

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Departamento de Fitopatologia e Nematologia



INOCULAÇÃO





Produção e Quantificação de Inóculo

Produção de inóculo

Finalidade:

- ✓ Testes de patogenicidade;
- ✓ Programas de melhoramento – fonte de resistência / seleção de material resistente;
- ✓ Ensaios de avaliação de eficiência de fungicidas.

Características do Inóculo:

- . Patogenicidade
- . Viabilidade
- . Longevidade

Tipos de Inóculo:

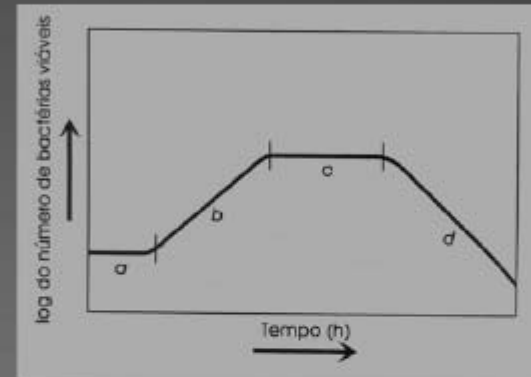
- . Esporos e micélios fúngicos
- . Células bacterianas

Produção de Inóculo de Bactéria

- **Idade:** colônias com 24 – 48 horas;
 - (fase log da curva de crescimento)
- **Patogenicidade:** uso de células novas;
- **Meio de cultura:**

. Sólido → observação da pureza da colônia

. Líquido → alta produção de células



Produção de Inóculo de Fungos

Fatores que afetam a produção de inóculo:

- ✓ Nutrição;
- ✓ Temperatura;
- ✓ Luz;
- ✓ Aeração;
- ✓ Estresse;
- ✓ Forma de repicagem;
- ✓ Consistência do meio.

Produção de Inóculo de Fungo

- **Idade:** colônias com 7-10 dias;
- **Patogenicidade e virulência:** repicagens sucessivas;
passagem pela planta hospedeira
- **Meio de Cultura:**
 - . Rico - favorece produção de micélio
 - . Pobre - favorece produção de esporos (C/N 1: 10 - 1: 50)

**[meios pouco favoráveis ao desenvolvimento de micélio favorecem a esporulação]

 - . Líquido: mais indicado para produção de inóculo micelial (sob aeração).
 - . Sólido: mais indicado para produção de esporos (aeração e pureza).

Fatores diversos

** Componentes do meio favoráveis à esporulação

. Partes de plantas: milho, tomate, feijão, aveia ...

. Fontes carbono: celulose, sacarose, amido, maltose

. Fontes nitrogênio: N forma orgânica (aminoácidos / peptona)

❖ Temperatura :

- Produção de micélio favorecida por faixa de temperatura mais ampla
- Produção de esporos favorecida por faixa de temperatura mais restrita
- Choque térmico pode induzir produção ou liberação estruturas reprodutivas.

❖ Luz :

Luminosidade tem pouca influência no crescimento micelial

- Regime de luz pode ser essencial para produção de esporos (ausência / alternância / presença)

Tipo de luz: N.U.V. (300-400 nm) tem efeito positivo sobre a esporulação

[passagem da radiação : placas Pyrex /vidro comum / placa de plástico]

Fatores diversos

❖ Aeração:

- Escassez de oxigênio reduz produção de esporos (meio sólido p/ esporulação)
- Importante para obtenção de micélio ou metabólitos (agitação do meio líquido)

❖ Estresse:

- Lavagem da placa e fermento do micélio pode favorecer esporulação
- Forma de repicagem:
 - um ponto com disco
 - múltiplos pontos com disco
 - semeadura de esporos

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Departamento de Fitopatologia e Nematologia



INOCULAÇÃO



METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS

Folhas: parasitas não obrigados

- Preparo de suspensão de esporos;
 - Adição de espalhante adesivo (Tween 20-80): uma gota para dispersar esporos
 - Adição de ágar 0,1 - 0,2%:
previne dessecação e melhora aderência de esporos na superfície foliar;
 - Pulverização cobrindo toda a superfície da folha;
(atingir o ponto de escorrimento ou quantidade determinada)
-
- Para mudas pequenas: imersão de plântulas em suspensão de esporos.



