

LADIPE

Laboratório de Desenvolvimento, Inovação, Pesquisa e Extensão

 uergs Vacaria



GUIA PRÁTICO PARA ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS



Thalles Bueno
Felipe Bez
Carla Bocchese
Bruna Drawanz



uergs

**LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO INOVAÇÃO PESQUISA E
EXTENSÃO DA UERGS UNIDADE EM VACARIA**

ORGANIZADORES

THALLES DA ROSA BUENO

FELIPE SUZIN BEZ

CARLA AZAMBUJA CENTENO BOCCHESI

BRUNA BENTO DRAWANZ

**GUIA PRÁTICO PARA ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

VACARIA

2022

ISBN 9786586105391

***Todos os direitos reservados.**

**© 1. ed. 2022 – Organizadores(as) da
Publicação E-book – PDF**



Catálogo de publicação na fonte (CIP)

G943 Guia prático para isolamento e conservação de fungos
fitopatogênicos/ Organizadores(as): Thalles da Rosa Bueno, [et al.]. –
Vacaria: Uergs, 2022.

21 f.

ISBN 9786586105391

1. Cuidados e Manutenção do Laboratório. 2. Fungos. 3.
LADESPE. 4. Rotina de Laboratório. I. Bueno, Thalles da Rosa. II. Bez,
Felipe Suzin. III. Bocchese, Carla Azambuja Centeno. IV. Drawanz,
Bruna Bento. V. Título.

CDU 582.28

Elaborada pelo bibliotecário Marcelo Bresolin – CRB 10/2136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Logotipo LADIPE Uergs - Unidade Vacaria.....	6
Figura 2. Autoclave vertical.	9
Figura 3. Capela de Fluxo laminar com bico de Bunsen.	9
Figura 4. Destilador tipo Pilsen.....	10
Figura 5. Balança de precisão.....	11
Figura 6. Incubadora BOD.....	12
Figura 7. Processo de higienização com água e sabão.	13
Figura 8. Preparo de solução de NaClO.	14
Figura 9. Processo de diluição utilizado para meio de cultura BDA.	16
Figura 10. Vertimento de meio de cultura.	17
Figura 11. Processo de isolamento direto de patógenos.	18
Figura 12. Processo de isolamento indireto de patógenos.....	19
Figura 13. Técnica de conservação através de repicagens periódicas.	20
Figura 14. Técnica de conservação pelo método Castellani.	20

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	6
2. ORIENTAÇÕES GERAIS DE SEGURANÇA E PROTEÇÃO INDIVIDUAL	7
3. CUIDADOS E MANUTENÇÃO DO LABORATÓRIO	8
4. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NAS TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	8
4.1 Autoclave	8
4.2 Capela de Fluxo Laminar	9
4.3 Destilador	10
4.5 Incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D)	12
5. ASSEPSIA DO AMBIENTE E DOS INSTRUMENTOS PARA ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	12
5.1 Higienização das mãos	12
5.2 Assepsia do espaço de trabalho.....	13
5.2.1 Preparo da solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 2%.....	14
5.3 Higiene dos instrumentos de trabalho	15
5.4 Esterilização e acondicionamento das placas de Petri	15
6. PROCEDIMENTOS DE ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE PATÓGENOS	15
6.1 Preparo e utilização de meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)	16
6.2 Isolamento dos patógenos fúngicos	18
6.3 Teste de viabilidade de patógeno	19
7. MANUTENÇÃO DE CULTURAS PURAS	20
8. MENSAGEM FINAL	21

1. APRESENTAÇÃO

Figura 1. Logotipo LADIPE Uergs - Unidade Vacaria.



Fonte: Autores (2022)

Este manual foi desenvolvido pelo grupo de trabalho do Laboratório de Desenvolvimento, Inovação, Pesquisa e Extensão (LADIPE) da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS), unidade Universitária em Vacaria

(Figura 1), a fim de apresentar informações e orientar sobre procedimentos práticos de rotina em um laboratório que desenvolve seus estudos científicos avaliando a atividade de fitopatógenos e seu comportamento frente a possíveis alternativas de controle. As técnicas aqui apresentadas são baseadas em protocolos clássicos da literatura¹, mas com alguns ajustes que se mostraram necessários e eficientes no decorrer dos trabalhos. Por muitas vezes, o grupo se deparou com uma falta de informações detalhadas, corriqueiramente dizendo: “o pulo do gato” para ter sucesso em determinados procedimentos, já que a literatura científica é universal. Por isso, neste guia propõem-se a esmiuçar o passo a passo para o isolamento, armazenamento e crescimento de fungos fitopatogênicos, abordando desde a paramentação do profissional e informações sobre os equipamentos utilizados, até as técnicas microbiológicas.

