

Isolamento de patógenos fúngicos e bacterianos



DIAGNOSE

1. Doença conhecida do observador

- Identificação por meio de sintomas e/ou sinais
- Sintomas: exteriorização da doença (primário / secundário-reflexo)
- Sinais: estruturas do patógeno associadas à planta

2. Doença desconhecida do observador / relatada

- Descobrir a natureza da doença (biótica/abiótica)
- Manifestação da doença no campo (reboleiras/generalizada/linha plantio)
- Tipo de agente (fungo-lâmina/ bactéria-corrida/ vírus-tipo de sintoma)
- Recorrer à literatura (comparar os sintomas com as doenças relatadas)

DIAGNOSE

3. Doença desconhecida do observador / não relatada

Recorrer aos Postulados de Koch

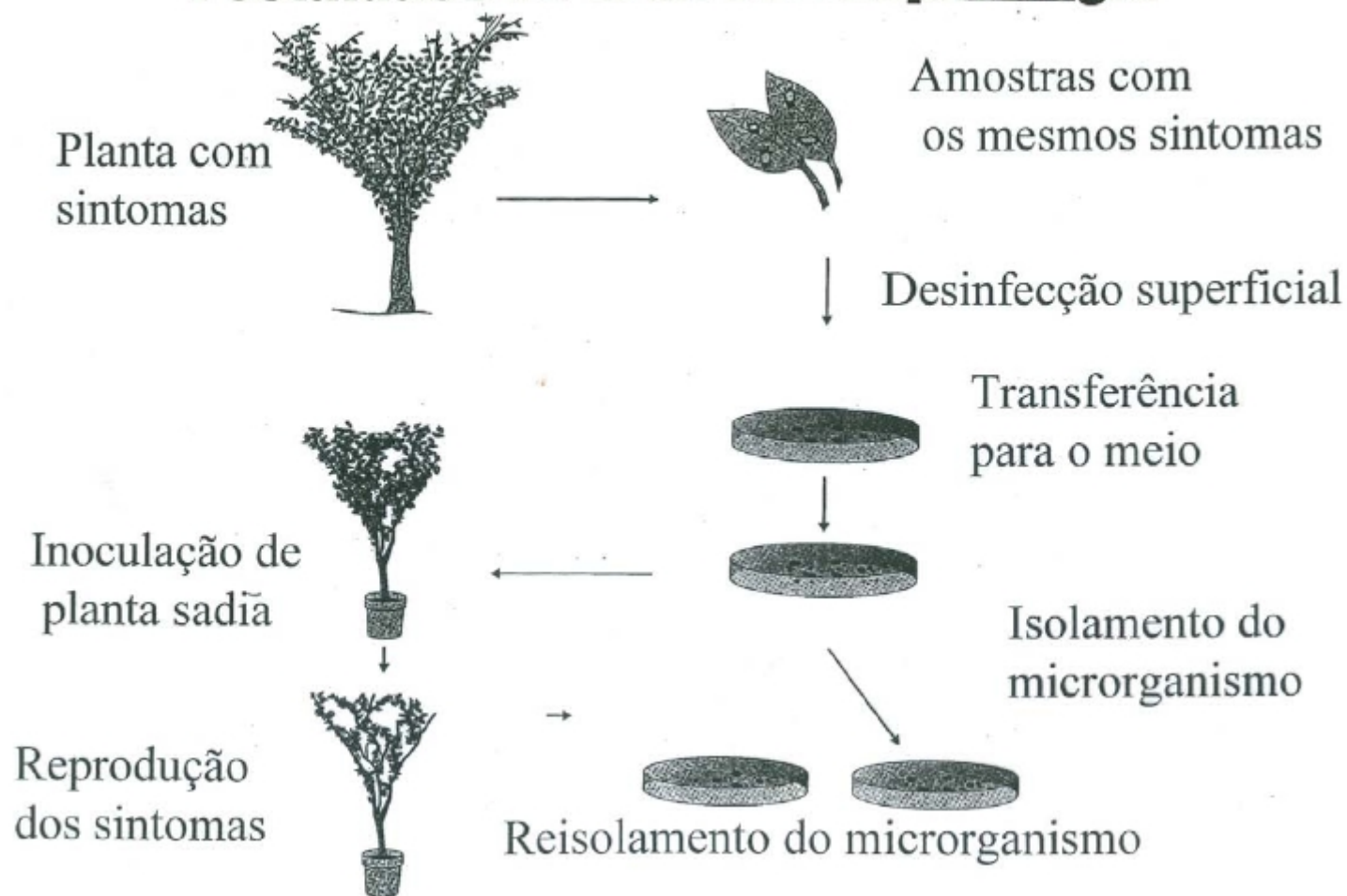
- Associação constante patógeno-hospedeiro
- Isolamento do patógeno (identificação/produção de inóculo)
- Inoculação do patógeno (reprodução dos sintomas)
- Reisolamento do patógeno (identificação/comparação com o patógeno isolado)

