enquanto que comprimentos de onda mais longos e específicos são deixados passar. A microscopia de fluorescência é popular devido à sua sensibilidade: os compostos fluorescentes, com frequência, podem ser detectados na concentração de um para mil (1:1000). Os materiais naturalmente fluorescentes (autofluorescentes) podem ser examinados, ou os fluorocromos específicos, que se ligam à substância de interesse, podem ser aplicados. A quantidade de substância presente pode ser determinada pelo grau de fluorescência.

CLASSIFICAÇÃO DOS MICROORGANISMOS

Aspectos gerais

Muitos organismos têm dois nomes, o comum e o científico. Algumas vezes, um organismo tem dois ou mais nomes comuns, mas somente um nome científico aceitável. O mesmo nome comum pode, também, ser usado para dois ou mais organismos diferentes.

O nome científico é chamado de binominal latino porque ele é composto de dois (bi) nomes em latim (nomem). O primeiro nome refere-se ao gênero e o segundo à espécie. O gênero deve sempre ser escrito com a letra inicial maiúscula. O binômio em latim deve ser italicizado, sublinhado ou grifado. Quando o binômio é repetido em um mesmo texto, freqüentemente o gênero, porém nunca a espécie, é abreviado, usando-se apenas a letra inicial (Ex. *Gibberella zeae* = *G. zeae*). Se um binômio é seguido por sobrenomes de pessoas, isto refere-se à história sobre como o organismo foi denominado. Por exemplo, o patógeno *Gibberella zeae* (Schw.) Petch nos diz que Schweinitz (abreviado para Schw.) foi o primeiro a descrever o fungo (porém como *Sphaeria zeae*, em 1822) e foi Petch (em 1936) quem classificou a espécie no gênero *Gibberella*. Os sobrenomes colocados após o nome de um fungo que não aparece entre parênteses, indicam que aqueles especialistas não só foram os primeiros a descrever o fungo, mas também classificaram a espécie num gênero que os micologistas e os fitopatólogos entendem estar correto. Mas, se alguém entender que a espécie se insere melhor em outro gênero (devido às mesmas características taxonômicas), esta pessoa pode, então, efetuar a transferência e os autores originais terão seus nomes colocados entre parênteses, seguidos pelo nome, ou nomes, daquele que transferiu a espécie para outro gênero, como foi o caso da *Gibberella zeae* (Schw.) Petch.

As espécies semelhantes são agrupadas dentro de um mesmo gênero, os gêneros semelhantes em famílias, as famílias em ordens e as ordens em classes. Cada uma destas divisões taxonômicas é um taxon (plural taxa). As taxa não são inalteráveis, pois são categorias criadas pelo homem e, assim, diferentes au-

tores agrupam diversificadamente os organismos, dependendo de qual característica cada um crê ser mais indicativa das relações naturais.

Fungos

Os fungos são organismos microscópicos que crescem sobre a superfície e no interior de praticamente todas as substâncias de origem animal ou vegetal. Os fungos são filamentosos, ramificados, com estruturas filiformes, tendo núcleos verdadeiros e desprovidos de clorofila. Por isso, não realizam a fotossíntese e têm de obter compostos de carbono reduzidos, tais como os açúcares, como saprófitas ou parasitas. Devido à falta de clorofila, os fungos são considerados pertencentes a um reino próprio.

A maioria das 100.000 espécies de fungos conhecidas são estritamente saprófitas, vivendo sobre matéria orgânica morta, a qual eles decompõem. Destes, 8.000 espécies podem causar doenças em plantas e, alguns destes, causam danos sérios a algumas culturas agrícolas. Todas as plantas são atacadas por algum tipo de fungo e cada parasita pode atacar uma ou mais espécies. Os fungos patogênicos variam quanto às exigências nutricionais, desde aqueles que podem crescer e multiplicar-se somente em associação com a planta hospedeira (parasitas obrigatórios ou biotróficos) a aqueles que podem extrair seus nutrientes de matéria orgânica morta, bem como de plantas vivas (parasitas facultativos, ou necotróficos).

Os filamentos individuais que formam o corpo vegetativo, ou talo, são as hifas. Estas são coletivamente chamadas de micélio. Em alguns fungos, as hifas são cenocíticas, isto é, não apresentam paredes ou septos dividindo-as em células. As hifas produzem ramificações especializadas e estruturas para sobrevivência em condições adversas (ex: clamidósporos e esclerócios), para absorção (ex. haustórios), e para a reprodução sexual ou assexual. As estruturas reprodutivas são, geralmente, formadas em um estado avançado do crescimento vegetativo e, muito freqüentemente, somente sob certas condições, diferentes daquelas que induzem o crescimento vegetativo.

A cadeia cíclica dos eventos que ocorrem quando um organismo se reproduz

é denominada ciclo de vida. O ciclo de vida pode ser assexual ou, numa maneira mais complexa, com ciclos múltiplos, envolvendo tanto a reprodução assexual como a sexual. A compreensão dos ciclos de vida dos fungos fitopatogênicos é importante, porque o avanço da doença requer a multiplicação do organismo causal. Os propágulos do organismo constituem o inóculo primário, o secundário e o de sobrevivência em seu ciclo de doença.

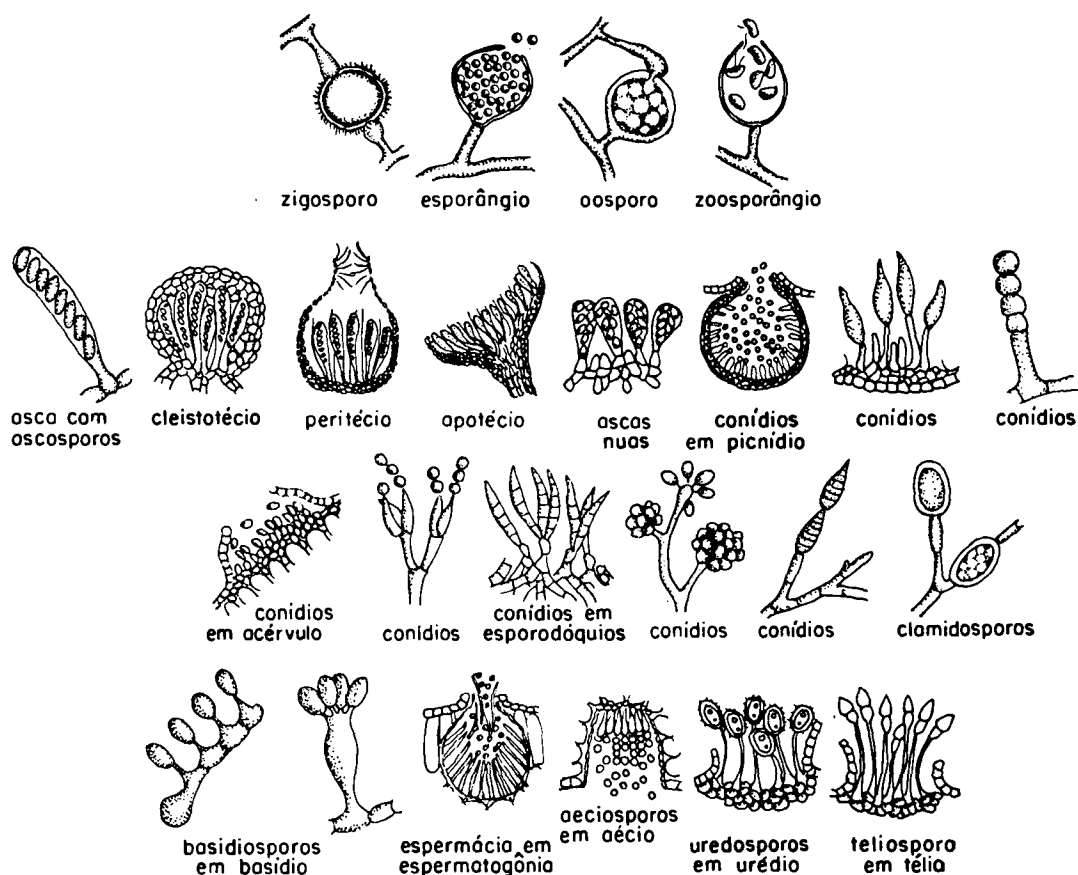
O ciclo sexual é a cadeia de eventos envolvidos na reprodução, através de mecanismos alternados de duplicação e de divisão do número de cromossomos da espécie. A função sexual envolve, normalmente, a fusão de organismos haplóides ou de hifas para formarem diplóides, os quais serão, subsequente, reduzidos a haplóides. Por outro lado, a reprodução assexual é a propagação do organismo, sem dobrar ou reduzir o número de cromossomos. Ela resulta de simples divisão interna ou de modificação externa de uma hifa individual.