INOCULAÇÃO DE FOLHAS

Alternaria porri – mancha de alternaria em Cebola

Plantas doentes

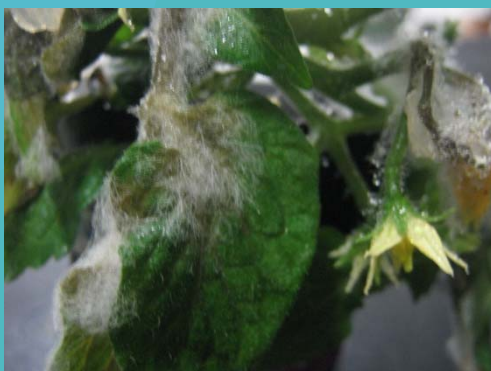


Inoculação por
Aspersão



Sclerotinia sclerotiorum - Tomateiro

Inoculação
com discos
de micélio



METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS

Folhas: parasitas obrigados

- Suspensão de esporos de ferrugem em óleos não fitotóxicos/melhor que água; fazer câmara úmida
- Polvilhamento de esporos secos, uso de talco como veículo (após, fazer câmara úmida para fungos ferrugem/oídio não?) ;
- Agitar ou atritar as plantas infectadas sobre/em plantas sadias (para ferrugens deve-se pulverizar com água após inoculação/oídio não);
- Pulverização prévia com óleo melhora a inoculação de ferrugens devido a aderência.

Oídio

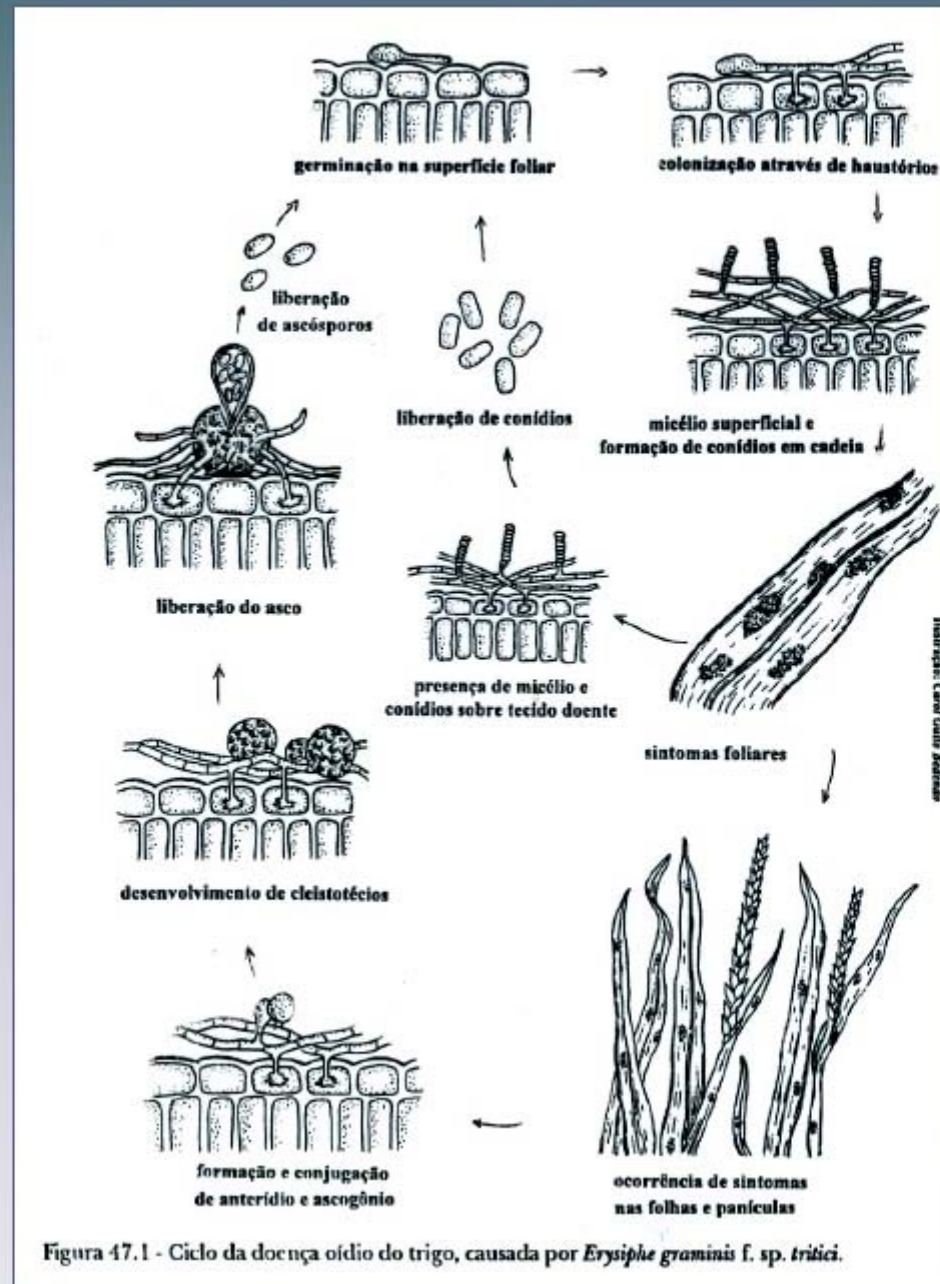


Figura 47.1 - Ciclo da doença oídio do trigo, causada por *Erysiphe graminis f. sp. tritici*.