A história do grupo de autores desse manual começou em 2019, com o início das atividades de pesquisa buscando inibidores naturais para fungos causadores de doenças em pequenas frutas. O grupo de alunos de iniciação científica e professores pesquisadores estavam iniciando suas atividades juntos, equipando um laboratório e tentando ajustar as técnicas básicas à sua pesquisa. Em diversos momentos, por mais que se fizesse buscas à literatura, sentia-se dificuldades em desempenhar determinados protocolos por falta de detalhamento das técnicas. O grupo sempre fez

¹ BERGAMIN FILHO, Armando. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. KIMATI, H. *et al.* **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. CAROLLO, E. M.; SANTOS FILHO, H. P. **Manual básico de técnicas fitopatológicas: laboratório de fitopatologia** Embrapa Mandioca e Fruticultura. Embrapa Mandioca e Fruticultura-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E), 2016.

anotações minuciosas, descrevendo todas as etapas realizadas em cada procedimento e, foi percebido, que havia sido construído um importante material de orientação, então decidiu-se por compartilhá-lo na forma deste guia.

Por experiência própria, sabe-se que o tempo auxilia na execução e domínio das técnicas, por consequência, cada um poderá modificar etapas das técnicas aqui apresentadas da forma que melhor se adaptem às suas necessidades e realidades.

2. ORIENTAÇÕES GERAIS DE SEGURANÇA E PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Em qualquer ambiente laboratorial no qual a pessoa se coloque, é importante observar as saídas de emergência, localizar os extintores de incêndio e acionar exaustores e controladores de temperatura. Ainda, é importante consultar as Fichas de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQs) dos reagentes que for utilizar.²

Antes de executar qualquer atividade em laboratórios é fundamental estar paramentado de acordo com as boas práticas de proteção individual:

- Vestir jaleco/avental confeccionado com em tecido de composição mínima em 67% algodão, com mangas longas e comprimento na altura dos joelhos para proteger as roupas;

- Utilizar calçados fechados visando proteger os pés contra respingos de produtos químicos e cortes por vidraria. Evitar saltos e sapatos com solas deslizantes;

- Vestir calças compridas confeccionadas em tecidos com baixa inflamabilidade;

- Estar com os cabelos presos para evitar que prendam em materiais e equipamentos, ou até mesmo, que sejam atingidos por produtos químicos ou fogo.

- Ter cuidado com o uso de adornos pessoais. Evitar brincos, pulseiras, anéis, colares, bonés e chapéus pois, além do risco de ficarem presos a algum equipamento, também são pontos favoráveis à retenção de microrganismos e produtos químicos.

- Não ingerir comidas e bebidas dentro do laboratório, nem armazenar os mesmos nas geladeiras ou câmaras contendo culturas biológicas e reagentes.

² Baseado no Manual de Segurança de Laboratórios da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

3. CUIDADOS E MANUTENÇÃO DO LABORATÓRIO

Manter condições assépticas do ambiente, equipamentos e ferramentas utilizadas nas atividades práticas é fundamental para garantir a redução de contaminação e interferência nos resultados experimentais.

Todos os materiais utilizados nas técnicas devem ser corretamente embalados, identificados e, se necessário, descartados seguindo as normas de segurança. Quando preparar soluções ou fracionar reagentes, deve-se identificar corretamente os recipientes de armazenamento e datar.

Em caso de utilização produtos químicos seguir veemente as informações descritas no rótulo e nas FISPQs tendo cuidado com o manuseio. Sempre que possível, deve-se utilizar as capelas de exaustão para que não ocorra contato e inalação das substâncias.

Toda pessoa que trabalhar em um laboratório deve estar ciente dos procedimentos de utilização correta de cada equipamento e prestar constante manutenção aos mesmos.

4. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NAS TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

Para desenvolver as atividades com segurança e minimizando os riscos de contaminação, equipamentos de esterilização, purificação e precisão são importantíssimos. O uso correto dos mesmos é fundamental para a segurança e qualidade das técnicas.

4.1 Autoclave

A autoclave (Figura 2) é um equipamento utilizado para as esterilizações, pois proporciona que sejam atingidas temperaturas maiores que o ponto de ebulição da água em condições normais de temperatura e pressão (CNT), uma vez que proporciona um aumento da pressão em seu interior e por consequência o aumento da temperatura de ebulição.

Para correta utilização, deve-se primeiro completar o volume de água até que atinja o suporte metálico abaixo do cesto cilíndrico. O aparelho precisa ser pré-aquecido até que a água atinja a temperatura de ebulição. Os materiais a serem

Figura 2. Autoclave vertical.