Para muitos fungos fitopatogênicos, o ciclo sexual ocorre uma única vez durante a estação de cultivo. O ciclo assexual, por outro lado, normalmente, ocorre muitas vezes e é, portanto, chamado de ciclo repetitivo. É este ciclo repetitivo do agente causal que possibilita uma alta taxa de aumento de algumas doenças.

Identificação e classificação de esporos

Esporo é um termo geral empregado para descrever quase todas as unidades destacáveis dos talos dos fungos, os quais são resultado tanto da reprodução assexual como da sexual. Os esporos e todas as outras partes, fragmentos ou estruturas de talo dos fungos, que podem crescer e reproduzir o organismo, são chamados de propágulos. Estes germinam para originar uma nova colônia quando se depositam num lugar adequado. Os esporos ocorrem em um arranjo de tamanhos e formas, mas, apesar de sua diversidade, a forma dos esporos é constante para determinado fungo, fazendo desta uma das características mais úteis em sua identificação (Fig. 15). Os esporos podem ser coloridos ou incolores; unicelulares, bicelulares ou pluricelulares; redondos, pontudos, longos ou espiralados; uninucleados, binucleados ou multinucleados; de paredes finas ou de pare-

des espessas, ou variavelmente esculturados, verrugosos, sulcados, equinulados, ou com outras protusões. As dimensões da maioria dos esporos situam-se na faixa de 2 a 100 μm (micrômetros); no entanto, o comprimento de algumas poucas espécies pode chegar a 400–500 μm .



(Fonte: Agrios, 1978)

Fig. 15. Esporos e corpos frutíferos representativos dos principais grupos de fungos.

Os fungos são classificados de acordo com o seu método de reprodução sexual. Alguns não têm nenhum estágio sexual conhecido. Há cinco subdivisões dos

Eumycota, ou fungos verdadeiros: Mastigomycotina, Zigomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina e Deuteromycotina (ou Fungos Imperfeitos). Os fungos estão classificados de acordo com o tipo de esporo sexual característico de cada subdivisão. Por exemplo, os Mastigomycotina, os Zigomycotina, os Ascomycotina e os Basidiomycotina produzem oosporos, zigosporos, ascosporos e basidiosporos, respectivamente. Os Deuteromycotina não possuem nenhum esporo sexual conhecido; eles apresentam considerável diversidade e podem ser classificados ou descritos de acordo com o esporo assexual produzido.

Há vários tipos de esporos assexuais produzidos pelos fungos. Destes, os conídios são o grupo mais difícil de ser caracterizado, devido à sua grande diversidade de formas. A única característica que a maioria dos conídios têm em comum é que eles ocorrem externamente sobre as células que os produzem. Estas células suportes de conídios podem ocorrer dentro de estruturas especializadas ou características. Os conídios originados em hifas, sem nenhum tipo de estrutura frutífera composta, são os do tipo mais comumente encontrado.

Desde que cada doença de planta é, normalmente, causada por um único fungo, e considerando-se que há mais do que 100.000 espécies diferentes de fungos, a identificação da espécie numa planta enferma, ou numa cultura pura, significa que todas as espécies conhecidas, exceto uma, têm que ser excluídas.

As características mais significativas dos fungos usadas em sua identificação são os esporos e as frutificações, ou os seus esporóforos, os quais têm que ser examinados sob o microscópio. A forma, o tamanho, a cor e a maneira de arranjo dos esporos sobre os esporóforos ou nos corpos frutíferos são características importantes para sugerirem a alguém, com experiência em taxonomia de fungos, a classe, a ordem, a família e o gênero ao qual um fungo em particular pertence. Estas características podem ser utilizadas para se identificar o fungo através de chaves analíticas. Uma vez determinado o gênero do fungo, as descrições específicas da espécie podem ser encontradas em monografias de gêneros ou em publicações específicas em revistas científicas.

Normalmente, há listas de patógenos que afetam determinada espécie vegetal. Neste caso, podem-se usar índices de hospedeiros como um método rápido para se identificar o fungo em questão. As listas de hospedeiros, no entanto,

devem ser consideradas como sugestões à identificação do fungo em estudo. A determinação final tem que ser baseada em monografia ou em outras publicações mais específicas.

Sintomas causados pelos fungos patogênicos nas plantas hospedeiras

Os fungos patogênicos provocam sintomas localizados ou generalizados, podendo ocorrer separada ou simultaneamente em um mesmo hospedeiro, ou, ainda, suceder um ao outro no mesmo hospedeiro. Em geral, os fungos causam necrose local ou geral, ou morte de tecido vegetal, hipertrofia, hipoplasia (subdesenvolvimento de órgãos ou de toda a planta), ou hiperplasia (crescimento excessivo de parte ou de toda a planta).

Em muitas doenças, o patógeno cresce e produz estruturas na superfície do hospedeiro. Estas estruturas, incluindo micélio, esclerócios, esporóforos, corpos frutíferos e esporos, são chamadas de sinais e são distintas dos sintomas que se referem somente ao aspecto dos tecidos ou das plantas infectadas.

Os sintomas necróticos mais comuns são:

- (1) Manchas foliares - lesões localizadas nas folhas dos hospedeiros consistindo da morte e do colapso das células;
- (2) Crestamento - bronzeamento geral extremamente rápido de folhas, de ramos, de brotos e de órgãos florais, resultando em sua morte;
- (3) Cancro - ferimento localizado ou lesão necrótica, freqüentemente com o centro deprimido;
- (4) Podridão radicular - desintegração ou apodrecimento de parte ou de todo o sistema radicular da planta;
- (5) Tombamento - colapso e morte rápida de plântulas em sementeiras ou no campo; também conhecido por "dumping-off";

- (6) Podridão basal do caule - desintegração da parte inferior do caule;
- (7) Podridão mole e seca - maceração e desintegração de frutos, de raízes, de bulbos, de tubérculos e de folhas carnosas;
- (8) Antracnose - lesão necrótica e deprimida, tipo úlcera, em hastes, em folhas, em frutos ou em flores;
- (9) Sarna - lesões localizadas em frutos, em folhas, em tubérculos etc., em geral, levemente levantadas ou deprimidas e rompidas.