Referências :

Agrios, G.N. Plant Pathology. Academic Press, 1997. p.37-39

Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. Editora Ceres, 1995. p.225-232

Postulados de Koch em fitopatologia



Isolamento de patógenos

Isolamento:

- Consiste na obtenção de um patógeno na forma de colônia pura

Finalidades:

- . caracterização morfológica/fisiológica do microrganismo
- . obtenção inóculo inoculação para demonstração de patogenicidade
- . produção de inóculo massal para seleção de material resistente a doenças.

Patógenos fúngicos: necrotróficos e biotróficos

- Necrotróficos: *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cercospora*,
Botrytis, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium*
- Biotróficos: *Oidium*, *Plasmopara*, *Peronospora*, *Uromyces*, *Puccinia*

Patógenos bacterianos: fastidiosos e não fastidiosos

- Fastidiosos: *Xylella*, *Clavibacter*, *Leifsonia*, *Espioplasmas*
- Não Fastidiosas: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Ralstonia*

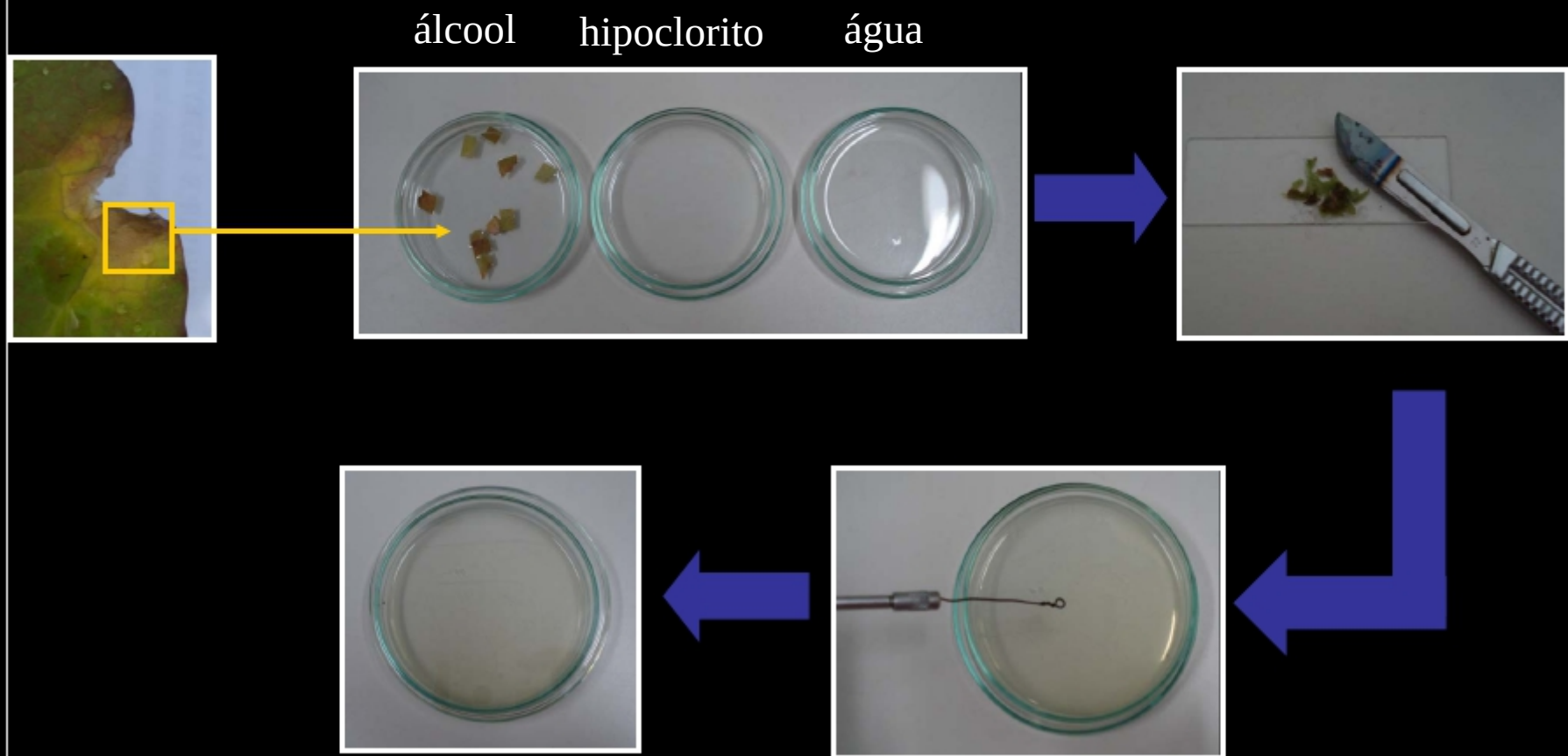
1. Folhas: *Fungos causadores de manchas foliares*