Fonte: Autores (2022)

esterilizados devem ser adicionados dentro do cesto, após fecha-se a tampa e as válvulas para que ocorra pressurização. Monitora-se a pressão até que atinja, aproximadamente 1,3 atm, e através da válvula de contrapeso estabiliza-se a pressão entre 1,3 - 1,5 atm.

Recomenda-se que a esterilização dos materiais ocorra por 45 min após atingir 1,3 atm. Ao final do período, o aparelho deve ser desligado e as válvulas abertas para liberação da pressão.

Ao final da utilização e resfriamento, retirar a água do reservatório e descartar. Limpezas periódicas devem ser feitas para conservação do equipamento.

Obs.: No momento do fechamento da tampa não realizar o aperto máximo das travas de segurança, uma vez que após o ganho de pressão elas apresentam uma resistência muito grande. Ao final da esterilização, abrir as válvulas gradualmente e esperar a liberação total da pressão interna para então abrir a tampa.

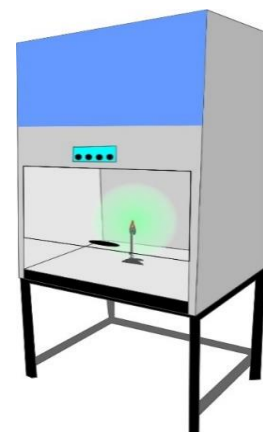
4.2 Capela de Fluxo Laminar

A capela de fluxo laminar (Figura 3) é utilizada, principalmente, para manuseio de material biológico por exemplo, no isolamento de fitopatógenos. Este equipamento mantém as condições do ambiente interno estéreis, o que é fundamental para garantir a pureza dos isolados fitopatogênicos.

Antes do manuseio de materiais biológicos, o aparelho deve ser ligado para acionar o exaustor e a luz ultravioleta, ser higienizado com álcool etílico 70%, deve-se manter a tampa fechada e o sistema funcionando por 15 minutos

antes da manipulação dos materiais biológicos. Em alguns casos, a capela de fluxo laminar pode contar também com um bico de Bunsen em seu interior, neste caso,

Figura 3. Capela de Fluxo laminar com bico de Bunsen.



Fonte: Autores (2022)

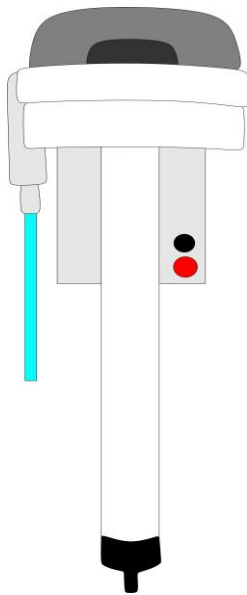
quanto mais perto da chama forem realizadas as práticas biológicas, mais eficaz será a esterilização.

Obs.: Os materiais em embalagens (placas de Petri, lâminas, agulhas, isolados) devem ser abertos, somente, quando já estiverem dentro da capela de fluxo laminar. O bico de Bunsen também pode ser utilizado para flambar instrumentos como: bisturi, alça de Drigalski, lamínulas, entre outros. Limpeza periódicas externas e no filtro do equipamento devem ser realizadas.

4.3 Destilador

Para todo e qualquer preparo de solução ou meio de cultura deve-se utilizar água destilada, uma versão livre de impurezas e sais minerais que podem interferir nos processos.

Figura 4. Destilador tipo Pilsen.



Fonte: Autores (2022)

A água é destilada em um destilador (Figura 4). Para utilizar o destilador deve-se primeiramente ligar o fluxo de água moderadamente, somente, após liga-se o disjuntor e, por último, o botão de acionamento do destilador. Acompanhar a saída de água e regular a vazão para que a temperatura da água de saída permaneça morna ($\approx 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nunca se deve colocar o destilador em aquecimento sem ter fluxo de água em seu reservatório junto a resistência.

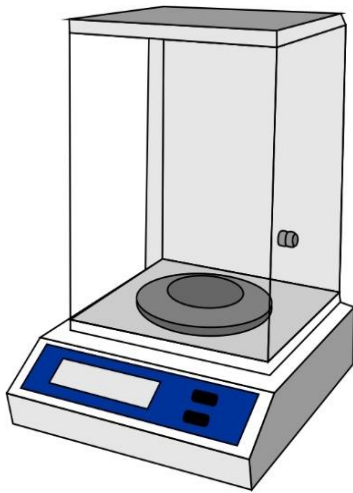
Para desligar o equipamento, desativar primeiro o botão de acionamento (para cessar o aquecimento), depois o disjuntor deixar água corrente circulando no equipamento até o resfriamento da resistência para então cessar o fluxo de água.

Obs.: sabe-que a resistência não está mais quente quando a água corrente sai fria do destilador.

