

CAPÍTULO 6

Detecção, Isolamento e Inoculação de Bactérias Fitopatogênicas

*Reginaldo Gonçalves Mafia
Acelino Couto Alfenas
Rivaldalve Coelho Gonçalves*

1 Introdução

Na natureza, a maioria das bactérias é benéfica; no entanto, um subgrupo destes procariontes é capaz de causar doenças em culturas agronômicas e florestais. Aproximadamente 100 espécies de bactérias são fitopatogênicas, podendo ser extremamente destrutivas, especialmente sob condições de ambiente favorável à doença (Agris, 1997). Na área florestal, as doenças de etiologia bacteriana são relativamente recentes; por esse motivo, existe uma escassez de estudos para este tipo de patógeno. Assim como é realizado para doenças fúngicas, o estudo de doenças causadas por bactérias também requer o conhecimento dos métodos de detecção, isolamento e inoculação. Estes métodos permitem realizar o diagnóstico correto e preciso, comprovar a etiologia da doença e viabilizar outros estudos, incluindo a determinação das condições ambientes favoráveis à infecção e otimização das medidas de controle.

O isolamento de bactérias fitopatogênicas, embora se assemelhe ao que é realizado para fungos, demanda cuidados especiais de assepsia, principalmente em função do grande número de operações envolvidas e da associação quase sempre existente de bactérias saprofitas, mormente nas lesões mais velhas (Romeiro, 2001).

As inoculações com fitobactérias diferenciam das inoculações com fungos, especialmente quanto à quantificação da concentração de inóculo e aos cuida-

dos necessários durante o acondicionamento das plantas pré e pós-inoculação. Além disso, em fitobacteriologia é possível, por meio de inoculações, realizar a indução de reação de hipersensibilidade (Hypersensitive Reaction, HR) para comprovar a patogenicidade das colônias obtidas no isolamento.

2 Detecção de Bactérias Fitopatogênicas

Diferentemente de doenças de origem fúngica, as bacterioses de plantas normalmente têm sido diagnosticadas, com maior segurança, apenas no laboratório. Desse modo, após suspeita de bacteriose numa planta, amostras do órgão infectado devem ser colhidas, acondicionadas em sacos de papel, envolvidos por um saco plástico e em seguida acondicionadas numa caixa de isopor, contendo gelo misturado com jornal picado, serragem ou vermiculita, a fim de manter a temperatura baixa durante o transporte. A caixa de isopor deve ser hermeticamente fechada, com fita adesiva ou similar, devendo as amostras chegar ao laboratório, preferencialmente, até 24 h após a coleta.

Normalmente, o padrão sintomatológico de manchas foliares de etiologia bacteriana varia muito (Figura 6.1 A) e, por esse motivo, a comprovação do envolvimento de fitobactérias em determinada enfermidade tem sido feita após a visualização de sinais, evidenciado por exsudação de células bacterianas (Figura 6.1 B). Dependendo do órgão infectado, diferentes técnicas podem ser empregadas para expor as células bacterianas ao meio externo ou para estimular sua exsudação. Além de possibilitar a comprovação da etiologia bacteriana, a exsudação de células permite realizar o isolamento direto do agente etiológico, principalmente quando se trata de órgãos infectados de maior volume como caule de plantas arbóreas.

2.1 Detecção de fitobactérias em caules

No caso de doença em caule e ramos (Figura 6.2 A), como a murcha bacteriana do eucalipto causada por *Ralstonia solanacearum*, a comprovação da etiologia bacteriana pode ser feita ainda no campo (Figura 6.2 B), diferentemente de doenças em folhas em que existe a necessidade de recursos laboratoriais. Para estas doenças, realiza-se o corte da árvore na região lesionada e a secção do caule é colocada dentro de um recipiente com água limpa. Quando há grande número de células bacterianas dentro dos tecidos, ocorre exsudação de pus bacteriano na superfície superior do corte (Figura 6.2 C). No entanto, dependendo do grau de colonização dos tecidos vasculares, a exsudação em copo ou tubo de ensaio com água não é visualizada, sendo necessário empregar o teste de exsudação em gota e visualização microscópica (Figura 6.2 D).

