

ANEXO

MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE AGENTES PATOGÊNICOS A PLANTAS EM SUBSTRATOS

Art. 1º Este anexo estabelece os métodos analíticos oficiais para a determinação dos agentes patogênicos a plantas em substrato.

Art. 2º Para a determinação do agente patogênico *Fusarium spp*, os métodos analíticos empregados serão o de isca com maçã e o de isca com cenoura.

§ 1º O método de isca com maçã observa o seguinte procedimento:

I - com auxílio de um furador de rolhas, devem-se retirar discos na maçã e inocular substrato nos ferimentos feitos com o furador; a região inoculada é coberta com o disco da maçã e recoberta com fita adesiva;

II - os frutos são incubados, colocando-os dentro de um saco plástico contendo uma mecha de algodão embebida em água destilada (para formar uma câmara úmida) durante 7 a 10 dias, sob luz ambiente;

III - os tecidos lesionados são seccionados em pequenos tamanhos (2 a 5 cm) e transferidos para placas de Petri contendo meios de cultura: Batata-Dextrose-Agar (BDA), suco de tomate ou Cornmeal agar;

IV - as placas são incubadas sob luz fluorescente contínua durante 8 a 12 dias de incubação ou até o surgimento das colônias fúngicas.

§ 2º O método de isca com cenoura observa o seguinte procedimento:

I - cortar as cenouras em rodelas e distribuí-las em uma cuba contendo substrato contaminado (levemente umedecido com água);

II - inserir a cuba em um saco plástico, durante 10-12 dias; seccionar os tecidos lesionados em pequenos tamanhos (2-5 cm);

III - transferi-los para placas de Petri contendo meios de cultura: Batata-Dextrose-Agar (BDA), suco de tomate ou Cornmeal agar;

IV - as placas são incubadas sob luz fluorescente contínua durante 8-12 dias de incubação ou até o surgimento das colônias fúngicas.

Art. 3º Para determinação do agente patogênico *Rhizoctonia solani*, o método analítico empregado será com a utilização de iscas plântulas recém-germinadas de rabanete (*Raphanus sativus L.*) ou segmentos de hastes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*), observandose o seguinte procedimento:

I - os substratos a serem analisados serão colocados em placas de Petri (9 cm de diâmetro), aproximadamente 40 gramas do substrato para cada placa e, em seguida, as placas serão umedecidas com 11 ml de água;

II - serão enterrados levemente no substrato, equidistantes, dez segmentos (um cm de comprimento, cortados de hastes de plântulas de feijoeiro) ou dez plântulas recém-germinadas de rabanete;

III - para a germinação, sementes de rabanete serão colocadas em placas de Petri contendo duas folhas de papel de filtro umedecido, e incubadas por um dia sob temperatura ambiente;

IV - após a incubação das placas contendo substrato e iscas por 72 horas, as plântulas serão recuperadas, lavadas em água corrente e, a seguir, em água esterilizada, secas em papel de filtro autoclavado;

V - em seguida, as iscas serão dispostas em placas de Petri contendo ágar-água;

VI - após 48 horas de incubação em temperatura ambiente, os segmentos das plântulas serão observados em microscópio estereoscópico, contando-se os que contêm hifas características de *R. solani*.

Art. 4º Para determinação do agente patogênico *Pythium aphanidermatum*, o método analítico será o de isca de maçã verde, observando-se o seguinte procedimento:

I - colocar o substrato em um becker de 500 ml até atingir a marca correspondente a 100 ml;

II - umedecer com água destilada e esterilizada; efetuar perfurações na região do pedúnculo da maçã, com auxílio de estilete devidamente flambado;

III - colocar a maçã no becker com a parte perfurada em contato com substrato, fazendo uma leve pressão;

IV - cobrir a parte superior do becker com papel alumínio e incubar por dois ou mais dias quando então aparecerá o crescimento do patógeno ou necrose do tecido em torno das perfurações;

V - transferir, para o meio de BDA, micélio ou fragmento de tecido retirado da margem da lesão marrom formada na maçã, tendo-se o cuidado de desinfetá-lo previamente;

VI - após a formação das colônias, transferir os bloquinhos do meio de cultura com o fungo para outra placa com o meio citado, ou para tubos de ensaio, para estudos posteriores.