4.4 Balança de Precisão

Existem diferentes tipos de categorias para as balanças. Em procedimentos técnicos e científicos quanto maior for a precisão da balança mais confiáveis serão os resultados. Sugere-se utilizar balanças de precisão analíticas (Figura 5), com medições de quatro casas à direita da vírgula, ou semianalíticas, com sensibilidade para três casas decimais à direita da vírgula.

Figura 5. Balança de precisão



Fonte: Autores (2022)

É necessário ter o hábito de calibrar as balanças rotineiramente. Verificando a marca d'água, mantendo-a sempre ajustada.

As balanças devem ser acondicionadas em ambiente com a menor circulação de ar e níveis normais de umidade. Devido a sua precisão, deslocamentos de ar interferem nas medições. É importante repousá-la em um suporte fixo ou bancada exclusiva, para protegê-la de vibrações. Deve-se respeitar os limites de pesagem de cada equipamento.

A pesagem de qualquer reagente, sólido ou líquido, deve ser realizada em um recipiente apropriado, nunca diretamente no prato da balança para evitar danos ao aparelho e imprecisões nas medidas. Os recipientes adequados para pesagem são: pesa-filtro, béqueres pequenos, cadinhos, vidros de relógio. Atenção redobrada deve ser tomada na pesagem de líquidos, principalmente, os corrosivos e voláteis. O recipiente e a substância submetidos à pesagem, devem estar a mesma temperatura da balança para evitar dilatação do prato e deslocamento de energia.

Após a utilização da balança, deve-se realizar a limpeza do equipamento com auxílio de um pincel, retirar o prato para verificar se há resíduos das pesagens em baixo.

Deve-se manter a câmara fechada e utilizar a balança conectada a um estabilizador ou *nobreak*, pois oscilações na corrente elétrica acabam prejudicando sua precisão.

Obs.: Tomar cuidado ao retirar a base de metal pois, em alguns modelos, existem quatro calços de borracha removíveis logo abaixo.

4.5 Incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D)

A incubadora BOD (Figura 6) desempenha a importante função de proporcionar um ambiente controlado em condições de temperatura, umidade, oxigênio e luminosidade para armazenamento e desenvolvimento de diversos patógenos. As condições mais comumente utilizadas para as práticas microbiológicas são:



Fonte: Autores (2022)

temperatura de 24 °C e fotoperíodo de 12 horas. As condições ideais para a utilização deste equipamento é um ambiente com poucas variações de temperatura, realização de limpezas periódicas com solução de álcool etílico 70% nas paredes, filtro e ventoinha, a fim de manter as condições assépticas, bem como, evitar acúmulo de resíduos e/ou água proveniente do fluxo de ar, abrir a porta somente quando necessário para manter a temperatura interna regular.

Obs.: Todos os materiais biológicos armazenados no equipamento devem estar corretamente embalados e vedados para evitar a contaminação do ambiente e oferecer riscos aos isolados de patógenos.

5. ASSEPSIA DO AMBIENTE E DOS INSTRUMENTOS PARA ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Uma das principais dificuldades encontradas na realização de experimentos biológicos é a contaminação por diferentes microrganismos, uma maneira de reduzir este risco é realizar a limpeza e esterilização do ambiente de trabalho: bancadas, armários, prateleiras, mesas, equipamentos e instrumentos antes e após a sua utilização.

5.1 Higienização das mãos

Antes de qualquer procedimento deve-se realizar a higienização das mãos com água e sabão (Figura 7).

Figura 7. Processo de higienização com água e sabão.



Fonte: Agência Estadual de Vigilância Sanitária (AGEVISA/PB)³

5.2 Assepsia do espaço de trabalho

³ AGEVISA. Agência Estadual de Vigilância Sanitária. 1 Seminário Estadual de Segurança do Paciente. Paraíba. 2021.

As bancadas e os demais móveis do laboratório podem ser limpos utilizando soluções de álcool etílico 70% ou de hipoclorito de sódio (NaClO) 2%. Recomenda-se a limpeza inicial com água e sabão e logo após a esterilização da superfície utilizando alguma das soluções deixando secar em temperatura ambiente por alguns minutos. O chão também deve ser esterilizado utilizando solução de NaClO 2% ou outro produto asséptico disponível.

5.2.1 Preparo da solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 2%

O procedimento descrito neste guia é de preparação de uma solução 2% massa de soluto/volume de solvente (%p/v)⁴. Interpreta-se, como a solução sendo produzida pela dissolução de 2g de soluto (Hipoclorito de sódio) em 100 mL de água destilada. Como esta é uma solução amplamente utilizada na rotina de higienização das práticas apresentadas, indica-se preparar volumes maiores da mesma, respeitando a proporção entre os constituintes da solução.