Sintomas associados com hipertrofia, hiperplasia e distorção de partes da planta.

- (1) Hérnia - aparência dilatada das raízes, com aspecto fusiforme ou clavado;
- (2) Galhas - partes aumentadas das plantas, normalmente preenchidas com micélio de fungo;
- (3) Verrugas - protuberâncias, principalmente em tubérculos e em caules;
- (4) Vassoura de bruxa - ramificação profusa e ascendente de brotos;
- (5) Crespeira de folhas - distorção, engrossamento e encrespamento de folhas.

Outros três grupos de sintomas incluem:

- (1) Murcha - sintoma secundário generalizado, no qual as folhas ou os brotos perdem sua turgescência e prostam-se devido a distúrbios no sistema vascular de raízes ou de caules;
- (2) Ferrugens - pequenas e numerosas lesões em folhas e em colmos, comumente

de cor ferruginosa;

(3) Míldios ou oídios - áreas cloróticas ou necróticas em folhas, em colmos e em frutos, normalmente recobertas com micélio esbranquiçado e com frutificação do fungo.

Bactérias

As bactérias representam um grupo de organismos muito antigo. São microorganismos simples constituídos de uma única célula procariótica (ex. células contendo um único cromossomo circular, porém sem membranas nucleares ou organelas internas). A grande maioria das bactérias são estritamente saprofíticas e, como tal, são benéficas, porque contribuem com a decomposição de enormes quantidades de matéria orgânica produzida anualmente pela sociedade humana, pela morte de plantas e de animais. Cerca de 200 espécies de bactérias têm sido encontradas como agentes causais de doenças de plantas. As doenças bacterianas ocorrem em todos os lugares úmidos ou quentes, afetando quase todas as espécies de plantas e, sob condições ambientais favoráveis, podem ser extremamente destrutivas. Todas as bactérias fitopatogênicas são saprófitas facultativas, podendo ser cultivadas artificialmente em meio nutritivo.

As bactérias podem ter a forma de bastonetes (ou de vírgula), ou podem ser esféricas, elipsóides, espiraladas ou filamentosas. Elas raramente são maiores do que 1 μm (micrômetro) em diâmetro, e por isto são difíceis de serem visualizadas, mesmo com um bom microscópio. O tratamento com corantes facilita o exame. Algumas bactérias podem mover-se em meio líquido por auxílio de flagelos, enquanto que outras não podem fazê-lo por si próprias. Células bacterianas individuais têm aparência hialina ou branco-amarelada sob o microscópio composto. Quando uma célula sozinha é deixada crescer (multiplicar-se) na superfície, ou dentro de um meio sólido, sua progênie logo produz uma massa visível a olho nú, chamada de colônia. As colônias de diferentes espécies podem variar no tamanho, no aspecto, na forma dos bordos, na elevação, na cor etc, que são, algumas vezes, características de uma dada espécie. As colônias podem apresentar desde a fração de um milímetro até vários centímetros de diâmetro e

são circulares, ovais ou irregulares. Os bordos podem ser lisos, ondulados, angulares etc., e, quanto à sua elevação, as colônias podem ser achatadas, elevadas, abobadadas, enrugadas etc. As colônias da maioria das espécies são brancas ou cinzentas, porém algumas são amarelas, vermelhas, ou de outras cores. Algumas produzem pigmentos que se difundem no meio de cultura.

No estágio vegetativo, a maioria das bactérias multiplica-se por fissão simples, com impressionante rapidez. A sua importância como patógenos reside no fato de que podem produzir um número grande de células em um período curto de tempo. Sob condições favoráveis, alguns gêneros de bactérias podem multiplicar-se a cada 20 minutos.

Quase todas as bactérias fitopatogênicas desenvolvem-se, principalmente, nas plantas hospedeiras como parasitas e parte no solo como saprófitas. Há grandes diferenças entre as espécies quanto ao grau de desenvolvimento em diferentes ambientes. Quando no solo, as bactérias vivem, principalmente, em material vegetal e, menos freqüentemente, livres, saprofiticamente, ou em seus próprios exsudatos, que as protegem dos vários fatores adversos. As bactérias sobrevivem, também, no interior ou na superfície de sementes, em partes de plantas, em insetos etc., encontrados no solo. Nas plantas, as bactérias podem sobreviver epifiticamente, em gemas, em fermentos, em exsudatos ou no interior de tecidos ou de órgãos infectados.

A disseminação das bactérias fitopatogênicas de uma planta para outra, ou de um órgão para o outro, numa mesma planta, dá-se, primariamente, pela água, por insetos, por outros animais e pelo homem. Mesmo as bactérias flageladas movimentam-se a distâncias muito curtas por seus próprios meios. A chuva, por sua ação de lavagem ou respingos, transporta e distribui as células bacterianas de uma planta a outra, de uma parte para outra dentro da mesma planta e do solo às partes superiores das plantas.

Classificação e identificação de bactérias

Os gêneros de fitobactérias mais comumente isolados são: *Pseudomonas*, *Xanthomona*. (Família Pseudomonadaceae), *Agrobacterium* (Família Rhizobiaceae),

Erwinia (Família Enterobacteriaceae), **Corynebacterium** (Grupo Corineforme) e **Streptomyces** (Família Streptomicetaceae).

A forma e o tamanho das bactérias de uma dada espécie podem variar com a idade da cultura, com a composição e com o pH do meio, com a temperatura e com o método de coloração. Sob certas condições, no entanto, a forma predominante, o tamanho e o arranjo das células em cultura pura são claros e estas características são importantes e confiáveis na sua identificação. A presença, o número e o arranjo dos flagelos nas células bacterianas são também determinados, normalmente, quando os flagelos são coloridos com corantes especiais.

A composição química de algumas substâncias presentes nas células bacterianas pode ser detectada com técnicas específicas de coloração. A informação sobre a presença ou a ausência de tais substâncias é empregada na identificação da espécie de bactéria. A reação da coloração de Gram diferencia as bactérias em Gram positivas e em Gram negativas. O requerimento nutricional das células bacterianas pode ser usado para sua identificação, pela determinação das substâncias que a bactéria pode ou não usar como fonte nutricional.