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS

Caules

- Inoculação geralmente por ferimento (caules lenhosos) ou pulverização de suspensão de esporos (caules herbáceos);
- Corte vertical, inserção de inóculo (micélio/gota suspensão), vedação c/ vaselina ou algodão umedecido e isolamento com filme plástico;
- Ferimento com palitos cobertos com inóculo, fechamento do corte;
- Injeção de suspensão de esporos com seringa;
- Ferimentos com saca rolha/broca, inserção do inóculo e vedação;
- Bengala contendo suspensão de esporos (avaliação?)

Inoculação de colmos de cana com *Thielaviopsis paradoxa* – Podridão abacaxi

Preparo inóculo



Inoculação



Reisolamento



METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS

Raízes

- Imersão em suspensão de esporos
- Promover ou não corte ou ferimentos na raiz principal de plântulas;
- Tempo variável de imersão na suspensão de esporos (minutos a 24 horas);
- Plantio em substrato esterilizado
- Manutenção de umidade normal ou excessiva em casos especiais.

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS

Raízes:

- **Plantio em solo experimentalmente infestado**
- **Usar de preferência substratos mais leves (areia+solo+vermiculita);**
(solos pesados podem interferir devido propriedade físicas e químicas)

Aplicação do inóculo:

- **incorporado ao solo (raiz) ou distribuído na superfície do solo (colo);**
- **na forma de:**
 - . **micélio seco** (produzido em meio líquido, filtrado e seco em estufa)
 - **aderido à superfície de sementes** (produzido em meio de sementes)
 - **molhamento do solo com suspensão de esporos ou micélio+esporos**

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS

Colo:



• Escleródios de
Sclerotinia sclerotiorum

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS

Sementes

- **Desinfestação superficial;**
- **Imersão em suspensão de inóculo (1-24h);**
- **Plantio em substrato (germinação/incidência);**
- **Plaqueamento em meio de cultura (germinação/incidência);**



METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE FUNGOS

Flores e Inflorescências

- **Pulverização da suspensão de esporos sobre panículas e espigas (carvões e fungos atacam grãos);**
- **Injeção de suspensão de esporos na bainha antes da emergência (cartucho) .**

INOCULAÇÃO DE FLORES

Citros - Podridão floral – "Estrelinha" – *Colletotrichum acutatum*



Flor sadia



Flor doente



Estrelinha



Flores doentes



Cultura pura



Suspensão conídios



Inoculação por aspersão



Incubação: câmara úmida



Reprodução sintomas



Patógeno re-isolado

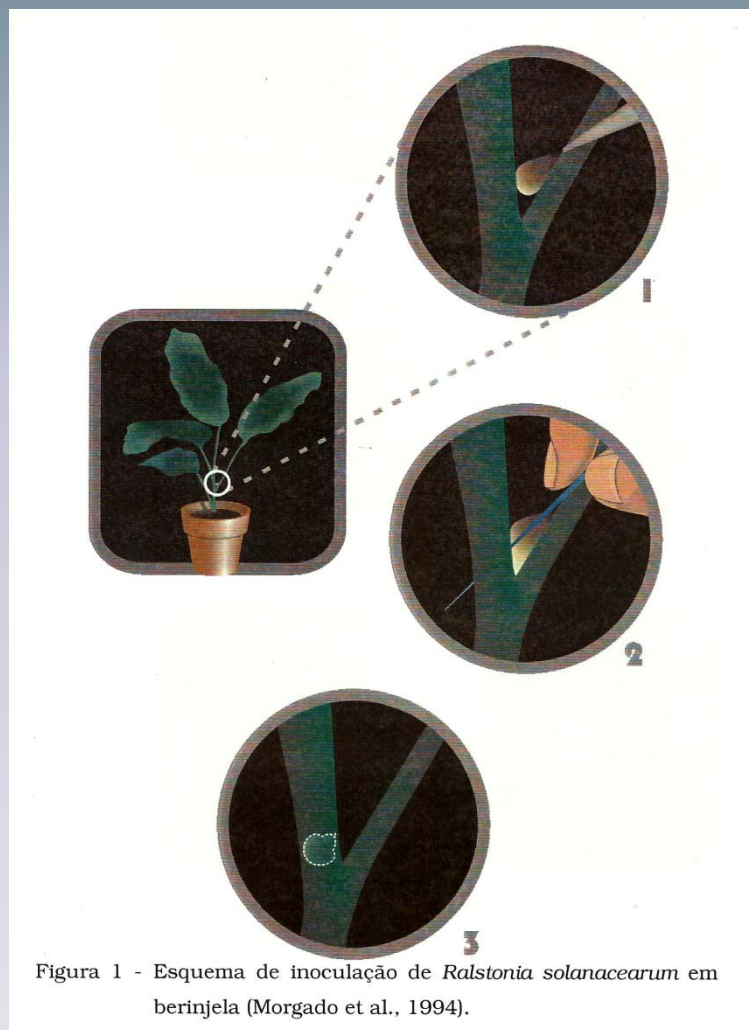
METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS

Folhas e Hastes

Suspensão:

- aplicada em pulverização na superfície foliar (inferior)
- aplicada com algodão ou dedos
- aplicada sob alta pressão
- uso de abrasivos e posterior aplicação da suspensão
- uso de abrasivos na suspensão e aplicação com pincel, dedos ou algodão;
- corte de tecido com tesoura previamente imersa em suspensão de células;
- provocar ferimentos com agulhas e aplicação da suspensão (dedos, pincel, algodão)
- causar ferimentos c/ agulha e simultanea/e aplicar suspensão contida em esponja;
- uso de pequenos pedaços de folha de lixa fina umedecidas no inóculo e pressionadas sobre folhas ;
- injeção de suspensão em hastes e folhas usando seringa
- ferimento de hastes com agulha e deposição de gota de suspensão

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS



METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS



Figura 2 - Esquema de inoculação de *Ralstonia solanacearum* em batata (Lopes, 1981).

INOCULAÇÃO BACTÉRIA EM FOLHAS

Tabaco - Mancha Foliar - *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Câmara úmida 24 horas antes da inoculação



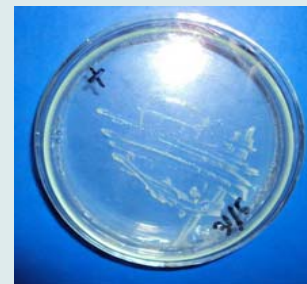
Preparo do inóculo a partir cultura pura



Inoculação por aspersão



Câmara úmida 24 h



Preparo de inóculo e inoculação de hastes

Pseudomonas corrugata agente causal da necrose da medula do tomateiro

✓ Preparo de inóculo:



Cultura pura c/ 24 h crescimento



Adição de água destilada esterilizada



Remoção das células bacterianas



Obtenção da suspensão de bactérias

✓ Inoculação



Planta tomate sadia



Injeção na haste



Injeção da suspensão



Condições de câmara úmida

Reprodução de sintomas



Sintomas iniciais



Sintomas 10 dias após a inoculação



Sintomas 15 dias após a inoculação



Reisolamento



Reisolamento



Cultura *P. corrugata*

Manchas Foliares

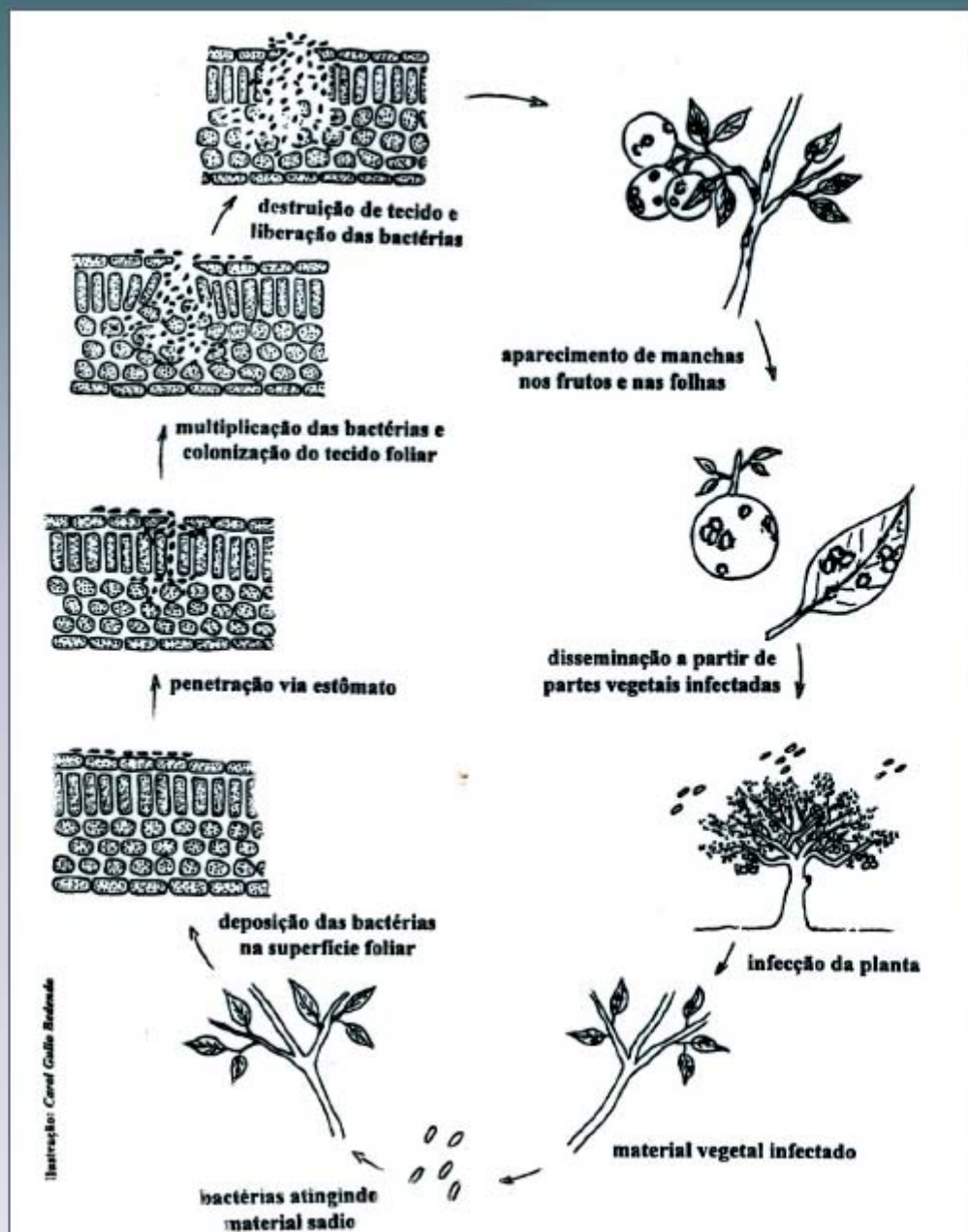


Figura 45.1 - Ciclo da doença cancro cítrico, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *citri*.

METODOLOGIA DE INOCULAÇÃO DE VÍRUS

Folhas

- Mecanicamente: microferimentos provocados por abrasivo (carborundum) e aplicação de extrato de planta doente contendo partículas do vírus ;
- Vetores (insetos): alimentação em planta fonte de vírus e posterior alimentação em plantas sadia a serem inoculadas;
- Enxertia: partes de plantas doentes são enxertadas sobre plantas saudias, ocorrendo a passagem de partículas através dos vasos do floema;
- Cuscuta: planta parasita atua como ponte biológica entre planta fornecedora e receptora de vírus.