Para o preparo de 1 L da solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 2%, pesa-se 20 g de NaClO em um béquer, dissolve-se o soluto em uma quantidade de água destilada e transfere-se para um balão volumétrico de 1 L com auxílio de um funil e de

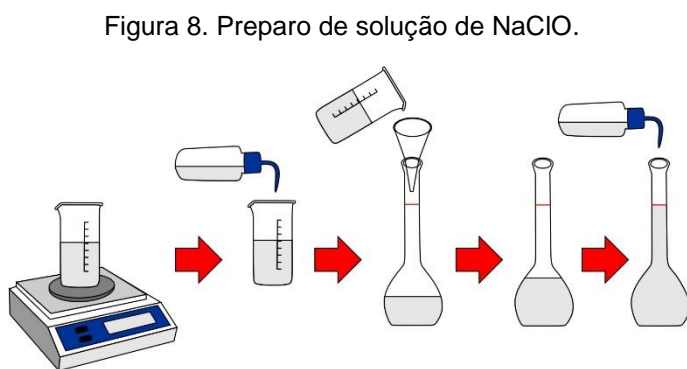


Figura 8. Preparo de solução de NaClO.

Fonte: Autores (2022)

um bastão de vidro. Deve-se fazer ao menos três lavagens do béquer com cerca de 10 mL de água destilada cada, transferindo o líquido para o balão volumétrico, lava-se também o funil com água destilada. Após completa-se o volume da solução considerando o menisco do balão

volumétrico (Figura 8). Tapa-se o balão para homogeneizar bem a solução.

Obs.: Tome cuidado para não verter a mistura hipoclorito de sódio e água para fora do balão volumétrico, comprometendo a concentração, e não utilize volumes grandes de água destilada nas lavagens para não ultrapassar o menisco. Quando próximo ao menisco acerte o volume final com auxílio de uma pipeta de Pasteur ou conta gotas

⁴ LENZI, E. *et al.* **Química Geral Experimental**. 2º Ed. Rio de Janeiro: Editora Freitas Bastos, 2012.

5.3 Higiene dos instrumentos de trabalho

A limpeza de instrumentos de manuseio como pinças, bisturis, alças e agulhas histológicas deve ser realizada da seguinte forma:

1- Antes da utilização, os instrumentos devem ser mergulhados em álcool etílico 70% e flambados em contato com a chama de uma lamparina ou do bico de Bunsen;

2- Durante a utilização dos instrumentos para práticas de manuseio de patógenos, os mesmos devem ser mergulhados em álcool etílico 70%, o excesso pode ser removido com papel autoclavado e em seguida flambados na chama. Repetir o procedimento após cada corte ou contato com material biológico.

Ao final do experimento, é necessário realizar a higienização dos instrumentos, para aqueles resistentes a temperaturas elevadas recomenda-se a esterilização por meio de autoclave.

5.4 Esterilização e acondicionamento das placas de Petri

As placas de Petri devem ser lavadas com água e sabão, secas em estufa na temperatura de 70 °C. Posteriormente, esterilizadas em autoclave por 45 minutos, encaminhadas novamente à estufa para a completa secagem e ao final embrulhadas em duas camadas de papel autoclavado.

Obs.: Nos primeiros procedimentos de esterilização das placas realizados pelo grupo, estas eram lavadas, secas manualmente com pano autoclavado e embrulhadas em papel antes da esterilização na autoclave, contudo, percebeu-se melhora na eficiência da esterilização na autoclave sem o embrulho.

6. PROCEDIMENTOS DE ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DE PATÓGENOS

Integrantes do grupo de pesquisa LADIPE trabalham com isolamento e conservação de patógenos causadores de doenças em vegetais. Inicialmente, a espécie doente é coletada, realiza-se a identificação do agente causal e parte-se para o isolamento dos patógenos em meio de cultura sólido. Uma coleta correta do material vegetal é fundamental para o isolamento dos patógenos, nesse sentido outros colaboradores do grupo publicaram em 2019 o manual intitulado “*Diagnóstico e*

controle de doenças de plantas: conhecimentos básicos e recomendações para coleta de amostras de plantas e informações importantes sobre o local de cultivo".⁵

Por sua vez, como já citado, o presente guia presta-se a descrever e instruir o passo a passo das técnicas partindo do microrganismo identificado.

6.1 Preparo e utilização de meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Diversos são os meios de cultura possíveis, contudo o meio de cultura comumente difundido é o BDA que pode ser encontrado pronto ou preparado em laboratório. A seguir é descrito o preparo do meio BDA a partir de 200 g de batatas:

As batatas devem ser lavadas, descascadas, cortadas em pedaços e adicionadas em uma vasilha, ou pote para utilização em micro-ondas, juntamente com 1 L de água destilada. Submete-se a mistura ao processo de cozimento, em micro-ondas, por aproximadamente 5 minutos.