- Cortar pequenos pedaços de folhas da área de transição entre tecido sadio e doente (quadrados de 3-5 mm de lado);
- Imergir estas partes vegetais em álcool 70% por 30-60 segundos (Tween 20);
- Limpar a superfície foliar com algodão embebido em álcool? ;
- Imergir em hipoclorito de sódio 1-2% por 1-2 minutos;
- Lavar em água esterilizada ??? Secar em papel absorvente???
- Transferir os pedaços de tecido (3-4/placa) para placas contendo meio de cultura (BDA ou BDA acidificado/antibiótico ou AA), usando pinça;
- Observar o desenvolvimento do fungo (2-3 dias);
- Repicar pequenos blocos de meio dos bordos das colônias p/ meio apropriado

2. Folhas: Bactérias causadoras de manchas

- Cortar pequenos pedaços de folha da área de transição entre tecido sadio e doente;
- Imergir estas partes em álcool 70% por aproximadamente 1 minuto;
- Imergir em hipoclorito de sódio 1-2% por aproximadamente 1-2 minutos;
- Lavar três vezes em água esterilizada;
- Picotar os pedaços em água esterilizada ou meio líquido e aguardar alguns minutos
- Transferir, usando alça, a suspensão para placas, fazendo riscas no meio;
- Diluir a suspensão em dobro ou dez vezes ???
- Observar o desenvolvimento de colônias por 24-48 horas;
- Repicar pequenas colônias isoladas para meio apropriado, fazendo riscas.

Métodos de Isolamento



3. Isolamento direto para fungos

. Fungos produzem estruturas reprodutivas na superfície órgãos vegetais

- coletar, sob lupa e com agulha histológica, esporos ou picnídios;
- transferir individualmente cada estrutura para meio de cultura;
- observar por alguns dias o aparecimento de colônias;
- retirar blocos de ágar dos bordos de colônias
- transferir para placas ou tubos contendo meios apropriados.

4. Isolamento direto para bactérias

. Bactérias produzem massa de células na superfície órgãos vegetais

- coletar, com alça, uma porção da massa bacteriana ;
- transferir (riscas) para meio de cultura, após diluição em água esterilizada;
- observar por alguns dias o aparecimento de colônias;
- retirar colônias isoladas e, após diluição em água, plaquear em meio

4. Uso de iscas ou armadilhas

Patógenos de solo

- Discos de cenoura para *Agrobacterium tumefaciens* e *Thielaviopsis basicola* ;
- Frutos de maçã e de limão para *Phytophthora* sp ;
- Plantio de espécies suscetíveis (armadilhas) em solos infestados (nematóides)