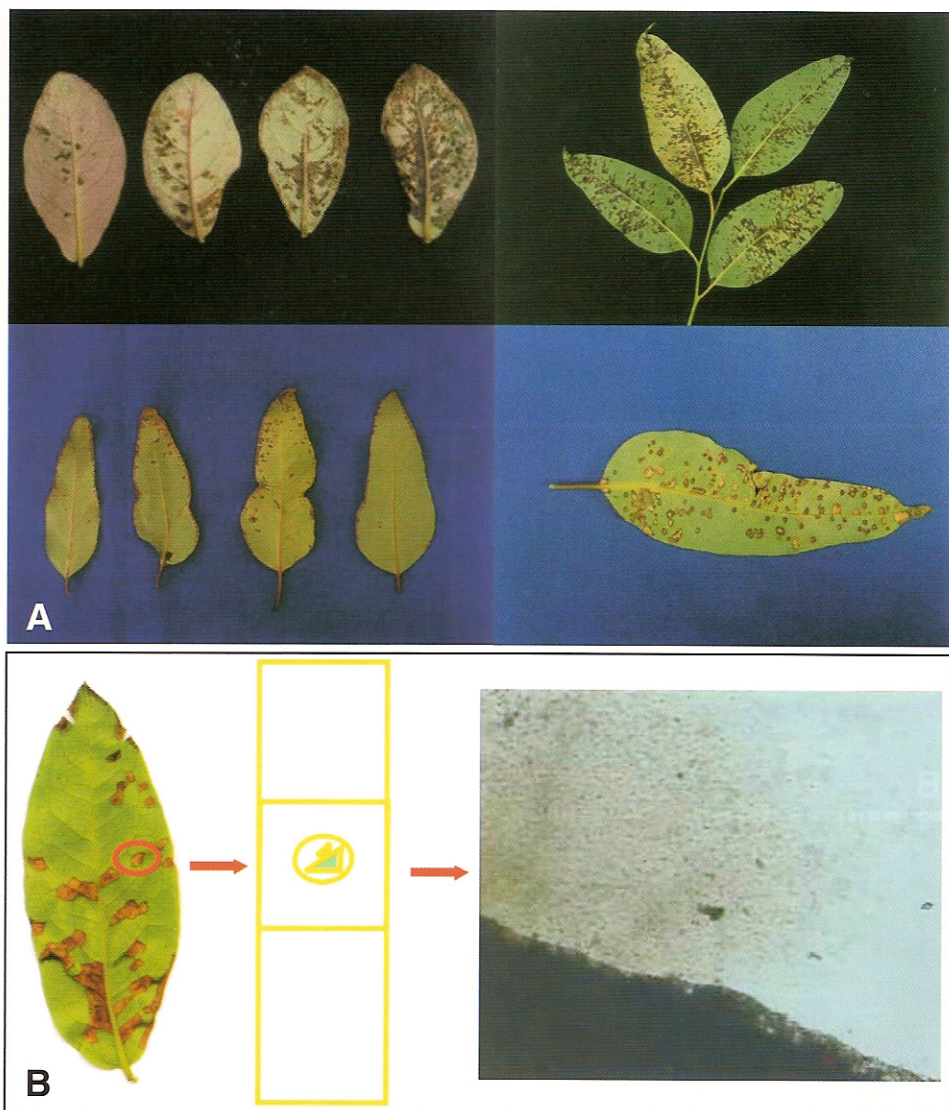


Figura 6.1 - Detecção de fitobacterioses em tecido foliar: A - Variação sintomatológica de lesões bacterianas em folhas de *Eucalyptus* spp.; e B - Detecção microscópica de pus bacteriano em gota d'água.

Para realizar a detecção de bactérias em ramos, retira-se uma seção longitudinal na extremidade do tecido sadio, e em seguida esse corte é colocado em contato com a parede de um copo ou béquer contendo água limpa. Quando presente, a bactéria escorre como um filete de pus para o fundo do recipiente.

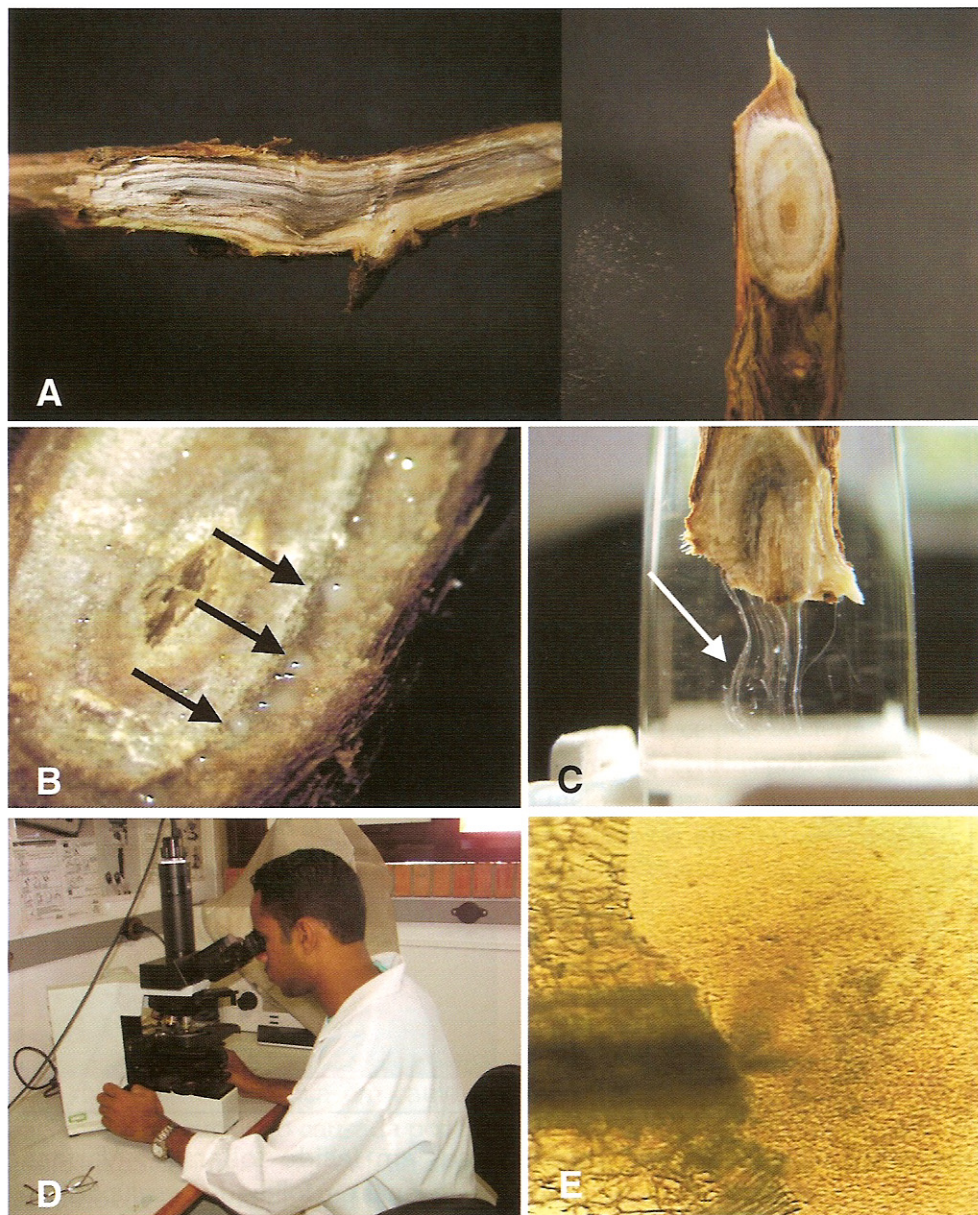


Figura 6.2 - Detecção de *Ralstonia solanacearum* em tecido infectado do hospedeiro: A - Escurecimento do lenho; B - Pus bacteriano na superfície seccionada; C - Exsudação de pus bacteriano em copo com água; D - Observação microscópica de pus bacteriano; e E) Exsudação microscópica de pus.

2.2 Detecção de fitobactérias em folhas

Nas lesões foliares (Figura 6.1 A), o teste de exsudação em gota é o mais apropriado para a detecção de bactérias (Figura 6.1 B). Para isso, corte, nas margens da lesão, um fragmento retangular com aproximadamente 0,4 x 0,5 cm e coloque-o em uma gota de água limpa numa lâmina microscópica. Cubra o fragmento com lamínula e observe ao microscópio no menor aumento, com o diafragma fechado e condensador abaixado. Quando as células bacterianas estão presentes na lesão, estas exsudam a partir do interior dos tecidos para o meio externo, como pus bacteriano. Em ramos, a detecção de bactérias também pode ser feita por este teste, no entanto é necessário realizar um corte fino do tecido infectado para facilitar a visualização.