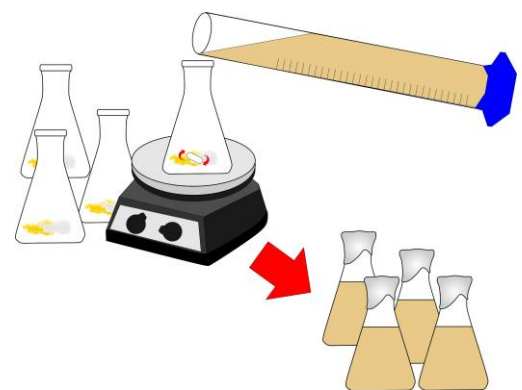
Obs.: acompanhar o processo para que não haja derramamento de água e perda de solução. Para saber o ponto de cozimento realizar o corte da batata com uma faca.

Após, com o auxílio de uma peneira, filtrar as batatas, acondicionar a água do cozimento em uma proveta com capacidade para 1L e completar seu volume com água destilada.

Em 4 erlenmeyers adicionar 250 ml desta solução juntamente com 5 g de Dextrose-Anidra, 5g de Ágar neutro, em seguida, agitar até que ocorra a homogeneização da mistura.

Obs.: Este processo deve ser realizado rapidamente para que não ocorra a solidificação do ágar. Pode-se também adicionar aproximadamente 100ml de caldo no erlenmeyer, agitar e após completar o volume até 250ml.

Figura 9. Processo de diluição utilizado para meio de cultura BDA.



Fonte: Autores (2022)

Realizada a homogeneização, tampar o erlenmeyer com uma bucha de algodão e papel alumínio (Figura 9). Em seguida, encaminhar os erlenmeyers com meio de cultura para esterilização em autoclave durante 45 minutos conforme os passos já

⁵ BOCCHESI, C. A. C; BEZ, F. S; BUNEO, T. R; NEGRETTI, R. **Diagnóstico e controle de doenças de plantas: conhecimentos básicos e recomendações para coleta de amostras de plantas e informações importantes sobre o local de cultivo.** Uergs. Vacaria. 2019.

descritos (seção 4.1). Depois os recipientes com os meios devem ser vedados com plástico filme para diminuir as contaminações por contato com o meio externo e, ao final, serem armazenados em refrigerador para futura utilização.

Obs.: Em alguns procedimentos foi observada a contaminação dos meios de cultura pelo contato com o algodão na hora da homogeneização, por isso passou-se a adicionar uma barra magnética ao conjunto e fazer a homogeneização em placa de agitação.

Para utilização do meio de cultura, o mesmo deve ser aquecido em micro-ondas novamente para liquefazer e se tornar manipulável. Esse processo leva cerca de 3 minutos.

Para garantir melhores condições assépticas, o preparo de placas deve ser realizado dentro da capela de fluxo laminar. Os recipientes contendo o meio de cultura já fundidos devem ser abertos, apenas, dentro da capela de fluxo laminar. Para o isolamento de fungos, recomenda-se a adição de antibiótico, a dosagem varia de acordo com o tipo escolhido, além disso, para evitar a perda de eficiência, o antibiótico deve ser adicionado ao meio de cultura com temperatura em torno de 40 °C.

Após a adição de antibiótico deve-se agitar novamente. Ao final, o meio pode ser vertido nas placas de Petri até que preencha todo o fundo. É importante realizar este processo próximo ao bico de Bunsen deixando as placas semiabertas para minimizar as contaminações (Figura 10).

Ao final, desligar o bico de Bunsen, fechar a tampa da capela por um período de 10 a 15 minutos para que ocorra a esterilização com luz UV e aguardar a solidificação do meio vertido nas placas, se não forem utilizadas no momento, as placas devem ser vedadas com plástico filme e armazenadas em refrigerador.

Obs.: O processo de fundição do meio pode ser facilitado com a presença de uma barra magnética e auxílio de chapa de agitação e aquecimento. Da mesma forma que seu resfriamento, para a adição do antibiótico, é facilitado acondicionando o frasco em uma vasilha com água e sob agitação. O grupo observou que é muito importante não haver contato do meio de cultura com a bucha de algodão que tampa o Erlenmeyer, pois isto ocasionou contaminação dos meios de cultura.

Figura 10. Vertimento de meio de cultura.