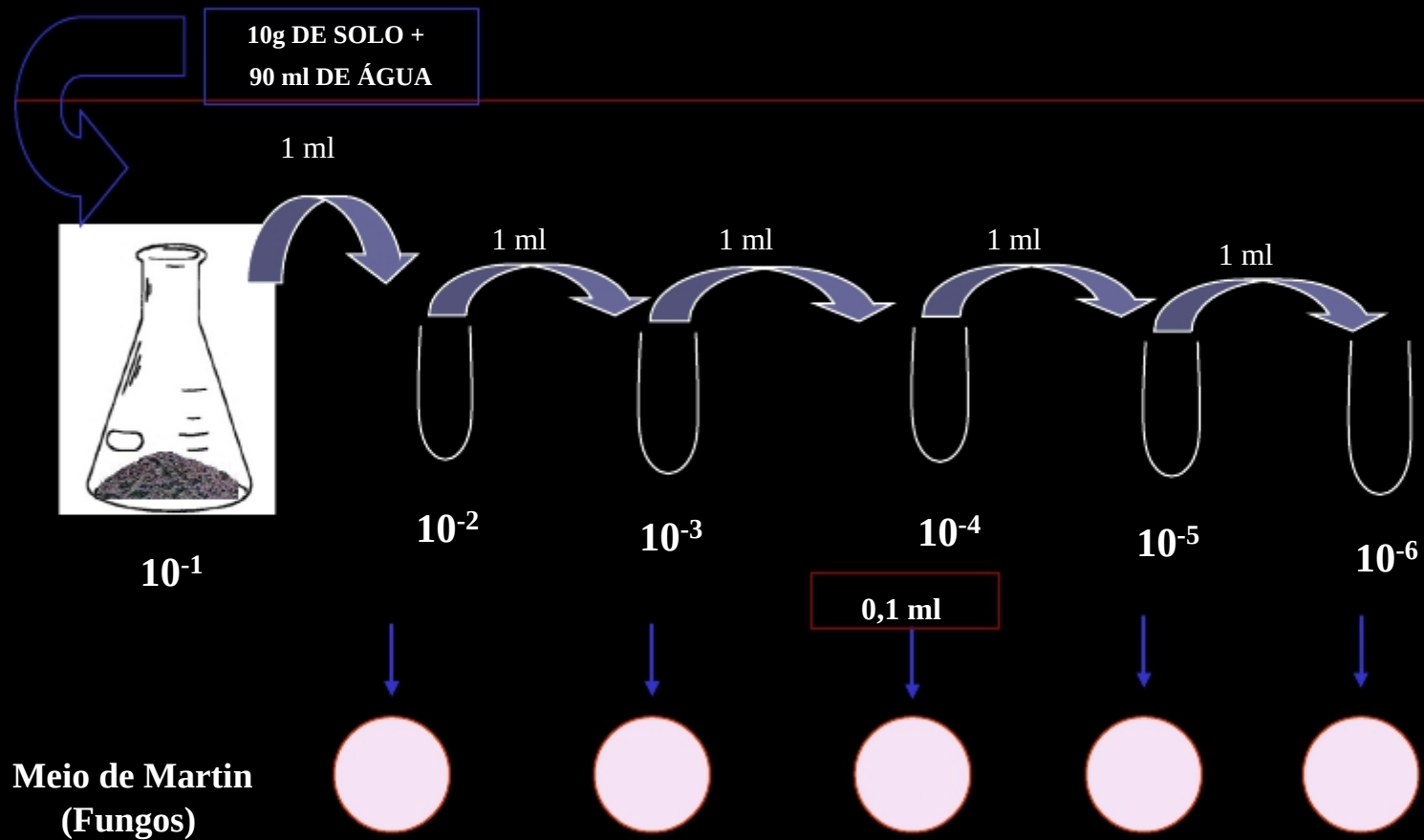
5. Isolamento patógeno habitantes do solo

Isolar ou quantificar população de fungos e bactérias

Técnica da Diluição em Série

- Coletar o solo, secar ao ar e peneirar a amostra;
- Obter diferentes diluições: 10^{-1} até 10^{-9} ;
- Plaquear : 0.1 ml de cada diluição em meios seletivos para fungos/bactérias
- Espalhar sobre superfície da placa c/ alça de Drigalski (maior p/ menor diluição);
- Repicar colônias que aparecerem no meio para outras placas ou tubos.

ISOLAMENTO FUNGOS/BACTÉRIAS DO SOLO - DILUIÇÃO SÉRIADA



6. Parasitas obrigatórios

. Fungos: ferrugens, oídios, míldios

. Bactérias: fitoplasmas

. Vírus

Hospedeiro vivo

Fungos

- Coleta de estruturas: geralmente uredósporos, conídios, esporângios ;
- Deposição das mesmas sobre tecido suscetível do hospedeiro sadio;
- Manutenção do hospedeiro em local isolado.

6. Parasitas obrigatórios

Hospedeiro vivo

Vírus

- Obtenção do inóculo a partir de plantas doentes por maceramento de tecido;
- Inoculação do extrato vegetal em plantas saudáveis, através de microferimentos;
- Manutenção do hospedeiro em local protegido;
- Outras formas de transmissão: enxertia e insetos vetores.

6. Parasitas obrigatórios

Hospedeiro vivo

Fitoplasmas

- enxertia de partes doentes em plantas saudáveis
- transmissão por insetos vetores
- uso de planta parasita do gênero *Cuscuta*
- manutenção do hospedeiro em local protegido

Cultura monospórica

- . Cultura originada de um único esporo
- . Finalidade: obtenção população geneticamente pura ou homogênea

.Cultura a partir de um único esporo

Problemas:

- fungos produzem esporos heterocarióticos
- um esporo representa uma população?