O teste de exsudação em gota é um método rápido, sensível, seguro e não subjetivo para comprovação do envolvimento de fitobactérias em doenças de plantas; no entanto, deve-se considerar que estes procariontos podem exsudar com maior ou menor intensidade. Além disso, cuidados devem ser tomados na interpretação do que se visualiza durante a realização do teste. Exsudação de outras substâncias como gomas e látex, presentes em algumas espécies ou exsudação de massa de esporos diminutos de algum fungo presente no tecido lesionado podem gerar conclusões equivocadas (Romeiro, 2001).

3 Meios de Cultura para Isolamento de Fitobactérias

As bactérias fitopatogênicas e não-fastidiosas são tipicamente quimioeterotróficas (Romeiro, 1995). Nesse caso, a fonte de energia é exógena e sempre obtida pela metabolização de compostos orgânicos do carbono (Romeiro, 2001). Diante desta particularidade, o isolamento de bactérias fitopatogênicas deve ser realizado em meios de cultura que forneçam macro e microelementos essenciais à multiplicação e sobrevivência das células, além da otimização de outros fatores como o ajuste do pH próximo ao neutro.

Os meios de cultura empregados rotineiramente podem ser divididos em sintéticos, semi-sintéticos ou naturais, dependendo do conhecimento de sua composição. Enquanto os meios de cultura sintéticos são produzidos pela mistura de substâncias químicas puras e em quantidades conhecidas, os meios naturais são obtidos pela decocção ou por meio de extratos de órgãos vegetais ou de tecidos animais. Os meios semi-sintéticos são produzidos pela mistura de substâncias químicas puras e produtos de origem natural e, por esse motivo, assim como os meios naturais, não apresentam a composição completamente conhecida.

Normalmente, os meios de cultura semi-sintéticos são os mais utilizados na rotina de pesquisas com fitobactérias (Romeiro, 2001). No Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno (UFV), o meio 523 de Kado e Heskett (1970) tem sido utilizado para isolamento, armazenamento por curto intervalo de tempo e multiplicação de fitobactérias. No entanto, para casos especiais de diagnose e dependendo do objetivo do trabalho, pode se fazer uso de mais de um meio de cultura (Schaad, 2001).

O meio de cultura 523 de Kado e Heskett (1970) (Tabela 6.1) suporta o crescimento da maioria das espécies de fitobactérias não fastidiosas, proporcionando rápido crescimento e boa transparência (Romeiro, 2001). Esta última característica é importante para facilitar a visualização da morfologia das colônias obtidas no isolamento.

Tabela 6.1 - Composição do meio 523 utilizado para isolamento, armazenamento e multiplicação de fitobactérias

Componentes	Quantidade
Sacarose	10,0 g
Caseína ácida hidrolisada	8,0 g
Extrato de levedura	4,0 g
K_2HPO_4 (anidro)	2,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 g
Ágar	15,0 g
Água destilada (q.s.p.)	1.000 mL

Fonte: Kado e Heskett (1970).

O meio de cultura nutriente-ágar (NA) (Tabela 6.2) pode também ser utilizado para o cultivo de bactérias causadoras de doenças em plantas, embora este meio seja mais apropriado para o cultivo de bactérias não-fitopatogênicas. Quando o ágar é retirado da composição do meio nutriente-ágar (NA), ao meio líquido resultante dar-se-á o nome de caldo nutriente (NB) "Nutrient Broth". Uma das vantagens deste tipo de meio consiste na redução da produção de massa capsular, que interfere na calibração de curvas de crescimento, pelo método de diluição em placas, principalmente em espécies de *Xanthomonas* (Romeiro, 2001).

Tabela 6.2 - Composição do meio nutriente-ágar (NA) utilizado para o cultivo de bactérias, especialmente na calibração de curvas de crescimento pelo método de diluição em placas

Componentes	Quantidade
Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada (q.s.p.)	1.000 mL

Fonte: Dhingra e Sinclair (1995).

O meio nutriente-ágar pode ser suplementado com glicose a 2,5 g/L, passando, nesse caso, a denominar-se nutriente glicose-ágar (NGA) ou caldo nutriente-glicose (NGB), quando se omite o ágar (Romeiro, 2001).

O meio de batata-dextrose-ágar (BDA) também pode ser utilizado para o cultivo de células bacterianas, no entanto este deve ter o seu pH ajustado para 7,0.

Há atualmente vários meios de cultura disponíveis para o cultivo de fitobactérias, incluindo meios sintéticos para atender a determinados objetivos da pesquisa (Mariano et al., 2000). A título de exemplo, o meio B de King (King et al., 1954) é muito útil para evidenciar a fluorescência de determinadas espécies de bactérias e para estudos que buscam comprovar a produção de sideróforos (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 - Composição do meio B de King utilizado para evidencialização de fluorescência e comprovação da produção de sideróforos

Componentes	Quantidade
Proteose peptona n° 3	20,0 g
K_2HPO_4	1,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g
Ágar	15,0 g
Glicerol	15 mL
Água destilada (q.s.p.)	1.000 mL

Fonte: King et al. (1954).

4 Métodos de Isolamento

Em bacterioses de plantas, normalmente não é possível utilizar os sinais (células bacterianas) do patógeno para realizar o isolamento, uma vez que as bactérias fitopatogênicas causam doença colonizando os espaços intercelulares. Desse modo, a classificação dos métodos de isolamento diferencia-se da utilizada para fungos. Desse modo, os métodos de isolamento serão assim classificados: direto, quando houver a possibilidade de transferência direta das células bacterianas para o meio de isolamento ou quando as células forem isoladas a partir de tecidos internos sem a necessidade de desinfestação; e indireto, quando o isolamento for realizado a partir de tecidos superficiais e obrigatoriamente demandar a desinfestação. Em situações especiais, pode-se lançar mão também do uso de iscas biológicas e meios seletivos como grupo de fitobactérias enterobacteriaceae que causam podridões (Dickey e Kelman, 1988).