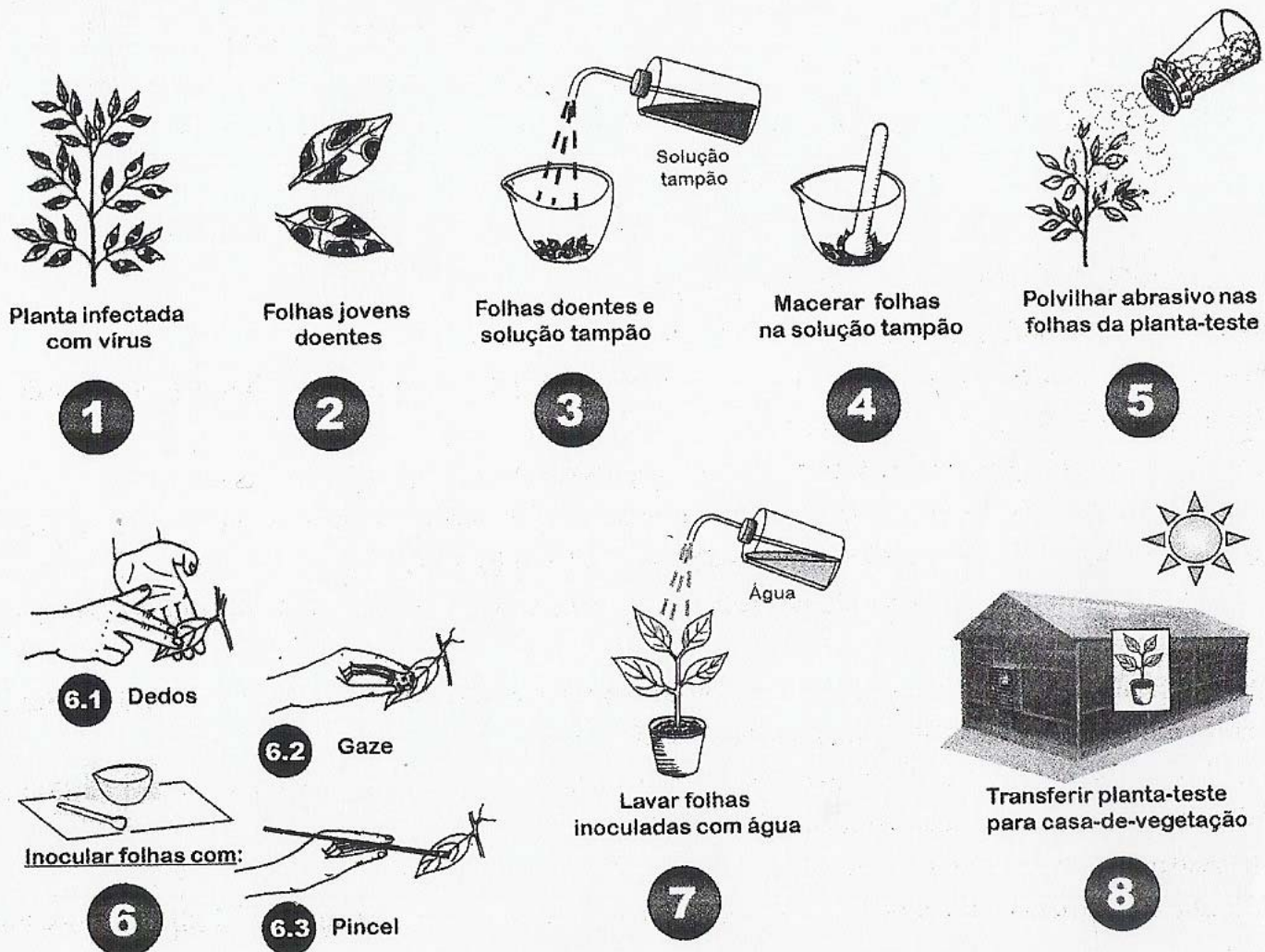


Figura 3.4 - Inoculação mecânica de vírus de planta.

CONDIÇÕES DE INOCULAÇÃO: Fungos e bactérias

Pré-inoculação:

- Luz/escuro;
- Nutrição-nitrogênio;
- Tecido jovem /adulto
- Estádio da planta (plântula /antes, durante , após florescimento);
- Temperatura;
- Estresse hídrico .

CONDIÇÕES DE INOCULAÇÃO

Pós-inoculação:

- Fornecer condições favoráveis à germinação, desenvolvimento de tubo germinativo e estruturas de penetração;
- Condições: atmosfera saturada de água e presença de filme de água sobre a superfície da planta (oídio = incubação em ambiente seco).
- Estabelecimento de câmara úmida por 24-48h a 20-25°C para maioria dos patógenos.
- Manutenção de umidade após inoculação: uso de câmaras de orvalho, sacos plásticos, umedecimento de substratos sob bancada, uso de bicos nebulizadores;
- Luz: presença pode inibir/estimular a germinação de esporos sobre planta escuro favorece fungos que penetram via estômato (ferrugens).

CONDIÇÕES DE INOCULAÇÃO

Pós-inoculação:



- Estabelecimento de câmara úmida por 24-48h a 20-25°C para maioria dos patógenos.
- Manutenção de umidade após inoculação: uso de câmaras de orvalho, sacos plásticos, umedecimento de substratos sob bancada, uso de bicos nebulizadores;

INOCULAÇÃO

Partes destacadas de plantas (folhas)

- Vantagens: tempo/espço/inóculo/controlado de condições/avaliação

-Manutenção de material:

. folhas inteiras sobre papel de filtro úmido

(com ou sem imersão de pecíolos em algodão umedecido em água, solução nutritiva)

. discos flutuando sobre água ou soluções (ácido giberélico, sacarose, benzimidazol)

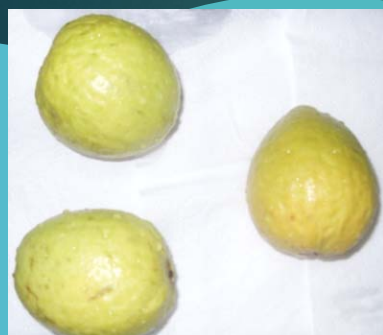


INOCULAÇÃO

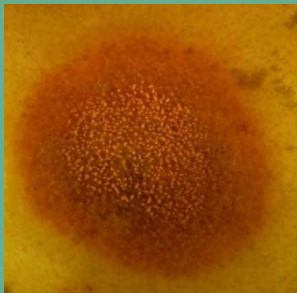
- ***Frutos***
- ***- palito colocado no meio junta/e com cultura do fungo***
- ***- palito mergulhado em suspensão bacteriana***
- ***- ferimento na superfície do fruto com palito infestado pelo inóculo***
- ***- pós-inoculação em ambiente úmido (sacos plásticos ou cubas)***