Art. 5º Para a determinação do agente patogênico *Phytophthora* spp, os métodos analíticos empregados serão os de iscas de folhas e frutas e os de diluição em placas.

§ 1º O método de iscas de folha e frutos observa o seguinte procedimento:

I - colocação de pedaços de folhas de citros na superfície das amostras homogeneizadas em água destilada (uma parte de solo ou substrato para 3 partes de água destilada);

II - incubação das amostras a 24-29°C sob luz contínua por 72 horas, e observação dos pedaços de folha ao microscópio, visando verificar a formação de esporângios de *Phytophthora* nas margens das folhas cortadas;

III - o isolamento do patógeno das amostras contaminadas é feito com a inoculação das folhas infectadas obtidas pelo método de iscas em frutos cítricos, preferencialmente frutos de limões verdadeiros;

IV - após o desenvolvimento de lesões típicas de *Phytophthora* (podridão parda) nos frutos inoculados, as sementes são retiradas e plaqueadas em meio seletivo para *Phytophthora*.

§ 2º Alternativamente, o método de iscas de folhas e frutos poderá seguir o seguinte procedimento, em que se deve:

I - misturar bem as amostras e fracioná-las em subamostras de 5g cada, que são colocadas em frascos pequenos;

II - adicionar água destilada em cada subamostra e homogeneizá-las;

III - colocar discos de folhas cítricas de 6mm de diâmetro sobre a superfície líquida de cada amostra homogeneizada e incubá-las a 27-29°C, no escuro, por 48 horas;

IV - plaquear os discos de folha em meio seletivo para *Phytophthora* (PARPH) e incubar as placas à mesma temperatura, no escuro, por 72 horas; identificar as culturas desenvolvidas no meio seletivo;

V - frutos cítricos, preferencialmente frutos de limoeiros verdadeiros, também podem ser utilizados como iscas;

VI - lesões típicas de podridão parda desenvolvem-se nos frutos parcialmente imersos nas amostras contaminadas homogeneizadas em água destilada.

§ 3º O método de diluição em placa observa o seguinte procedimento:

I - são métodos quantitativos, que utilizam meios de cultura que foram desenvolvidos para o isolamento seletivo de espécies de *Phytophthora*;

II - usar o meio P10VPH modificado (Cornmeal agar com 10mg/L de pimaricina, 200mg/L de vancomicina-HCl, 100mg/L de PCNB e 50mg/L de hymexazol), e o meio PARPH (Cornmeal Agar com 10mg/L de pimaricina, 250mg/L de ampicilina, 10mg/L de rifampicina, 100g/L de PCNB e 50 mg/L de hymexazol);

III - os métodos de diluição em placas permitem determinar o número de propágulos dos patógenos por cm³ de solo ou substrato;

IV - o método de diluição em placa consiste em misturar bem as amostras de solo e colocá-las em frascos de plástico perfurado no fundo;

V - adicionar água destilada até a completa saturação do solo e depois permitir a drenagem da água da amostra; incubar as amostras a 22-23°C, por 24-48 horas; remover 10cm³ do solo e misturá-los com 90ml de ágar-água(0,25%);

VI - pipetar e distribuir 1,0ml da mistura solo + ágar-água em cada placa contendo meio seletivo PARPH, num total de 5-10 placas; incubar a 27-28°C, no escuro, por 72 horas; contar as colônias de *Phytophthora* desenvolvidas nas placas;

VII - assumindo que cada colônia desenvolveu-se a partir de um único propágulo do patógeno, o número de colônias por placa expressa o número de propágulos por cm³ de solo.

Art. 6º Para a determinação do agente patogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, os métodos analíticos empregados serão o de peneiramento do substrato e o de emprego de isca biológica.