Com base nestes testes, é possível identificar os gêneros de bactérias mais comumente isolados. O seguinte fluxograma pode ser empregado como um guia rápido de identificação de bactérias:

Crescimento em meio de cultura
(Vide seção de Fórmulas de Meios de Culturas
no Apêndice 2)

Sim

Coloração de Gram

Positivas

Corynebacterium

Negativas

Erwinia
Xanthomonas
Pseudomonas
Agrobacterium

Colônias amarelas em ágar YDC

Positiva

Erwinia
Xanthomonas

Negativa

Pseudomonas
Erwinia
Agrobacterium

Desenvolvimento em
ágar MS ou CVP

Positiva

Erwinia

Negativa

Xanthomonas

Pigmento fluorescente
em ágar KB

Positiva

Pseudomonas

Negativa

Erwinia
Agrobacterium
Pseudomonas

Desenvolvimento em ágar MS ou CVP

Positiva

Erwinia

Negativa

Agrobacterium
Pseudomonas

Desenvolvimento em ágar D-1

Positiva

Agrobacterium

Negativa

Pseudomonas

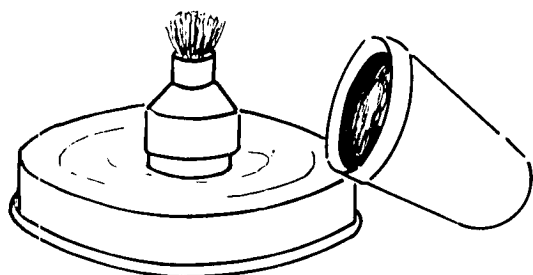
Sintomas causados pelas bactérias fitopatogênicas

À semelhança dos fungos, as bactérias fitopatogênicas causam muitos tipos de sintomas nas plantas infectadas. Elas podem originar manchas foliares e crestamento, podridões moles de frutos, de raízes e de órgãos de reserva, murchas, supercrescimento, sarna, câncros etc. Um tipo qualquer de sintoma pode ser causado por bactérias patogênicas pertencentes a diferentes gêneros, e cada um destes gêneros contém alguns patógenos capazes de causar diferentes tipos de doenças.

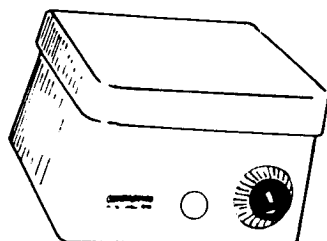
APÊNDICES

APÊNDICE 1

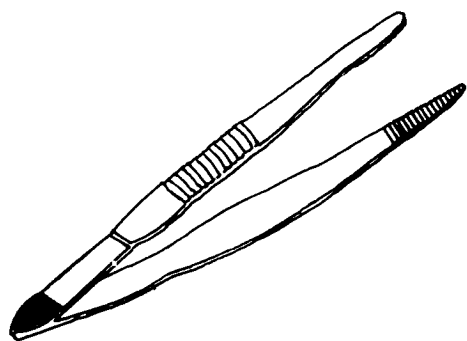
Instrumentos e equipamentos mais comumente usados num laboratório de Fitopatologia



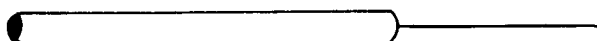
lamparina



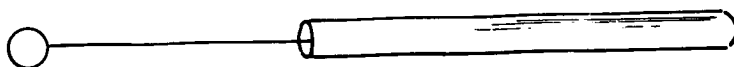
placa aquecedora



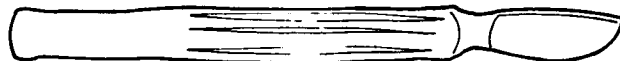
pinça



agulha



alça



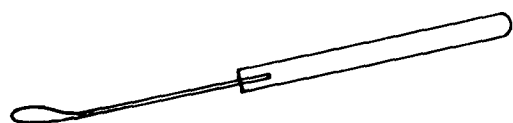
escalpelo



Pipeta graduada



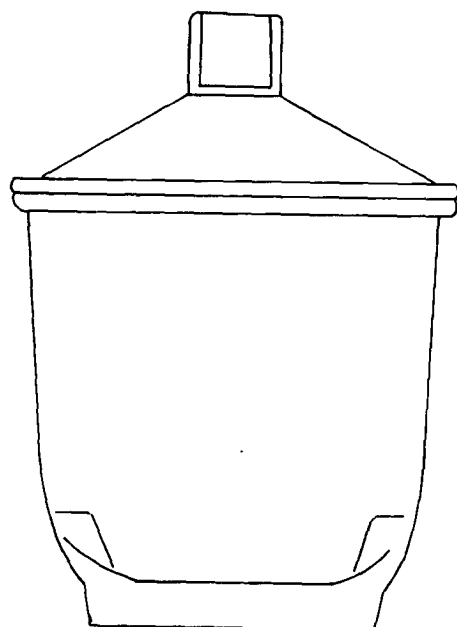
pipeta de Pasteur



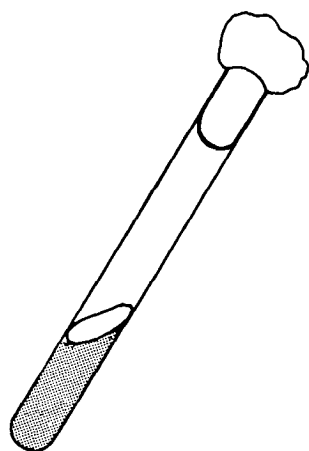
espátula



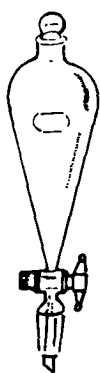
lança



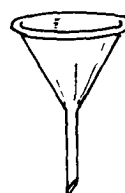
dessecador



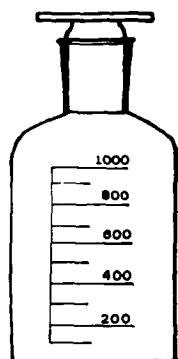
tubo de ensaio



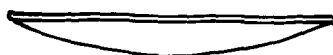
funil de
separação



funil



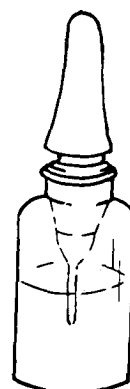
frasco de reagente



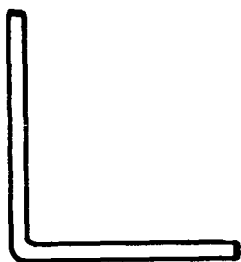
vidro de relógio



placa de Petri



frasco conta-gotas



alça de Drigalsky



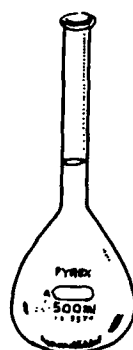
frasco de
Erlenmeyer



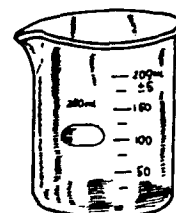
proveta
graduada



frasco de
kitazato



balão
volumétrico



Beaker

APÊNDICE 2

Fórmulas de meios de cultura

Para uso geral e para fungos em particular

(1) Ágar-Água (AA)

Água destilada	1.000 ml
Ágar	15 - 20 g

O ágar é dissolvido na água por aquecimento. O crescimento dos fungos, neste meio, é mais longitudinal do que lateral, não se ramificando tão profusamente quanto em BDA.

(2) Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Batata descascada, cortada em fatias	200 g
Ágar	15 - 20 g
Dextrose (ou glicose)	20 g
Água destilada	1.000 ml

Cozinhar a batata em 500 ml de água por 1 hora em um copo de aço inoxidável, ou por 40 minutos em uma autoclave. Ao mesmo tempo, deve-se fundir o ágar em 500 ml de água. Coar o caldo da batata, através de várias camadas de gaze, para dentro do ágar fundido. Restabelecer o volume de 1.000 ml com água, acrescentar e dissolver a dextrose, filtrar através de gaze dentro de tubos ou de frascos de Erlenmeyer. Este meio é indicado para o crescimento de muitos fungos e de bactérias fitopatogênicas. Ele favorece o crescimento vegetativo e pode retardar a esporulação de alguns organismos.