Isolamento direto

No caso de bactérias que infectam os feixes vasculares, como *Ralstonia solanacearum*, o isolamento pode ser feito diretamente a partir do pus exsudado para meio de cultura 523 de Kado e Heskett (1970) sólido em placas de Petri, riscando-se a massa de células na superfície do meio com alça de platina, sob condições de assepsia. A diluição do pus bacteriano em solução salina (NaCl a 0,85%) e a semeadura com alça de Drigalski sobre o meio sólido em placas de Petri também podem ser empregadas com sucesso. Nesse caso, um grande número de colônias individuais será obtido, a partir das quais se repicam as colônias individualizadas para tubos de ensaio contendo meio agarizado.

Material necessário

- a) Plantas com infecção dos feixes vasculares.
- b) Faca ou facão afiados.
- c) Béquer de 100 mL com água esterilizada.
- d) Saco plástico para fazer câmara úmida.
- e) Placas de Petri e tubos de ensaio com meio 523 de Kado e Heskett (1970).
- f) Tubos com 9,9 mL de NaCl 0,85%.

Procedimento

- a) Seccione o caule da planta no coleto e acima da região com sintomas de depressão na casca e lave-o com água e detergente.
- b) Faça secções de 12 cm de comprimento em bisel no caule e coloque-as dentro de um béquer com água esterilizada até a metade.
- c) Cubra o béquer com saco plástico transparente, amarre-o para formar câmara úmida e mantenha a amostra sobre o balcão de laboratório por 24 h.
- d) Proceda ao isolamento direto para placas de Petri contendo meio de cultura, espalhando o pus bacteriano exsudado na superfície do corte, pelo método de estrias.
- e) Dilua uma alçada de células em NaCl 0,85% até 10^{-6} e semeie 100 mL em meio 523 de Kado e Heskett (1970).
- f) Mantenha as placas a 28 °C por até 72 h e repique colônias individualizadas para tubos de ensaio contendo meio 523 de Kado e Heskett (1970).

4.1 Isolamento direto a partir de tecidos internos

O isolamento direto tem a premissa básica de ser incomum o fato de duas bactérias colonizarem concomitantemente o mesmo tecido vegetal (Romeiro, 1976). Além disso, principalmente para lesões recentes, a probabilidade de invasão secundária por microrganismos saprófitas – procariotas ou eucariotas – é bem menor. Nesse sentido, pode-se assumir que existe uma grande chance de a bactéria fitopatogênica estar presente de forma isolada nos espaços intercelulares e, ou, nos feixes vasculares. Embora resulte em economia de tempo e material, o isolamento direto é aconselhável apenas para órgãos vegetais volumosos como caules e frutos, com porções relativamente espessas de tecidos que poderão ser retirados para eliminar as contaminações externas. Nesse caso, as operações de desinfestação com hipoclorito de sódio ou de cálcio e lavagem dos fragmentos em água esterilizada não são necessárias. Os procedimentos para realizar o isolamento direto (Romeiro, 2001) são listados a seguir:

- a) Lave o órgão vegetal com água e detergente neutro e seque-o com papel-toalha ou similar. A seguir, realize duas ou três flambagens após mergulhar o órgão em álcool absoluto. Divida o órgão vegetal em duas metades com o auxílio de um escalpelo previamente flambado, de forma a expor os tecidos internos.
- b) A partir de um local distante da periferia do órgão vegetal e do local da incisão, que apresente, no entanto, sintomas ou alterações de cor, rigidez e, ou,

consistência, retire, com o escalpelo flambado e resfriado, pequenos fragmentos do tecido infectado e deposite-os em uma gota de água esterilizada contida em uma placa de Petri esterilizada.

- c) Macere os fragmentos utilizando um escalpelo previamente esterilizado e, após 20 a 30 min, realize a distribuição da suspensão obtida em placas contendo o meio de cultura para isolamento.

4.2 Isolamento indireto

O método de isolamento indireto baseia-se na separação espacial do patógeno promovida pelos tecidos do hospedeiro. Nesse sentido, espera-se que no interior dos órgãos lesionados existam somente fitobactérias e que no exterior estariam saprófitas, incluindo fungos e bactérias. Além disso, a associação de duas ou mais fitobactérias não ocorre normalmente nos tecidos internos, bem como a presença de microrganismos saprófitas (Romeiro, 2001).

O isolamento indireto deve ser realizado a partir das bordas da lesão, onde as chances de existirem microrganismos saprófitas e oportunistas é menor. Além disso, nessa região, espera-se que a fitobactéria esteja fisiologicamente mais ativa. Os cuidados adotados no isolamento indireto ainda incluem a utilização de lesões recentes, cujos tecidos do hospedeiro não foram ainda invadidos por microbiota oportunista. A seguir são listados os procedimentos para realizar o isolamento indireto, conforme recomendações de Romeiro (2001):

- a) Lave cuidadosamente o órgão vegetal infectado com água e sabão neutro e em seguida enxugue-o com papel-toalha.
- b) Com o auxílio de um escalpelo previamente flambado, remova parte do tecido infectado e, a partir das bordas da lesão, retire fragmentos de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm.
- c) Realize a desinfestação dos fragmentos, mergulhando-os em álcool 50% por 20 a 30 s, em seguida em solução de hipoclorito de sódio ou de cálcio (2%) por 1 a 5 min e finalmente remova o excesso dos desinfestantes, lavando os fragmentos ao menos três vezes em água destilada e esterilizada.
- d) Deposite uma gota de água destilada e esterilizada no fundo de uma placa de Petri também esterilizada e transfira três ou quatro fragmentos para essa gota. Com o auxílio de um escalpelo previamente flambado, macere os fragmentos, aguarde 20 a 30 min e realize a semeadura da suspensão obtida na superfície do meio de cultura.

5 Semeadura da Suspensão de Células em Meio de Cultura Sólido

Existem basicamente três formas para proceder à semeadura da suspensão de células, obtida durante o isolamento. Independentemente da forma utilizada, o princípio é o mesmo, ou seja, realizar a diluição de forma a atingir uma população, na qual colônias individualizadas possam ser formadas. A formação de colônias individuais facilita as inspeções visuais, onde será possível comparar características morfológicas (cor, tamanho, brilho, elevação, bordas etc.) com o tipo de colônia esperada ou descrita na literatura, e permite maior homogeneidade das características genotípicas e fenotípicas dos isolados originados a partir de uma única célula (Romeiro, 2001).