§ 1º O método de peneiramento do substrato observa o seguinte procedimento:

I - empregar uma subamostra de 100 g de substrato;

II - a subamostra é embebida em água destilada durante 30 minutos e peneirada em peneira de 0,5 mm;

III - os resíduos retidos na peneira são transferidos para papel de filtro e secos ao ar, sobre a bancada do laboratório durante 24 horas; após esse período de tempo, os escleródios encontrados são contados.

§ 2º O método de isca biológica observa o seguinte procedimento:

I - realizar o teste somente se não forem encontrados escleródios neste teste; a presença de apenas um escleródio inviabiliza o lote;

II - distribuir o substrato em 10 placas de Petri esterilizadas e umedecer levemente com água destilada;

III - desinfetar superficialmente 10 hastes de plantas de feijoeiro de aproximadamente 1,5 cm de comprimento, imergindo-as em álcool 70% durante 1 minuto, e durante 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio - três partes de água destilada: uma parte de água sanitária (2% cloro ativo); fazer 3 lavagens seguidas em água destilada;

IV - após 3 dias, transferir as hastes de feijoeiro para o meio de cultura semisseletivo NEON;

V - após 5 dias, realiza-se a identificação da presença ou ausência de *Sclerotinia sclerotiorum*, baseando-se na mudança de coloração do meio de azul para amarelo, com o crescimento micelial do fungo.

Art. 7º As referências bibliográficas utilizadas para o estabelecimento dos métodos analíticos oficiais de que trata esta Instrução Normativa para cada agente patogênico são as seguintes:

I - *Fusarium* spp:

a) URBEN, A.F. Molecular and Genetic Structure of Populations of *Fusarium oxysporum* (Schlechtend ex Fries) f. sp. *Lycopersici* (Sacc) Snyder and Hansen and f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis and Shoemaker - School of Biological Sciences, University of Birmingham, 194p., 1994 (Tese de Doutorado);

b) VENTURA, J.A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segregados.

Parte II - Chaves para identificação. In: Revisão de Patologia de Plantas, volume 8, 409p., 2000;

c) TUIE, J. Plant Pathological Methods - Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Company, 239p., 1969;

II - *Rhizoctonia solani*:

a) SINGLETON, L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH, C.M. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. APS Press:Wisconsin, 266p., 1992;

b) PATRÍCIO, F. R. A., KIMATI, H., TESSARIOLLI NETO, J., PETENATTI, A. Solarização do solo em casa-de-vegetação e campo para o controle de *Rhizoctonia solani* AG-4. *Summa Phytopathologica.* , v.33, p.245 - 251, 2007;

III - *Pythium aphanidermatum*: CAMPBELL, W. A. A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil. *Plant. Dis. Repórter* 33:134-135.1949;

IV - *Phytophthora* spp:

a) FEICHTENBERGER, E. Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. (Eds.). Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Campinas: Livraria Editora Rural. 2001. P. 283 - 342;

b) GRIMM, G.R.; ALEXANDER, A.F. Citrus leaf piece as trap for *Phytophthora parasitica* from soil slurries. *Phytopathology*, St. Paul, v. 63, p. 540 - 541, 1973;

c) TSAO, P.H. Factors affecting isolation and quantification of *Phytophthora* from soil. In: ERWIN D.C.; BARTNICK-GARCIA, S.; TSAO, P.H. (Eds.). *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. St. Paul: The American phytopathological Society. 1983. p. 219 - 236;

V - *Sclerotinia sclerotiorum*:

a) IMOLEHIN, E.D.; GROGAN, R.G. Factors affecting survival of *Sclerotia*, and effects of inoculum density, relative position, and distance of sclerotia from the host on infection of lettuce by *Sclerotinia minor*. *Phytopathology*, v. 70, n.12, p.1162-1167, 1980;

b) STEADMAN, J.R.; MARCINKOWSKA, J. & RUTLEDGE, S. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.16, p.6870, 1994.