INOCULAÇÃO DE FRUTOS

Antracnose ou Mancha Chocolate – *Colletotrichum gloeosporioides*



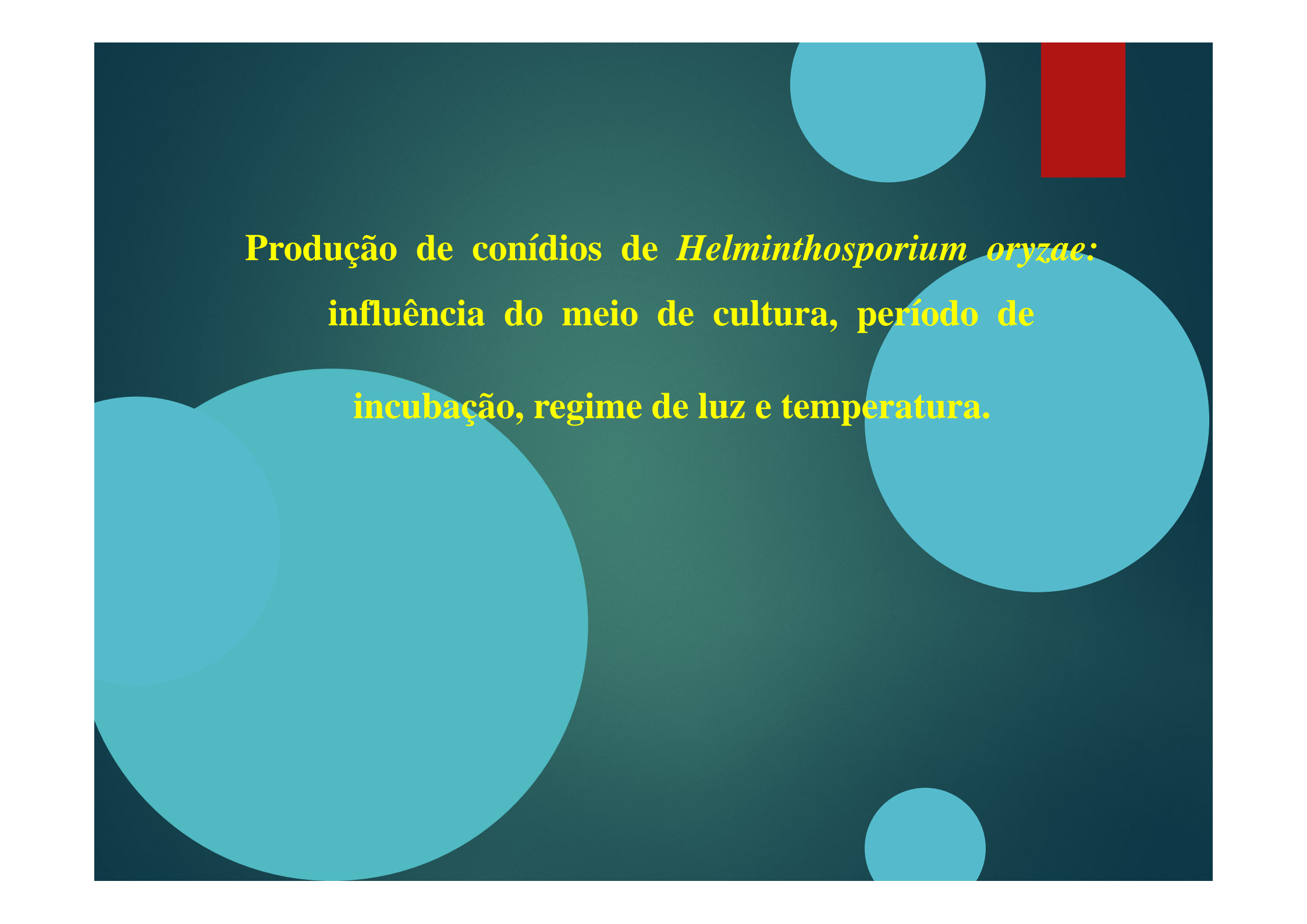
Reisolamento



Fruto doente e lesão





The background is a dark teal color. It features several large, semi-transparent light blue circles of varying sizes scattered across the page. In the top right corner, there is a solid red vertical rectangle.

**Produção de conídios de *Helminthosporium oryzae*:
influência do meio de cultura, período de
incubação, regime de luz e temperatura.**

Produção de conídios de *Helminthosporium oryzae*: influência do meio de cultura, período de incubação, regime de luz e temperatura.

Objetivo: avaliar alguns fatores que possam contribuir para aumentar a esporulação, visando obter a produção massal de conídios.

Material e Métodos:

COMPOSIÇÃO DE MEIOS DE CULTURA:

-BDA

- BDA+ papel de filtro sobreposto
- BDA+ 1% de peptona
- Ágar-água
- Czapeck
- Misato (10 g amido, 1 g extrato de levedura, 15 g ágar)
- Takahashi (10 g sacarose, 10 g peptona, 5 g NaCl, 5 g extr. levedura, 15 g ágar)
- Farelo de arroz (60 g farelo arroz, 15 g ágar)
- Extrato de folha/colmo de arroz (60 g folha/colmo, 15g ágar)

Condições do ensaio

Incubação: 27°C

Regime de luz: 14 horas de escuro/10 horas de luz (lâmpada fluorescente)

Repicagem: disco de micélio de 5 mm de diâmetro no centro da placa

Obtenção do inóculo: colônias de 7 -10 dias de idade

Avaliação: feita aos 5, 7, 10 dias através crescimento micelial e produção de esporos

Quadro 1. Esporulação (E) e crescimento de micélio (C) de *Helminthosporium oryzae* em dez meios de cultura avaliados em três períodos de incubação.