5.1 Semeadura pelo método de estrias ou riscas

Existem duas formas de realizar as estrias ou riscas, denominadas estrias simples ou compostas (Figura 6.3). No primeiro caso, as estrias são feitas de forma contínua, em movimentos de ziguezague e, no segundo, de forma entrecruzada. Em todas as situações, no entanto, o objetivo é o mesmo, ou seja, diluir a concentração de células para possibilitar o desenvolvimento de colônias individualizadas.

Procedimento para realização de estrias simples

Com a alça de repicagem previamente flambada e resfriada, toque na suspensão de células e deposite o excesso em um ponto próximo à borda da placa de Petri contendo o meio de cultura. Toque na suspensão de inóculo previamente depositada no pólo da placa e, a partir daí, realize movimentos de ziguezague como se estivesse limpando a alça de repicagem, em movimentos suaves e aproveitando ao máximo a superfície do meio de cultura até o outro pólo da placa.

Procedimento para realização de estrias compostas

- a) Após flambar e resfriar a alça de repicagem, retire uma gota da suspensão de células e deposite o excesso em um ponto próximo à borda da placa.
- b) Sem flambar a alça, trace três a quatro riscas paralelas espaçadas de 0,5 cm, sendo a primeira distanciada do local onde foi feito o depósito de inóculo de aproximadamente 1 cm. As riscas não devem ultrapassar a metade da placa.

- c) Flambe a alça, resfrie a sua ponta e em seguida realize de três a quatro estrias paralelas em ângulo reto em relação às primeiras, partindo da primeira risca da primeira série.
- d) Procedendo da mesma forma, realize mais três ou quatro riscas paralelas e em ângulo reto com as da segunda série. Repetir a mesma operação, traçando riscas paralelas em ângulo reto com as da terceira série.

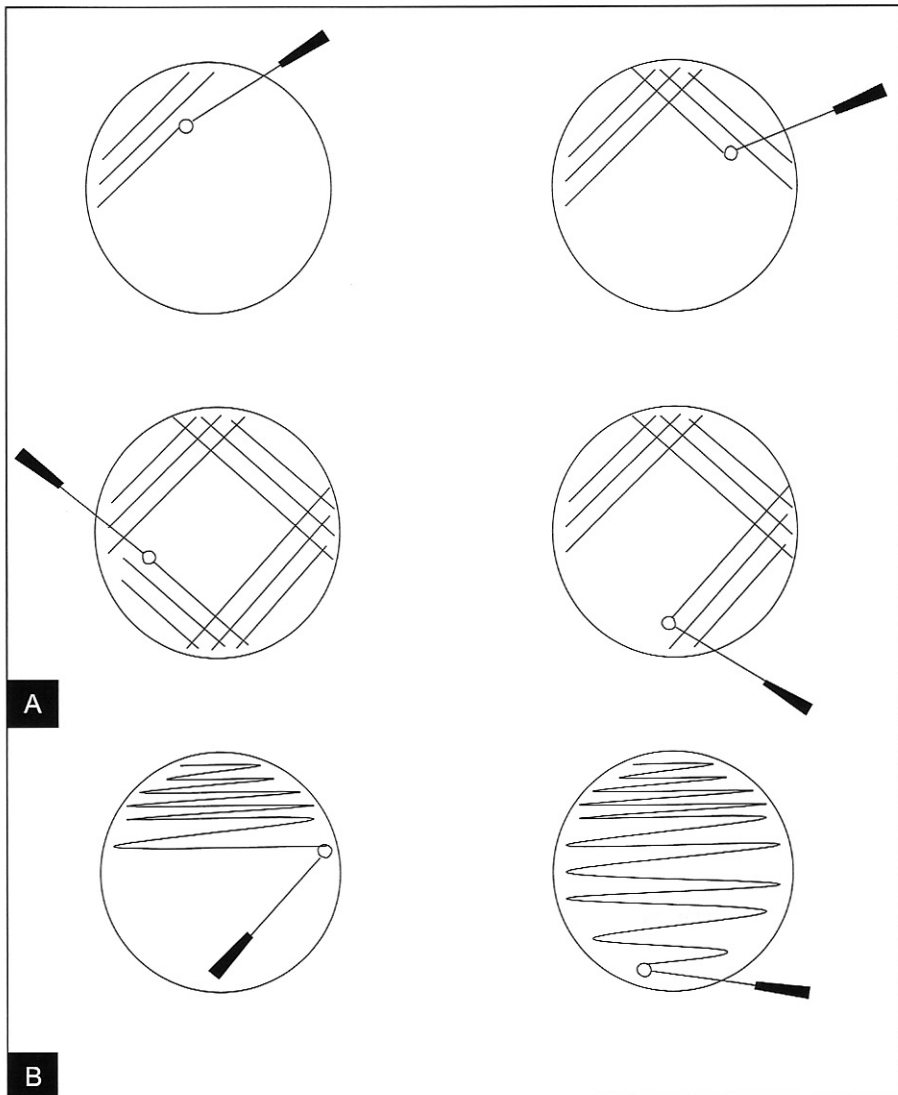


Figura 6.3 - Semeadura de bactérias pelo método de estrias: A - Estrias compostas; e B - Estrias simples.

5.2 Semeadura pelo método de diluição em placas

Este método é mais trabalhoso e requer mais materiais quando comparado com o método de estrias. Nesse caso, a suspensão de células é diluída em série antes da semeadura em meio de cultura.

Procedimento de semeadura pelo método de diluição em placas

- a) Com o auxílio de uma pipeta e ponteiros estéreis, deposite uma gota de água destilada esterilizada no centro de três ou mais placas de Petri também estéreis.
- b) Transfira, com a alça de repicagem, uma alíquota da suspensão de células para a gota de água esterilizada em uma das placas. Homogeneize e, em seguida, transfira uma alíquota dessa suspensão para a outra placa, e assim sucessivamente, de forma a diluir cada vez mais a concentração de células.
- c) Após fundir o meio de cultura, resfrie-o até aproximadamente 48-50 °C (temperatura suportável pela palma da mão) e, em seguida, varta o meio sobre as gotas contidas no fundo das placas de Petri. Após essa etapa, realize movimentos rotatórios suaves, de modo a incorporar a suspensão de células ao meio de cultivo.

5.3 Semeadura pelo uso de alça de Drigalsky

Para proceder a este tipo de semeadura, também é necessário realizar a diluição em série da suspensão de células, o que aumenta a quantidade de operações necessárias e torna o método mais trabalhoso.