(3) Malte-Ágar (MA)

Extrato de malte	25 g
Ágar.....	15 - 20 g

Água destilada 1.000 ml

Este meio favorece o crescimento de muitos fungos, especialmente daqueles decompositores de madeira.

(4) V-8 ou extrato de tomate

Suco V-8 ou extrato de tomate 200 ml
CaCO₃ 3 g
Ágar 15 - 20 g
Água destilada 1.000 ml

Este meio promove a esporulação de muitos fungos. É usado, rotineiramente, em Fitopatologia e parece ser um bom complemento ao meio de Leonian e ao BDA. Aqueles fungos que não esporulam em outros meios, freqüentemente, esporulam de forma abundante em V-8 ou vice-versa.

(5) Solução de Czapek em ágar

Sacarose 30 g
NaNO₃ 2 g
KH₂PO₄ (ou K₂HPO₄) 1 g
MgSO₄.7H₂O 0,5 g
KCl 0,5 g
FeSO₄.7H₂O 0,01 g
Ágar 15 g
Água destilada 1.000 ml

Este meio pode ser usado para fungos e para bactérias. Muitos fungos produzem colônias características neste meio, podendo, também, exsudar substâncias pigmentadas. O crescimento aéreo é, geralmente, suprimido e a esporulação pode ser estimulada. Alguns fungos, no entanto, crescem pobremente neste meio e podem mesmo deixar de esporular, devido à incapacidade de sintetizar vitaminas. O uso de K₂HPO₄, em vez de KH₂PO₄, induz a um pH mais alcalino, o que é desejável para o cultivo de bactérias.

(6) Ágar de Leonian modificado

Maltose	6,25 g
Extrato de malte	6,25 g
KH_2PO_4	1,25 g
Extrato de levedura	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
Peptona	0,625 g
Ágar	20 g
Água destilada	1.000 ml

Este é um meio que pode ser usado para propósitos múltiplos, servindo também para o crescimento e para a reprodução de muitos fungos. Alguns organismos não crescem neste meio, devido à sua inabilidade em usarem a maltose como fonte de carbono. Este meio pode ser usado para bactérias. A peptona parece ser desnecessária para a maioria dos fungos.

(7) Ágar Rosa de Bengala de Martin

Glicose	10 g
Peptona	5 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Estreptomicina	0,03 g
Rosa de Bengala	0,03 g
Ágar :.....	15 g
Água destilada	1.000 ml

Dez ml de uma solução estoque de 3,3 g/litro de Rosa de Bengala são acrescentados ao meio, após a dissolução dos outros ingredientes (exceto a estreptomicina). Este meio não permite o desenvolvimento de bactérias e de outros organismos que atrapalham o isolamento de fungos de matérias naturais. É recomendado quando se objetiva reduzir a taxa de crescimento de colônias em uma mistura de fungos em cultura.

(8) Ágar de farinha de milho

Farinha fina de milho amarelo.....	60 g
Ágar	15 g
Água destilada	1.000 ml

(9) Ágar de farinha de aveia

Farinha de aveia	100 g
Ágar	15 g
Água destilada	1.000 ml

A farinha de milho, ou de aveia, é acrescentada à água, sob agitação constante, a uma temperatura de 70°C, e mantida a 60°C por cerca de uma hora. O volume é restabelecido e o ágar é acrescentado e dissolvido por aquecimento. Este meio é útil para o crescimento e para a frutificação de muitos Mastigomycotina, Zigomycotina, Ascomycotina e Deuteromycotina.

Alguns meios de cultura seletivos:

(1) Meio de Nash-Snyder

Peptona	15 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
PCNB a 75 % PM	1 g
Neomicina	0,12 g em 100 ml de água
Streptomicina	1 g em 100 ml de água
Ágar	15 g
Água destilada	700 ml

Este meio permite só o desenvolvimento de espécies de **Fusarium**.

(2) Meio de Reis para espécies de *Helminthosporium* (Reis, 1983)

Benomyl	50 mg em 100 ml de água
Sulfato de estreptomicina	500 mg em 100 ml de água
Sulfato de neomicina	300 mg em 100 ml de água
Captam (Solução estoque = 133,33 mg (75 % pm) em 100 ml água)	3 ml
Botram (=dicloram) (Solução es- toque = 200 mg (50 % pm) em 100 ml água)	5 ml
Ágar	10 g
Batata com casca (cortada em fatias)	15 g
Sacarose (açúcar de cozinha)	2,5 g
Água	700 ml

Quando a temperatura estiver em torno de 60°C, verter os 100 ml de solução de benomyl e, após, os 100 ml da solução de neomicina e os 100 ml da solução de estreptomicina.

(3) Meio de Oxygall

Dextrose	10 g
Peptona	10 g
Oxygall	15 g
Streptomicina	0,4 g
Ágar	20 g
Água destilada	1.000 ml

Colônias de *Septoria nodorum*, desenvolvidas neste meio, fluorescem quando observadas sob luz ultravioleta.

Meios naturais

(1) Tecidos de plantas - Os tecidos de plantas esterilizados são, em geral, mais favoráveis para organismos patogênicos. Os fungos, freqüentemente, esporu-

lam mais rapidamente sobre fragmentos de tecidos de plantas do que em ágar ou em meios líquidos. Estes tecidos podem ser esterilizados por calor ou por esterilização superficial com desinfestantes, seguidos da remoção asséptica dos tecidos mais externos. Entre os mais comumente usados, citam-se tecidos de batata, de cenoura, de beterraba, de ervilha, de feijão, de trevo e de vários tipos de madeiras.

(2) Ágar de plantas - Alguns meios de ágar podem ser feitos de muitas plantas. O caldo quente dos tecidos vegetais é simplesmente acrescentado à solução de ágar e a mistura é, então, filtrada, distribuída em tubos e esterilizada. Cerca de 50 g de peso seco de material vegetal são comumente usados para fazer um litro de meio de cultura.

(3) Extrato de plantas - Os extratos de vários frutos e de hortaliças são meios satisfatórios para os fitopatógenos. O caldo de ameixa é especialmente favorável para a germinação de esporos. Entre os extratos mais comumente usados, estão: feijão de corda, feijão de lima, ervilha, farinha de milho, arroz, batata, malte e raízes de beterraba. Recomenda-se cerca de 50 g de peso seco do material vegetal para cada 1.000 ml de água. Nesta base, deve-se usar cerca de 490 g de raiz de beterraba, 400 g de feijão corda ou 120 g de ameixa seca, para um litro de meio de cultura.

É desejável esterilizar o extrato vegetal sem alterar a composição química pelo aquecimento. O caldo dos tecidos macerados deve ser centrifugado ou filtrado através de areia, de papel de filtro macerado ou de outro filtro para remover as partículas mais grosseiras e, então, ser passado através de um filtro esterilizado.