Fonte: Autores (2022)

6.2 Isolamento dos patógenos fúngicos⁶

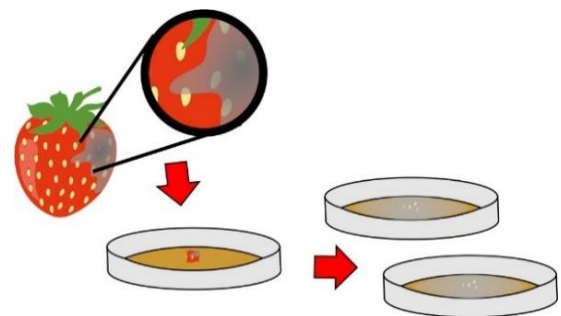
O isolamento é uma das técnicas utilizadas para identificação de patógenos, baseada em características morfológicas com auxílio de referências literárias específicas para este fim, cada microrganismo dispõe de uma ou mais técnicas próprias para isolamento.

As técnicas mais utilizadas de isolamento de fungos fitopatogênicos são:

a) Isolamento direto: Realizar a higienização primária do material contaminado (fruto, folhas, raízes que apresentam os sintomas da doença) com solução NaClO 2% durante 2 minutos, após realizar a lavagem do excesso da solução de

NaClO 2% com água destilada autoclavada deixando secar em temperatura ambiente ou secar com auxílio de papel autoclavado. Em seguida realizar cortes no tecido vegetal em regiões marginais aos sintomas (tomar área com tecido sadio e contaminado), depositar as parcelas do material cortado sobre a superfície

Figura 11. Processo de isolamento direto de patógenos.



Fonte: Autores (2022)

do meio de cultura equidistantes umas das outras ou ao centro de cada placa em caso de uma única parcela por placa (Figura 11). Após a inoculação as placas devem ser vedadas com plástico filme, identificadas e armazenadas em incubadora BOD.

Obs.: Novos isolamentos podem ser requeridos a fim de obter um isolado puro, uma vez que o isolamento direto pode atribuir microrganismos contaminantes presentes no material vegetal ao meio de cultura.

b) Isolamento indireto: Este método é uma alternativa para reduzir as possibilidades de contaminação por microrganismos saprófitas, pois é realizada uma nova etapa de isolamento em busca da pureza do patógeno alvo.

Seguindo inicialmente o mesmo procedimento descrito em 6.2a, deve-se realizar a higienização do material vegetal contaminado com NaClO 2%, efetuar cortes nas regiões marginais aos sintomas da doença e depositá-las sobre meio de cultura BDA endurecidos nas placas de Petri e armazenar em incubadora B.O.D. Após o

⁶ ALFENAS, Acelino C. **Métodos em fitopatologia**. UFV, 2007.

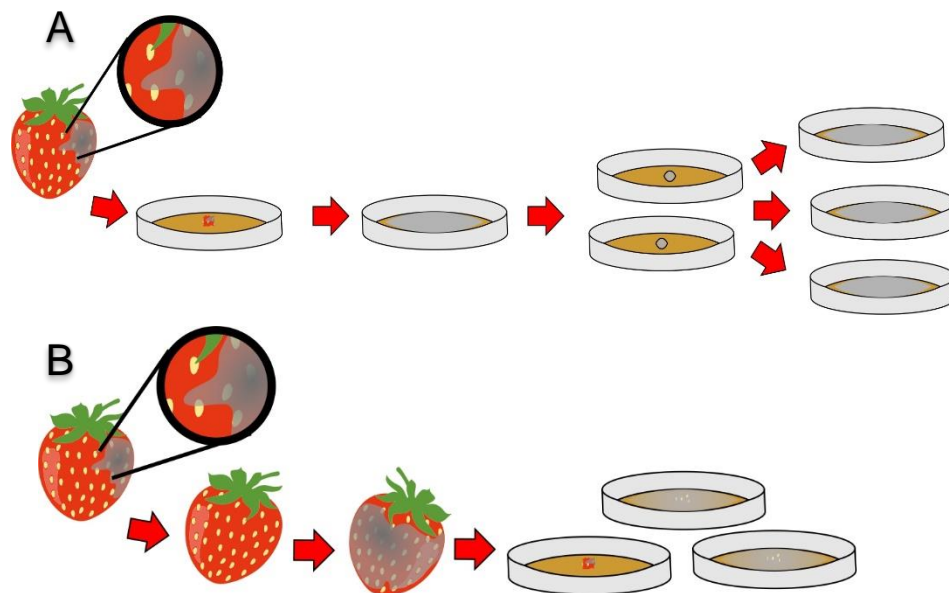
BERGAMIN FILHO, Armando. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995.

KIMATI, H. *et al.* **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

desenvolvimento do micélio, efetuar recortes deste e, novamente, depositar as estruturas do patógeno alvo em novas placas de Petri contendo BDA, para chegar ao meio de cultura puro (Figura 12A).