Procedimento para semeadura pelo uso de alça de Drigalsky

- a) Realize a diluição em série da suspensão de células utilizando como meio diluente solução salina (NaCl a 0,85%) esterilizada ou PBS (solução salina em tampão fosfato 0,1 M, pH = 7,0) também esterilizada.
- b) Prepare tubos de ensaio com 4,5 mL do diluente escolhido e em seguida autoclave por 20 min a 121 °C/1 atm. Transfira asepticamente 0,5 mL da suspensão de células para o primeiro tubo, homogeneize a suspensão obtida e em seguida transfira 0,5 mL dessa nova suspensão para outro tubo. Realize esses passos sucessivamente, de forma a diluir a suspensão de células na proporção de 1:10 até atingir diluições de 10^{-10} .
- c) Com uma pipeta esterilizada, transfira 0,1 mL de cada diluição para o meio de uma a três placas de Petri contendo meio de isolamento. Em seguida, com

a alça de Drigalsky previamente flambada após a imersão em álcool absoluto e resfriada, espalhe a suspensão de células sobre a superfície do meio. É importante realizar a semeadura a partir da suspensão mais diluída.

6 Inoculação de Fitobactérias

Há vários métodos de inoculação de fitobactérias desenvolvidos para estudos de patogenicidade, avaliação de resistência em plantas, avaliação de métodos de controle e estudos epidemiológicos. O tipo de método empregado varia de acordo com o alvo da planta e o tipo de doença em estudo.

6.1 Preparo do inóculo de fitobactérias

Existem dois cuidados básicos em relação ao preparo de inóculo de fitobactérias. Primeiramente, as células devem ser suspensas em solução salina (NaCl a 0,85%) ou em tampão fosfato PBS (solução salina em tampão fosfato 0,1 M, pH = 7,0), em vez de água destilada. Esse cuidado tem como objetivos evitar a plasmólise ou choque osmótico das células e garantir a maior viabilidade do inóculo. O segundo cuidado diz respeito à idade ótima da cultura bacteriana, ou seja, deve-se preparar a suspensão de células quando estas se encontrarem na fase logarítmica ou exponencial de crescimento. Normalmente, a maioria das fitobactérias encontra-se nessa faixa de crescimento após o cultivo por 18 a 24 h a 28 °C.

O inóculo pode ser produzido em meio sólido ou líquido. No segundo caso, a incubação deve ser realizada sob temperatura e agitação constante. Dependendo do estado físico do meio, diferentes técnicas são empregadas para realizar a coleta das células. Quando a multiplicação ocorre em meio sólido, realiza-se a raspagem do crescimento bacteriano, com o auxílio de uma alça de Drigalsky, adicionando solução salina (NaCl 0,85%) ou tampão fosfato PBS sobre a cultura. A coleta de células em meio líquido é mais trabalhosa e, nesse caso, o procedimento implica a utilização preferencial de centrífugas refrigeradas. Para separar as células dos componentes do meio de cultivo, centrifugura-se a amostra a 15.000 g/20 min e, em seguida, descarta-se o sobrenadante, sendo as células ressuspendidas em solução salina ou tampão fosfato PBS. Após três ciclos consecutivos dessas operações, pode-se considerar que as células estão livres dos componentes do meio de cultivo (Romeiro, 2001).

6.2 Quantificação e calibração da concentração de inóculo

A quantificação e calibração da concentração de inóculo são importantes para que se possam comparar os resultados de inoculações e garantir a repetibilidade dos experimentos.

Em uma suspensão de bactérias, logicamente nem todas as células estão viáveis; por esse motivo, quando se deseja quantificar o número de bactérias na suspensão, deve-se proceder a um estudo prévio que correlacione o número de células viáveis ou unidades formadoras de colônias (ufc) com um valor de absorbância, geralmente padronizado a 550 nm. Para tanto, faz-se uma diluição seriada da suspensão inicial em tubos de ensaio com 9,9 mL de solução salina (NaCl a 0,85%) esterilizada. Uma alíquota de 100 μ L da suspensão de bactérias é diluída em série e, a partir de cada tubo, semeiam-se 100 μ L da suspensão diluída em cada placa de Petri com meio 523 de Kado e Heskett (1970), utilizando pelo menos três placas por diluição. Paralelamente, realiza-se a leitura, em espectrofotômetro, da densidade ótica da suspensão de células bacterianas, a 550 nm, de cada diluição. Após incubação a 28 °C por 48 h, quantifica-se o número de células viáveis por diluição e, finalmente, correlacionam-se os valores médios com a densidade ótica. É importante mencionar que as correlações obtidas em determinadas condições devem ser padronizadas, como o meio de cultura utilizado, temperatura, idade da cultura e outras condições de cultivo.

Os resultados das leituras em espectrofotômetro são expressos em A (absorbância) ou DO (densidade ótica), indicando-se ao mesmo tempo o comprimento de onda utilizado nas leituras. Geralmente, $DO_{550} = 0,1$ corresponde a 10^8 ufc/mL, sendo a concentração de inóculo empregada mais freqüentemente (Romeiro, 2001).

Após a determinação da concentração de inóculo, realiza-se, por meio de diluições, a calibração para a concentração desejada.

6.3 Acondicionamento das plantas antes e depois da inoculação

Bactérias fitopatogênicas penetram no hospedeiro através de aberturas naturais (estômatos, hidatódios, lenticelas e glândulas) ou por ferimentos. A colonização dos tecidos da planta é favorecida pelo congestionamento de água no órgão infectado. Desse modo, a manutenção das plantas por 24 h antes e depois da inoculação em câmara de nevoeiro, com umidade relativa de 100%, é geralmente suficiente para garantir o sucesso da inoculação (Romeiro, 2001). Todavia, as condições ótimas de temperatura e período de câmara úmida pré e pós-inoculação devem ser determinadas por experimentação prévia.

6.4 Métodos de inoculação

Na escolha do método de inoculação devem-se considerar vários fatores, entre eles o órgão afetado e a forma predominante de penetração das fitobactérias, exequibilidade, custo e disponibilidade de equipamentos para realizar a inoculação, além de aspectos relativos às condições de infecções naturais. Deve-se considerar que, principalmente para doenças novas, o protocolo de inoculação, embora possa ser adaptado de outros patossistemas, geralmente requer adaptações. Portanto, a seguir serão apresentados os métodos mais comuns para inoculação artificial de bactérias fitopatogênicas.