Meios de cultura para bactérias

(1) Ágar nutritivo (AN)

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 - 10 g

Glicose	2,5 g
Ágar	15 - 20 g
Água destilada	1.000 ml

(2) Ágar de caldo nutritivo de extrato de levedura (NBY)

Caldo nutritivo	8 g
Extrato de levedura	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Ágar	15 g
Água destilada	1.000 ml

Após a autoclavagem, acrescentar 50 ml de uma solução autoclavada de glicose a 10 % e 1 ml de MgSO₄.7H₂O 1M. Ajustar o pH para 7,2.

(3) Caldo de extrato de carne

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
Água destilada	1.000 ml

Este é o meio líquido padrão para bacteriologia. Deve ter o pH de 6,6 a 7,0.

(4) Extrato de levedura-dextrose-CaCO₃ (YDC)

Extrato de levedura	10 g
Glicose	20 g
Carbonato de cálcio	20 g
Ágar	15 g
Água destilada	1.000 ml

A glicose deve ser autoclavada separadamente. O meio autoclavado deve ser resfriado até 50°C, em banho-maria, e o CaCO₃ acrescentado por agitação, an-

tes de ser vertido nas placas.

(5) Meio de King B (KB)

Protease peptona Nº 3	20 g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	2,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	6 g
Glicerol	15 ml
Ágar	15 g
Água destilada	1.000 ml

APÊNDICE 3

O pH e sua determinação

O grau de acidez é definido através da escala de pH. Na expressão 'pH' o p significa potencial e o H significa concentração do íon hidrogênio. Uma solução neutra, como a água pura, tem pH 7, significando que a concentração de H^+ livre (íons de hidrogênio) e OH^- (íons de hidroxila) é, exatamente, a mesma. Como o pH é expresso em uma escala logarítmica, qualquer valor de pH abaixo de 7 é ácido e qualquer valor acima de 7 é básico. Quanto mais baixo for o pH, maior é a concentração de íons de hidrogênio na solução. Uma solução com pH 6, por exemplo, contém 10^{-6} mol H^+ /litro de solução.

O pH pode ser medido por colorimetria ou com um medidor de pH. A colorimetria depende de algumas propriedades dos corantes indicadores, que mudam de cor em função do pH, ou seja, da concentração de íons H^+ na solução. Dentro de certos limites, cada cor corresponde a um dado pH. Usando cores padrões para valores dados, o pH de um meio pode, assim, ser determinado. A desvantagem deste método é seu emprego quando alguns meios já são coloridos. Os papéis indicadores, normalmente, são apresentados na forma de fitas com a gama de pH que elas podem determinar. Um pedaço de fita é imerso na solução de pH desconhecido e a cor que surge na fita é comparada numa escala padrão. Pode-se usar um papel de faixa ampla de pH (ex. de 3 a 9) para se ter um valor aproximado de pH, e, então, papéis de faixa mais limitada. Deste modo, é possível determinar-se o pH aproximado de uma solução.

Com um medidor de pH, o potencial elétrico de uma solução é determinado por meio de dois eletrodos colocados juntos em um suporte, os quais são imersos na solução de pH a ser determinado. O aparelho deve ser calibrado, toda vez que for usado, com soluções tampão de pH conhecido. Deve-se, de preferência, usar uma com pH próximo da solução que se quer medir. Todas as determinações têm que ser feitas à mesma temperatura. Os eletrodos são muito delicados e, quando não em uso, suas extremidades devem ser mantidas imersas em água destilada ou em uma solução tampão.

GLOSSÁRIO

Acérvulo. Corpo frutífero de alguns Deuteromycotina, ou fungos imperfeitos. É uma estrutura em forma de pires raso, com uma camada de conidióforos que sustentam os conídios, que rompem a camada de células do substrato, expondo-se na superfície.

Ácido. Substância que, ao se dissociar, libera H^+ (íons hidrogênio), tendo um pH menor do que 7.

Actinomiceto. Organismo que, normalmente, é classificado como bactéria, porém apresenta filamentos semelhantes aos fungos. Tais filamentos raramente apresentam diâmetro maior do que 1 μm .

Aécio. Corpo frutífero característico das ferrugens, em forma de taça. Produz aeciosporos.

Aeciosporo. Esporo (de ferrugem) produzido no interior de um aécio.

Ágar. Substância gelatinosa extraída de algas. É empregado como um agente solidificante na preparação de meios nutritivos para o crescimento de microorganismos.

Alcalino. Pertinente à substância que libera OH^- (íons hidroxila) em água, tendo um pH maior do que 7.

Antibiótico. Substância orgânica natural que retarda ou previne o crescimento de microorganismos.

Apotécio. Estrutura frutífera de alguns ascomicetos, em forma de taça sésil ou com uma base. A superfície interna é revestida com um himênio, consistindo de ascas e de paráfises (células estéreis).

Apressório. Extremidade dilatada de uma hifa ou de um tubo germinativo que facilita a fixação e a penetração do fungo no hospedeiro.

Área ou região de ocorrência. Regiões geográficas, áreas ou países nos quais a doença ocorre.

Asca. Órgão onde ocorre meiose e formação de ascosporos, semelhante a um saco. Normalmente, contém oito ascosporos.

Ascocarpo. Corpo frutífero (ex.: apotécio, cleistotécio, peritécio) dos Ascomycotina.

Ascomycotina. Subdivisão dos fungos caracterizada pela produção endógena de ascosporos em ascas.

Ascosporo. Esporo produzido sexualmente no interior de uma asca.

Asseptado (ou não septado). Filamento de fungos sem paredes celulares transversais. Também denominado de cenocítico.

Autoécia. Alguns fungos de ferrugens que completam o ciclo de vida em uma única espécie de planta hospedeira.

Avirulência. Propriedade de não causar doença.

Bactéria. Microorganismo procariótico, unicelular, desprovido de clorofila, que se reproduz por divisão em duas partes (fissão).

Base. Substância que, em dissociação, libera OH^- (íons hidroxila), tendo pH maior do que 7.

Basídio. Órgão onde ocorre meiose, em forma de clava, característico dos Basidiomycotina. Os basidiosporos (normalmente quatro) são formados externamente em bases (sterigmata) que se estendem do ápice do basídio.

Basidioscarpo. Corpo frutífero dos Basidiomycotina.

Basidiomycotina. Subdivisão dos fungos caracterizada pela produção exógena de basidiosporos em basídios.

Basidiosporo. Esporo exógeno dos Basidiomycotina produzido sexualmente.

Cancro. Lesão necrótica nos tecidos das plantas.

Célula. Unidade estrutural dos seres vivos.

Cenocítico. Ver asseptado.

Ciclo de vida. Sucessão de fenômenos ocorrentes durante um período de crescimento contínuo e de desenvolvimento do organismo (em um fungo, desde a germinação do esporo até a morte normal do micélio).

Ciclo secundário. Ciclo de vida envolvendo a infecção secundária. Segunda e demais gerações do patógeno na cultura, após a sua introdução no ciclo primário.

Citologia. Estudo da célula.

Clamidosporos. Esporo assexual de paredes espessas desenvolvido diretamente das células de hifas.

Cleítostécio. Corpo frutífero de alguns Ascomycotina completamente fechado (ex. estrutura sexual nos oídios).

Colonização sistêmica. Tipo de colonização na qual a maior parte ou toda a planta é envolvida pela doença.

Conídio. Esporo assexual dos fungos produzidos exogenamente sobre hifas especializadas (conidióforos).