Pode-se também, depositar as estruturas do patógeno em material vegetal sadio e higienizado (Figura 12B), armazenando-o em incubadora B.O.D e, após o desenvolvimento dos sintomas, as estruturas do patógeno alvo podem novamente ser recortadas e isoladas em meio de cultura BDA.

Figura 12. Processo de isolamento indireto de patógenos.



Fonte: Autores (2022)

6.3 Teste de viabilidade de patógeno

Esta prática, tem por objetivo testar a viabilidade das estruturas contaminantes isoladas. Semelhante aos Postulados de Koch, o teste consiste na inoculação de estruturas de um fungo isolado sobre um tecido sadio, acompanha-se a evolução da doença através da observação dos sintomas e sinais apresentados e em comparação com a literatura⁷ determina-se a pureza do isolado, bem como, sua viabilidade patogênica (capacidade de infectar tecidos novos).

⁷ BERGAMIN FILHO, Armando. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995.

KIMATI, H. *et al.* **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

⁷ BARNETT, Horace Leslie *et al.* **Genera ilustrado de fungos imperfeitos. Genera ilustrado de fungos imperfeitos.**, n. 3rd ed, 1972.

Obs.: Para a contaminação do tecido sadio pode-se seguir a primeira parte dos procedimentos descritos no processo de isolamento indireto (Seção 6.2-b).

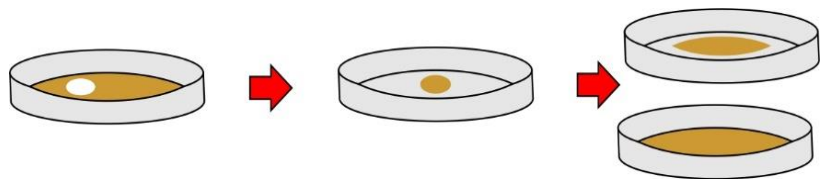
7. CONSERVAÇÃO DE CULTURAS PURAS

Após o isolamento do patógeno, as técnicas para conservação de isolados em culturas puras mais utilizadas são:

a) Repicagens periódicas:⁸

Consiste no isolamento de patógenos em novas placas de Petri a partir de uma placa matriz pura (Figura 13). Seguindo as práticas descritas no isolamento do patógeno (Seção 6.2).

Figura 13. Técnica de conservação através de repicagens periódicas.

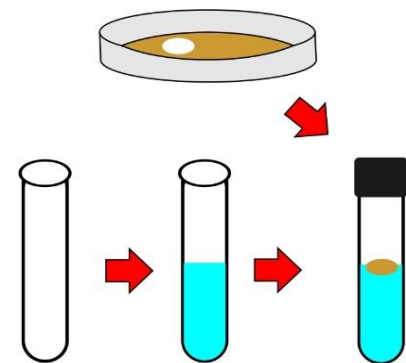


Fonte: Autores (2022)

b) Método Castellani:⁹

Devido a facilidade prática, este é um dos métodos mais utilizados para a conservação de isolados puros pelo grupo LADIPE. Este consiste no armazenamento da cultura em água destilada. Deve-se escolher recipientes (podem ser tubos de ensaio ou falcons) com tampa, preencher a metade de sua capacidade com água destilada autoclavada e sobre a água depositar discos de micélio retirados dos isolados puros (Figura 14). Os frascos devidamente vedados podem ser armazenados em BOD (12 a 18 meses) ou em refrigerador.

Figura 14. Técnica de conservação pelo método Castellani.



Fonte: Autores (2022)

Também deve-se realizar o teste de viabilidade dos isolados antes de sua utilização para as práticas ou ensaios.

⁸ ALFENAS, Acelino C. **Métodos em fitopatologia**. UFV, 2007.

⁹ BRAÚNA, L. M. et al. Efeito de quatro diferentes métodos de preservação sobre o crescimento e a viabilidade de fungos agentes de controle biológico. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2009.

8. MENSAGEM FINAL

No “*Guia prático para isolamento e conservação de fungos fitopatogênicos*” foram sumarizadas informações sobre os conjuntos que compõem o trabalho em um laboratório acadêmico:

1) Pessoal: informações sobre os equipamentos e ações para a proteção individual e coletiva;

2) Equipamentos: descrição e dicas para um bom funcionamento dos equipamentos básicos as práticas de isolamento de fitopatogênicos;

3) Técnicas: apresentação das técnicas clássicas da literatura para o isolamento de fungos fitopatogênicos, enriquecidas com detalhes que foram fundamentais para o encontro de caminhos específicos que culminaram no tão esperado êxito de execução e reprodução das técnicas.

Com este singelo material, espera-se ter auxiliado colegas no desenvolvimento dos seus trabalhos.

ISBN 9786586105391