6.4.1 Atomização

Este método é recomendado para bactérias que causam lesões na parte aérea das plantas e penetram diretamente por meio de estômatos, lenticelas, ferimentos, hidatódios e glândulas.

Material necessário

- a) Plantas suscetíveis à bacteriose.
- b) Atomizador acoplado a uma bomba de pressão.
- c) Bactérias crescidas por 24 h em meio sólido.
- d) Solução salina NaCl 0,85% esterilizada.
- e) Alça de Drigalsky e béquer.

Procedimento

- a) Coloque as plantas em câmara de nevoeiro por 24 h.
- b) Preparar a suspensão de inóculo ajustada para $DO_{550} = 0,1$.
- c) Com atomizador De Vilbiss acoplado a uma bomba de pressão, atomize a suspensão bacteriana em ambas as faces da folha, de modo a obter distribuição uniforme do inóculo sem atingir o ponto de escorrimento. Em casos de folhas com alta tensão superficial, recomenda-se adicionar Tween 80 a 0,1% à suspensão bacteriana.
- d) Recoloque as plantas inoculadas em câmara úmida por mais 24 h; em seguida, mantenha-as em casa de vegetação a 28 °C e acompanhe o surgimento dos sintomas característicos.

6.4.2 Injeção

Esta técnica de inoculação surte bons resultados para bactérias causadoras de manchas foliares, bem como para as causadoras de murcha. Neste caso, utilizam-se seringas hipodérmicas para injetar a suspensão bacteriana nos espaços intercelulares da folha ou seringas mais resistentes para inoculações no caule em haste.

Material necessário

- a) Plantas suscetíveis à bacteriose.
- b) Seringas hipodérmicas estéreis.
- c) Bactérias crescidas por 24 h em meio sólido.
- d) Solução salina NaCl 0,85% esterilizada.
- e) Alça de Drigalsky e béquer.

Procedimento

- a) Prepare a suspensão de inóculo ajustada para $DO_{550} = 1,0$.
- b) Injete a suspensão de inóculo no mesófilo foliar em diferentes pontos da folha. Para isso, apóie a folha entre os dedos polegar e indicador e, com a outra mão, realize a injeção do mesófilo. A injeção da suspensão de células bacterianas é mais fácil de ser realizada próximo à nervura principal do lado abaxial do limbo foliar. É importante mencionar que essa operação envolve muito treinamento e persistência.
- c) Coloque as plantas inoculadas em casa de vegetação a 28 °C e observe o aparecimento de sintomas.
- d) Colete as folhas com lesão nos pontos de inoculação e verifique se há exsudação de bactérias.

6.4.3 Imersão de raízes

Bactérias que causam murcha em plantas podem ser inoculadas nas raízes *in situ* ou em raízes lavadas. No primeiro caso, o inóculo é adicionado ao substrato no qual a planta está se desenvolvendo e, no segundo, a inoculação é realizada antes do replantio das mudas. Em ambos os métodos, seccione parte do sistema radicular para possibilitar a penetração das células bacterianas.

Material necessário

- a) Plantas suscetíveis à bacteriose.
- b) Tesoura de poda ou escalpelo.
- c) Bactérias crescidas por 24 h em meio sólido.
- d) Solução salina NaCl 0,85% esterilizada.
- e) Alça de Drigalsky e béquer.

Procedimento

- a) Prepare a suspensão de inóculo ajustada para $DO_{550} = 1,0$.
- b) Após a germinação das sementes em leito de areia ou vermiculita, lave o sistema radicular em água corrente e em seguida, com a tesoura de poda ou escalpelo esterilizado, seccione as extremidades de algumas raízes. Para inoculação de raízes *in situ*, o solo é removido ao redor das raízes, e posteriormente é realizado o seccionamento destas.
- c) Efetue a imersão das raízes por alguns minutos na suspensão de bactérias e replante as mudas inoculadas em solo esterilizado. Para inoculação *in situ*, a inoculação é feita irrigando o solo na região das raízes previamente seccionadas.
- d) Transfira os vasos para casa de vegetação a 28 °C e observe o aparecimento de sintomas.

6.4.4 Outros métodos de inoculação

A inoculação pode também ser feita por meio da utilização de abrasivos, pelo uso de tesoura, por picada ou por pressão, por seccionamento da parte aérea ou do pecíolo, com palito ou via hidatódios ou, ainda, pela infestação do solo (Romeiro 2001), conforme sumarizado a seguir.

Inoculação com abrasivos

O uso de abrasivos é mais indicado para bactérias que tipicamente penetram por ferimentos. Nesse caso, o abrasivo, geralmente carborundum, pode ser misturado ao inóculo ou pincelado na folha antes da inoculação. O grande problema deste tipo de inoculação diz respeito às injúrias mecânicas que poderão surgir. Essas injúrias podem gerar confusão com os sintomas causados pelo patógeno, especialmente se for do tipo necrótico.

Inoculação com cortes de tesoura

A utilização de tesoura para proceder à inoculação de folhas tem como objetivos realizar os ferimentos necessários à penetração da fitobactéria e, ao mesmo tempo, realizar o depósito de inóculo nesses sítios de infecção. Para isso, uma tesoura previamente esterilizada é imersa na suspensão de inóculo e, em seguida, são realizados pequenos cortes na periferia do limbo foliar. Esse tipo de inoculação apresenta como uma de suas principais vantagens a simplicidade e o requerimento de poucos materiais para execução.

Inoculação com alfinete entomológico

Para inoculações principalmente no caule, pode-se adotar a picada com alfinete entomológico previamente imerso em suspensão de inóculo. Quando se deseja inocular folhas, pode-se também acoplar o alfinete em um pincel, entre as cerdas, e realizar a inoculação pincelando o inóculo concomitantemente à realização de portas de entrada por ferimento.

Inoculação por pressão

A inoculação por pressão é um método muito drástico, no entanto muito útil, sobretudo, em testes de indução de reação de hipersensibilidade (HR) em plantas, cujas folhas são coriáceas e de difícil infiltração por outras metodologias.

Inoculação por seccionamento da parte aérea ou do pecíolo

A inoculação de fitobactérias em monocotiledôneas pode ser feita principalmente pelo seccionamento da parte aérea. Nesse caso, assim como é feito para inocular por seccionamento do pecíolo, uma gota de inóculo é depositada sobre a área seccionada e as plantas são mantidas em câmara úmida, para que a bactéria seja capaz de penetrar, multiplicar-se e causar os sintomas nas novas folhas ou em regiões distantes do ponto de inoculação.