Conidióforo. Ramificação de uma hifa, que sustenta os conídios.

Côrte de infecção. Lugar no hospedeiro suscetível onde ocorrem as atividades de incubação do patógeno; as proximidades de um possível ponto de infecção.

Cromossomo. Estrutura no núcleo da célula que contém os genes.

Deuteromycotina. Subdivisão dos fungos que abriga as espécies cuja reprodução sexual é desconhecida.

Disseminação. Ato ou maneira de dispersar ou de disseminar o inóculo do patógeno dentro de uma área mais ou menos limitada, próxima da fonte de inóculo.

Distribuição. (a) Ato de transportar e estabelecer um patógeno, além de barreiras, a outras regiões. (b) É a ocorrência geográfica da doença (sinônimo de alcance).

Doença. Processo fisiológico prejudicial, causado pela irritação contínua da planta por um agente causal primário, em associação com o ambiente. A expressão da doença em reações patológicas caracterizantes constitui os sintomas.

Ecologia (aplicada à Fitopatologia). Estudo que trata do efeito dos fatores ambientais, tais como solo, clima e cultura etc., na ocorrência, na severidade e na distribuição de doenças de plantas.

Epidemia. Desenvolvimento rápido de uma doença atingindo um percentual alto da população de plantas.

Epidemiologia. Estudo das epidemias.

Epifitótico. Ocorrência súbita e destrutiva de uma doença de plantas.

Erradicação. Princípio de controle de doenças de plantas que consiste em remover ou em destruir o patógeno estabelecido numa dada área ou região (ex.: desinfestação do solo, rotação de culturas, manejo de solo etc.).

Esclerócio. Massa dura compacta de tecido fúngico, constituída de uma camada externa melanizada e de uma medula parenquimática interna. É capaz de sobreviver por longo período sob condições ambientais adversas.

Espécie. Categoria taxonômica fundamental na classificação dos seres vivos, numa posição sistemática inferior ao gênero. Os indivíduos de uma espécie são e permanecem morfológicamente distintos daqueles de outras espécies do mesmo gênero.

Esporângio. Corpo frutífero mais ou menos esférico no qual esporos assexuais são produzidos.

Esporangióforo. Hifa na qual um ou mais esporângios são produzidos.

Esporangiosporo. Esporo assexual produzido num esporângio.

Esporo. Unidade reprodutiva dos fungos, uni ou multicelular, que se torna destacável do indivíduo-mãe. Pode germinar para dar origem a um novo indivíduo.

Esporo de descanso. Esporo de fungo, normalmente de paredes espessas, que pode permanecer viável dormente por um extenso período de tempo (ex.: clamidosporos, oosporos, teliosporos).

Esporodóquio. Corpo frutífero assexual no qual conidióforos se desenvolvem sobre a superfície de uma estrutura em forma de almofada.

Estágio perfeito (de um fungo). Parte do ciclo de vida durante a qual os esporos são produzidos sexualmente.

Estágio imperfeito (de um fungo). Período do ciclo de vida diferente daquele no qual esporos sexuais são formados.

Estéril. Que não produz esporos.

Etiologia. Estudo da causa. Parte da Fitopatologia que trata do agente causal, da sua natureza, da sua classificação e das relações com a planta suscetível.

Estirpe. Linha pura (geneticamente homogênea) de um organismo ou de um isolado. Também denominada raça.

Estroma. Massa de tecido de fungo, freqüentemente melanizado, no qual são produzidos corpos frutíferos

Eumycota. Divisão do Reino dos Fungos, abrigando as espécies que apresentam micélio filamentoso.

Exclusão. Princípio de controle de uma doença vegetal. Consiste em excluir o patógeno de uma dada região ou área (ex.: tratamentos de sementes, inspeção e quarentena).

Fissão. Multiplicação de células por divisão simples.

Fonte de inóculo. Lugar ou objeto sobre o qual, ou em cujo interior, o inóculo é produzido, tal como em órgãos do hospedeiro suscetíveis ou em algum objeto do ambiente.

Forma. Subdivisão de uma espécie ou de uma variedade. (ver raça).

Fungo. Organismo aclorofilado cujo corpo vegetativo (talo) consiste de filamentos (hifas) agregados em sistemas ramificados (micélio).

Fungos imperfeitos. Ver Deuteromycotina.

Gene. Unidade hereditária, parte do DNA de um cromossomo.

Gênero. Subdivisão do reino animal ou vegetal englobando espécies.

Germinação. Crescimento inicial de um esporo ou de uma semente.

Haustório. Órgão de absorção de certos parasitas.

Hialino. Claro ou translúcido.

Hipertrofia. Desenvolvimento anormal dos tecidos devido a um aumento no tamanho das células individuais.

Hifa. Filamento do micélio dos fungos (talo) composto de uma ou mais células cilíndricas, as quais aumentam em comprimento pelo crescimento de sua extremidade. Novas hifas originam-se pelas ramificações laterais.

Hospedeiro. Organismo vivo do qual um parasita extrai seus nutrientes.

Imunização (em Fitopatologia). Desenvolvimento de plantas resistentes ou imunes a doenças.

Imunidade (em Fitopatologia). Habilidade de permanecer livre de doença devido às propriedades funcionais ou estruturais da planta.

In vitro. Em cultura, fora do hospedeiro.

In vivo. No hospedeiro.

Incubação. Manutenção de organismos em um ambiente favorável ao seu desenvolvimento; fase no desenvolvimento de uma doença entre a infecção e o surgimento dos primeiros sintomas.

Infectar. Relativo a um parasita ou patógeno. Ato de penetrar, crescer ou replicar dentro dos tecidos da planta.

Infecção. Processo de produzir ou de iniciar a condição de doença nos tecidos do suscetível.

Infecção primária. Primeiras infecções iniciadas pelo patógeno, após o período de descanso ou de relativa inatividade.

Inocular. Transferir o inóculo de sua fonte para a corte de infecção no hospedeiro.

Inóculo. Porção de um patógeno que pode ser transferida para a corte de infecção (ex.: esporos de fungos, células bacterianas).

Intercelular. Ocorrente entre células.

Intracelular. Ocorrente dentro das células.

Lesão. Região infectada envolvendo somente uma área localizada da planta.

Levedura. Fungo Ascomycotina ou Basidiomycotina unicelular, no qual pouco ou nada de um micélio se desenvolve e que, normalmente, se reproduz por gemação ou por brotação.

Macroscópio. Aquilo que pode ser visto a olho nu, sem auxílio de lentes de grande aumento ou de microscópio.

Mastigomycotina. Subdivisão dos fungos caracterizada pelo micélio asseptado, reproduzindo-se organicamente por esporos endógenos flagelados (zoosporos) e sexualmente por heterogamia.

Meiose. Divisão nuclear constituída de etapas sucessivas, nas quais o número de cromossomos é reduzido de diplóide ($2n$) para haplóide ($1n$) e onde ocorre a segregação dos genes.

Micélio. Agregação de hifas que constitui o talo ou o corpo vegetativo de um fungo.

Micologia. Estudo dos fungos.

Micrômetro (μm). Unidade de medida microscópica para descrição de dimensões celulares. Equivale a $1/1000$ de um milímetro.