. Cultura a partir de extremidade de hifa

Problema:

- presença de mais de um núcleo por célula

Técnicas para obtenção de cultura monospórica:

Fungos

- Marcar o fundo da placa contendo ágar-água, fazendo riscas;
- Preparar suspensão diluída de conídios em água;
- Usando pipeta (1mL), deixar escorrer as gotas acompanhando as riscas
- Sob microscópio (100X), marcar esporos isolados (caneta/marcador);
- Retirar o bloco de ágar onde se encontra o esporo marcado
- Transferir os blocos individualmente para tubos contendo meio AA/BDA
- Observar homogeneidade da colônia

Técnicas para obtenção de cultura monospórica:

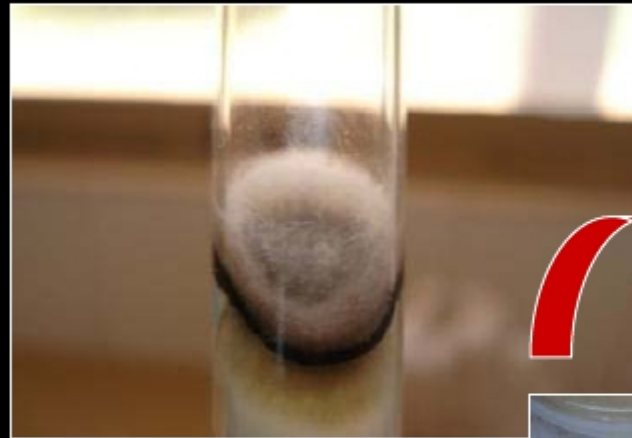
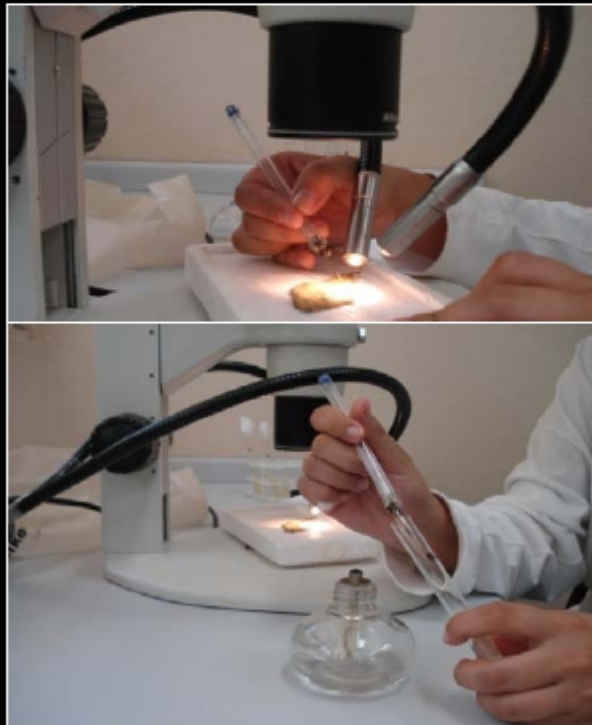
Fungos

Variação da técnica:

- Semear uma gota de suspensão sobre meio usando alça Drigalski;
- Permitir a germinação do esporo (certeza viabilidade);
- Adaptação, ao microscópio, de peças p/ marcar e cortar ágar (caneta)
- Remover o bloco de meio contendo esporo único
- Transferir para meio em tubos ou placas
- Observar homogeneidade da colônias e de esporos.

Cultura Monospórica

Alternaria solani



Técnicas para obtenção de cultura monospórica:

Fungos tipo Ferrugens

- Plantas contendo pústulas produzindo esporos (10 dias);
- Destacar folhas de plantas saudáveis, pulverizar água e colocar em placas;
- Raspar os esporos produzidos em plantas doentes
- Colocar em uma gota de água sobre lâmina de vidro, deixar evaporar a água;
- Colocar a lâmina sob microscópio e remover um esporo por vez;
- Transferir, sob microscópio, um esporo para uma gota sobre a folha destacada;
- Incubar as folhas no escuro por uma noite e por 12 dias 20° C /12h luz
- Raspar os esporos produzidos e inocular plantas saudáveis para manutenção do inóculo

Técnicas para obtenção de cultura a partir de uma célula bacteriana

- Cultivar a bactéria em meio de cultura líquido por 12-16 h;
- Suspende as células em meio de cultura aquecido sob agitação (Tween 80);
- Verter o meio para placas;
- Observar as colônias pequenas e isoladas;
- Repicar as colônias para novo meio de cultura

***Repetições do método a partir de uma única colônia repicada garantem sucesso na obtenção de cultura a partir de uma única célula.**