Meios	Períodos de incubação					
	5 dias		7 dias		10 dias	
	C	E	C	E	C	E
BDA + Peptona	7,10 ab [*]	2,06 ^{**}	9,00 a	11,20	9,00 a	16,44 a
Czapeck	3,73 f	0,50	6,20 c	2,75	7,30 b	3,69 b
BDA + papel filtro	5,43 e	0,81	8,33 ab	2,06	9,00 a	3,66 b
BDA	7,23 a	0,25	9,00 a	1,84	9,00 a	3,34 b
Farelo de arroz	6,63 bc	0,27	8,73 a	1,19	9,00 a	2,58 bc
Takahashi	6,00 d	0,31	9,00 a	1,37	9,00 a	2,56 bc
Misato	5,16 e	0,06	9,00 a	1,75	9,00 a	2,19 bcd
Extrato de folha/colmo	6,26 cd	1,02	9,00 a	1,25	9,00 a	1,46 bcd
Arroz polido	5,43 e	0,04	7,93 b	0,08	9,00 a	0,54 cd
Ágar-água	3,30 f	0,00	4,50 d	0,12	6,10 c	0,12 d
Média		0,53 (A)		2,40 (B)		3,66 (C)

* Diâmetro médio de colônias (cm).

** Média do número de esporos ($\times 10^4$) por ml.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

REGIME DE LUZ:

- 8 horas (L) / 16 horas (E)
- 10 horas (L) / 14 horas (E)
- 12 horas (L) / 12 horas (E)
- 16 horas (L) / 8 horas (E)
- Luz contínua
- Escuro contínuo

* Lâmpada fluorescente (40W) a 30 cm de distância/placas de pirex

Condições:

Meios de Cultura:

BDA
BDA + Peptona
Ágar-água

- . Temperatura de incubação: 27°C
- . Período de incubação: 7 dias
- . Repicagem: disco de micélio de 5 mm de diâmetro no centro da placa
- . Obtenção de inóculo: colônias de 7 – 10 dias de idade
- . Avaliação: crescimento micelial e esporulação

Quadro 2. Produção de conídios (E) e crescimento micelial (C) de *Helminthosporium oryzae* em três meios de cultura e em diferentes regimes de luz (horas), sob temperatura de 27°C e período de incubação de sete dias.

Regimes de luz***	Meios de cultura					
	BDA		Ágar-água		BDA + Peptona	
	C	E	C	E	C	E
24 E	9,00 a*	4,14 a*	5,53 a	0,14 a	9,00 a	15,00 a
16 E / 8 L	9,00 a	2,59 b	5,53 ab	0,00 b	9,00 a	5,98 b
14 E / 10 L	9,00 a	1,93 b	4,90 c	0,00 b	9,00 a	6,71 b
12 E / 12 L	9,00 a	2,34 b	5,33 ab	0,00 b	9,00 a	6,34 b
8 E / 16 L	9,00 a	0,65 c	5,50 a	0,00 b	9,00 a	1,29 c
24 L	9,00 a	0,00 c	5,06 bc	0,00 b	9,00 a	0,00 c

* Diâmetro médio de colônias (cm).

** Média do número de conídios ($\times 10^4$) por ml.

*** E = Escuro; L = Luz.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%)

TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO

17° C

23° C

27° C

Condições:

Meios de cultura:

- BDA
- BDA+ Peptona

- Regime de luz: escuro contínuo
- Período de incubação: 7 dias
- Repicagem: disco de micélio de 5 mm de diâmetro no centro da placa
- Obtenção de inóculo: colônias de 7 – 10 dias de idade
- Avaliação: crescimento micelial e esporulação

Quadro 3. Produção de conídios (E) e crescimento micelial (C) de *Helminthosporium oryzae* em dois meios de cultura e em três temperaturas, sob condição de escuro e período de incubação de sete dias.

Tempe- raturas	Meios de cultura			
	BDA		BDA + Peptona	
	C	E	C	E
27 °C	9,00 a [*]	3,00 a ^{***}	9,00 a	15,12 a
23 °C	7,68 b	2,96 a	7,98 a	5,63 b
17 °C	5,70 c	1,88 a	4,51 c	3,29 b

^{*} Diâmetro médio de colônias (cm)

^{***} Média do número de conídios ($\times 10^4$) por ml.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%).

Avaliação da esporulação de isolados nas melhores condições

Quadro 6. Esporulação de diversos isolados de *Helminthosporium oryzae* em BDA e BDA + Peptona, após incubação de 10 dias, a temperatura de 27°C e no escuro contínuo.

Isolados	Meio de cultura	
	BDA	BDA + Peptona
H.O. 82-1	2,49 b*	13,20 a
H.O. 899/3	0,00 a	0,00 a
H.O. IAC	0,03 a	0,00 a
IAC 1152	2,24 b	5,07 a
IAC 4987	0,00 a	0,00 a
IAC 2487	7,86 a	9,47 a
IAC 2351	1,20 a	0,00 a
H-1	0,49 a	0,97 a
H-21	0,00 a	0,00 a
H-22	1,03 a	0,99 a
H-23	0,00 a	0,00 a
Média	1,38 (B)	2,70 (A)

* Média do número de conídios ($\times 10^4$) por ml.

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).