Mitose. Processo no qual os cromossomos duplicados dividem-se longitudinalmente e os cromossomos filhos separam-se, então, para formar dois núcleos filhos geneticamente idênticos.

Necrose. Destruição rápida das estruturas celulares e conseqüente morte das células. Podridões, crestamento e cancos são exemplos de sintomas necróticos.

Oosporos. Esporo sexual dos Mastigomycotina.

Organismo. Qualquer criatura viva, tanto uni como multicelular.

Ostíolo. A boca ou abertura de estruturas frutíferas dos fungos, tal como ocorre em peritécios e em picnídios.

Parasita. Organismo que extrai seus nutrientes das células de um outro ser vivo, o hospedeiro, não contribuindo em nada para a sua sobrevivência.

Parasita facultativo. Organismo que comumente é um saprófita, porém, sob certas condições, pode tornar-se parasita.

Parasita obrigatório. Organismo que somente pode viver parasitando outro organismo.

Patógeno. Agente causal de doença.

Patogênese. Fase do ciclo de vida durante a qual o patógeno torna-se, e continua, diretamente associado ao suscetível vivo. A patogênese inclui a inoculação, a incubação e a infecção.

Patogenicidade. Habilidade de um patógeno de causar doença.

Patologia. É o estudo da doença.

Peritécio. Corpo frutífero dos Ascomycotina, de paredes espessas, esférico ou em forma de frasco, contendo ascas com ascosporos em seu interior. Os ascosporos são descarregados através do ostíolo.

pH. Símbolo denotando a atividade de íons hidrogênio numa solução. Os valores de pH vão de 0 a 14 e quanto mais baixo é o valor mais ácida a solução, ou seja, mais íons H^+ ela contém. pH 7 é neutro, menor do que 7 é ácido e maior do que 7 é alcalino.

Picnídio. Corpo frutífero de alguns fungos em forma de frasco e com paredes duras, contendo conídios.

Proteção (em Fitopatologia). Princípio de controle de doença de plantas que consiste em colocar uma barreira protetora entre o suscetível e o patógeno (ex.: pulverização ou revestimento com substâncias antimicrobianas).

Raça. Subdivisão dentro de uma espécie ou de uma variedade, a qual difere fisiologicamente (em patogenicidade) de outras formas do mesmo organismo, assemelhando-se, no entanto, morfológicamente. Algumas vezes, é chamada de estirpe ou de forma.

Reprodução assexual. Qualquer tipo de reprodução não envolvendo meiose

(ex.: reprodução por conídios nos Deuteromycotina).

Reprodução vegetativa. Reprodução por esporos vegetativos, por fragmentação ou por divisão do corpo da planta. Cada célula filha individual é idêntica, geneticamente, à célula-mãe.

Resistência. Habilidade de uma planta de permanecer relativamente não afetada por uma doença, devido à herança genética e às características fisiológicas e estruturais.

Rizomorfa. Conjunto compacto de hifas constituído pela união longitudinal de hifas formando um feixe. Apresenta uma cobertura externa dura, crescimento apical e serve de órgão de sobrevivência e de transporte de alimentos dentro do talo.

Saprófita. Organismo que obtém seus nutrientes de matéria orgânica morta.

Saprófita facultativo. Organismo que normalmente é parasita, porém pode viver saprofiticamente.

Saprófita obrigatório. Organismo que somente pode viver em matéria morta.

Septado. Dividido em compartimentos (células) por paredes transversais.

Septo. Parede transversal, como ocorre numa hifa ou num esporo multicelular.

Sinais. Evidências experimentais ou incidentais da doença, distintas das evidências patológicas. Os sinais comuns da doença são as estruturas do patógeno produzidas dentro ou na superfície das lesões.

Sintoma. Expressão visível de uma condição patológica apresentada pela planta suscetível.

Sintomatologia. Parte da Fitopatologia que trata do estudo dos sintomas e dos sinais da doença tendo por objetivo a diagnose.

Soro. Grupo ou massa compacta de esporos de fungos produzidos dentro de, ou sobre, uma planta hospedeira, como ocorre com as ferrugens e com os carvões.

Suscetível. Uma planta, ou espécie de plantas, passível de contrair a doença. Um termo abreviado denotando uma planta suscetível ou espécies suscetíveis.

Suscetibilidade. Condição de ser suscetível ou a inabilidade da planta de resistir ou de evitar a doença.

Taxonomia. Ciência que trata da classificação dos organismos.

Tecido. Grupo semelhante de células organizado em uma unidade estrutural e funcional.

Teliosporo. Esporo sexual de descanso, com paredes espessas, dos fungos causadores de ferrugens e de carvões.

Tubo germinativo. Crescimento inicial desenvolvido por um esporo em decorrência da germinação. Através do crescimento e da ramificação, normalmente, um tubo germinativo desenvolve-se dando origem ao micélio do fungo.

Urédio. Estrutura frutífera dos fungos causadores de ferrugens dentro da qual os urediosporos são produzidos.

Urediosporo, urediniosporo ou uredosporo. Esporo sexual de verão, ou esporo avermelhado, produzido pela maioria dos fungos causadores de ferrugens.

Variedade. Subdivisão de uma espécie.

Vegetativo. Relativo ou envolvendo propagação pelos processos assexuais.

Virulência. Habilidade relativa a causar doença. Uma medida de patogenicidade.

Zigomycotina. Subdivisão dos fungos caracterizados pelo micélio asseptado, reproduzindo-se organicamente por esporos endógenos (esporangiosporos) e sexualmente por isogamia.

Zigosporo. Esporo sexual de descanso dos Zigomycotina.

Zoosporângio. Esporângio que produz zoosporos em seu interior.

Zoosporo. Esporo contendo flagelos e, portanto, capaz de mover-se na água.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 2ed. New York : Academic Press, 1978 . 703p.
- ALTMAN, J. **Phytopathological laboratory manual techniques**. Boulder : Pruett Press, 1966. 259p.
- BARNES, E.H. **Atlas and manual of plant pathology**. New York : Plenum Press, 1979. 325p.
- BOOTH, C. **Methods in microbiology**. London : Academic Press, 1971. 795p.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton : CRC Press, 1985. 355p.
- FRENCH, E.R.; HEBERT, T.T. **Metodos de investigación fitopatológica**. Costa Rica : IICA, 1982. 289p.
- KIRALY, A.; KEMENT, Z.; SOLYMOSY, F.; VOROS, J. **Methods in plant pathology** Hungria : Elsevier Scientific Pub., 1974. 509p.
- MALLOCH, D. **Moulds. Their isolation, cultivation and identification**. Toronto : University of Toronto Press, 1981. 97p.
- O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. **The study of plant structure, principles and selected methods**. Melbourne : Termarcaphity, 1981. 1v.
- REIS, E.M. **Selective medium for isolating Cochliobolus sativus from soil**. Plant Disease, St. Paul, v.67, n.1, p.68-70, jan. 1983.
- STUBBS, R.W.; PRESCOTT, J.M.; SAARI, E.E.; DUBIN, H.J. **Manual de metodología sobre las enfermedades de los cereales**. México : CIMMYT, 1986. 46p.
- TUITE, J. **Plant pathological methods; fungi and bacteria**. Minneapolis : Burgess Publishing, 1969. 239p.