Inoculação com palitos de madeira

Quando se deseja introduzir o patógeno bacteriano nos tecidos mais profundos, pode se recorrer à inoculação com palito. Nesse caso, palitos comuns de madeira são previamente esterilizados, umedecidos em suspensão de inóculo e finalmente introduzidos no caule da planta ou no ponto de inserção da folha com o caule. Esse método é considerado menos drástico do que a inoculação por injeção.

Inoculação por hidatódios

A sintomatologia de determinadas bacterioses evidencia a penetração por hidatódios. Nessa situação, observa-se principalmente lesão nas bordas foliares assumindo um formato cuneiforme. Com o objetivo de realizar uma inoculação artificial simulando as condições de infecção natural, pode-se passar suavemente um cotonete, previamente imerso na suspensão de inóculo, nas bordas foliares. É importante que as plantas sejam mantidas previamente em câmara úmida por no mínimo 24 h e que depois da inoculação estas sejam levadas para um local ventilado. Além disso, a temperatura de incubação deve estar entre 25 e 30 °C e nunca superior a 30 °C.

Infestação do solo ou substrato

Assim como é realizado nas inoculações de fungos habitantes de solo, a inoculação de fitobactérias pode ser feita, em alguns casos, por meio da infestação no solo. Nesse método, deve-se, no entanto, expressar a concentração de inóculo em ufc/g de solo.

6.5 Reação de hipersensibilidade (HR) para comprovação de patogenicidade

Atualmente, sabe-se que, de forma mais ou menos generalizada, associações incompatíveis entre bactéria (fitopatogênica) e planta (não-hospedeira) resultam em reações de hipersensibilidade (HR) (Goodman e Novacky, 1994). Este tipo de reação diferencia-se da resposta de suscetibilidade (entre bactéria fitopatogênica e planta hospedeira) por dois motivos principais. A resposta de HR é rápida, ocorrendo em 24 h ou menos e de forma localizada, em comparação com os sintomas apresentados nas interações compatíveis caracterizados por anasarca inicial. Este tipo de resposta, aliado ao fato de bactérias saprófitas não serem capazes de incitar qualquer sintoma nas plantas, sejam elas hospedeiras ou não, permite a comprovação rápida da patogenicidade (Tabela 6.4).

Tabela 6.4 - Reações esperadas em função do tipo de interações entre bactéria e planta

Bactéria	Planta	Associação	Sintomas Típicos	HR
Fitopatogênica	Hospedeira	Compatível	+	-
Fitopatogênica	Não-hospedeira	Incompatível	-	+
Saprófita	Qualquer	-	-	-

Fonte: Romeiro (2001).

Material necessário

- a) Plantas de fumo, café, maracujá, tomate, pimentão e feijão.
- b) Seringas hipodérmicas estéreis.
- c) Isolados bacterianos multiplicados por 24 h em meio sólido inclinado.
- d) Solução salina esterilizada de NaCl 0,85%.
- e) Béquer de 100 mL de capacidade.

Procedimento

- a) Prepare a suspensão de inóculo ajustada para $DO_{550} = 0,1$ em cada béquer.
- b) Injete a suspensão de inóculo no mesófilo foliar em diferentes pontos da folha. Para isso, apóie a folha entre os dedos polegar e indicador e, com a outra mão, realize a injeção do mesófilo. A injeção da suspensão de células bacterianas é mais fácil de ser realizada próximo à nervura principal do lado abaxial do limbo foliar.
- c) Mantenha as plantas inoculadas em casa de vegetação a 25-28 °C e observe o surgimento de sintomas nas próximas 24 h. Nunca incube as plantas inoculadas em temperaturas superiores a 30 °C, pois há riscos de reações do tipo falso-positivo.
- d) Necroses, amarelecimento ou dessecamento que surgirem após 24 h não devem ser interpretados como sintoma típico de HR.

Como existem variações nas respostas de HR, é necessário atentar para algumas recomendações para que esse tipo de reação seja utilizado com maior segurança, como alertado por Romeiro (2001):

- a) Em virtude do fato de nem todas as bactérias serem capazes de induzir HR em plantas não hospedeiras, recomenda-se, no caso de resposta negativa, inocular o hospedeiro original.
- b) Como nem todas as plantas respondem de maneira hipersensível, realize o teste de HR em várias plantas-teste, incluindo, se possível, pelo menos fumo, café, maracujá, tomate, pimentão e feijão.
- c) Quando a planta-teste for suscetível ao isolado testado, em função da concentração elevada de inóculo e do método drástico de inoculação (injeção), os sintomas de suscetibilidade costumam surgir rapidamente e normalmente assemelham-se aos sintomas de HR.
- d) Mesmo para resposta positiva de HR, recomenda-se inocular o hospedeiro original para comprovação da patogenicidade e cumprimento dos postulados de Koch.

7 Exercícios

- 7.1 Detecção de *Xanthomonas axonopodis* em folhas infectadas de eucalipto pelo método de exsudação em gota.
- 7.2 Detecção de *Ralstonia solanacearum* em caule infectado de eucalipto pelo método de exsudação em copo com água e exsudação em gota.
- 7.3 Isolamento de bactérias de folhas de eucalipto pelos métodos direto e indireto.
- 7.4 Inoculação de folhas sadias de eucalipto com *Xanthomonas axonopodis* pelo método de injeção e atomização.

8 Referências

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4. ed. New York, Academic Press, 1997. 635 p.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.
- DICKEY, R.S. & KELMAN, A. *Erwinia carotovora* or soft rot group. In: SCHAAD, N.M. **Guide for identification of plant pathogenic bacteria**. Minnesota: APS Press, 1988. 164 p.
- GOODMAN, R.N. & NOVACKY, A.J. **The hypersensitive reaction in plants to pathogens**. Saint Paul: APS Press, 1994. 244 p.
- KADO, E.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology** 60: 969-76, 1970.
- KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** 44: 301-7, 1954.
- MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. & ASSIS, S.M.P. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. 171 p.
- ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, MG. Editora UFV, 1995. 367 p.
- ROMEIRO, R.S. **Identificação de bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária: 1976. 91 p.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. 279 p.
- SCHAAD, N.M. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. St. Paul, Minnesota: APS Press, 2001. 373 p.