

Isolamento e identificação de colônias do fungo *Alternaria dauci* obtidas de lesões de Requeima da cultura da cenoura

Júlio César de Oliveira SILVA¹; Luciano Donizete GONÇALVES²; Wellington Cristina A. N. BENEVENUTO³; Maria Cristina da Silva BARBOSA⁴; Anne Caroline BARBOSA⁴; Flávio Felipe LOPES⁵

¹ Graduando em Engenharia Agrônômica – (IFMG) – Campus Bambuí e bolsista do programa de bolsas institucionais do IFMG - Campus Bambuí (PIBIC); ² Professor Orientador, Dr. IFMG – Campus Bambuí; ³ Professor Co-orientador, Dr. IFMG – Campus Bambuí; ⁴ Bióloga, Técnica de Laboratório IFMG – Campus Bambuí. ⁵ Aluno do Curso Técnico de Agricultura/Zootecnia - Instituto Federal, Ciência e Tecnologia Minas Gerais (IFMG) – Campus Bambuí e Bolsista da FAPEMIG (PIBIC Jr).

RESUMO

A cadeia produtiva da cenoura proporciona renda a diversas famílias no Brasil e o estado de Minas Gerais ocupa posição de destaque na produção e distribuição dessa raiz, sendo a cidade de São Gotardo referência nacional de produção. Apesar da alta produtividade as doenças constituem um empecilho à produção, e dentre estas a requeima é a de maior destaque, causando grandes danos à cultura e prejuízos para o produtor. A doença é provocada por um complexo etiológico envolvendo dois fungos (*Alternaria dauci* e *Cercospora carotae*) e uma bactéria (*Xanthomonas campestris* pv. *carotae*), sendo que o fungo *A. dauci* é o que aparece com maior frequência como causador da doença. Diante disso é de muita importância o estudo e pesquisa de materiais resistentes ou formas de controle eficientes. Para estudos relacionados a métodos de controle é necessário se ter estruturas desse fungo mantidas em condições controladas. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar colônias do fungo *A. dauci* providas de lesões de requeima da cultura da cenoura. Foram coletadas folhas de cenoura com lesões da doença no setor de olericultura do IFMG - Campus Bambuí, que foram levadas ao laboratório de fitopatologia da instituição onde através de isolamento indireto, foram obtidas as colônias, que posteriormente foram identificadas através de sua descrição e realização do postulado de Koch. A partir dessas colônias, pode ser induzida a esporulação desses fungos e sua conservação em condições de laboratório, para que possa servir de material auxiliar a pesquisas realizadas no Campus ou por instituições parceiras.

Palavras chave: Esporulação, Queima das Folhas, *Daucus carota* L.

INTRODUÇÃO

Em nosso país, a cultura da cenoura tem grande importância, já que seu cultivo emprega alta tecnologia e assim permite a geração de grande número de empregos tanto diretos, quanto indiretos em suas diversas fases de produção. Segundo dados do IBGE (2009) a cadeia produtiva da cenoura gerou no ano de 2008, 314,4 mil empregos nas diversas fases da produção, sendo assim fonte de renda de várias famílias.

Apesar da alta produtividade alguns fatores limitam melhores resultados na produção da cultura. Dentre esses fatores destacam-se as doenças, que representam os maiores causadores de danos à cultura. A requeima ou queima das folhas, dentre todas as doenças, destaca-se como a de maior importância comercial, já que hoje se encontra inserida em quase todos os centros de cultivo de cenoura no país, e os prejuízos causados estão ligados diretamente à produtividade e, conseqüentemente, ao lucro do produtor. A doença é causada por um complexo etiológico composto por dois fungos, *Alternaria dauci* e *Cercospora carotae* e a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*. Os agentes etiológicos da doença podem ser encontrados juntos ou separadamente nas lesões da doença.

Pulz (2007), relata que a requeima ou queima das folhas por *A. Dauci* é caracterizada por lesões marrom-esverdeadas de aspecto encharcado principalmente nas folhas, e podem levar a planta a uma perda de área foliar que varia de 40 a 60%, reduzindo assim consideravelmente a fotossíntese e a produção de fotoassimilados. Os sintomas característicos da doença aparecem de 8 a 10 dias após a infecção. Os prejuízos podem ser ainda maiores, quando se trabalha com a colheita mecanizada, por se prejudicar o arranque das plantas

Segundo Shibata (2008a), o fungo *A. dauci* é o que aparece em maior frequência em lesões da doença nas plantas de cenoura. Em experimento realizado pela autora, em todas as lavouras analisadas de diferentes regiões produtoras do Brasil e em diferentes épocas de plantio, foram constatadas a presença do fungo nas lesões típicas da doença.

Visto a importância econômica dos danos causados pela requeima, torna-se de vital importância o desenvolvimento de alternativas viáveis ao combate da doença. Porém o desenvolvimento de produtos para o controle ou de materiais geneticamente resistentes a doença encontra muitas vezes dificuldades para sua realização, devido ao fato que o fungo *A. dauci* é de difícil esporulação em condições de laboratório. Portanto o objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e induzir a esporulação deste fungo em condições de laboratório para se criar fonte de inóculo a ser utilizado em pesquisas de desenvolvimento de produtos para controle da requeima da cenoura no IFMG – Campus Bambuí.

IV Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG - Campus Bambuí.
IV Jornada Científica
06 a 09 de Dezembro de 2011

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos trabalhos foram utilizados os laboratórios de Microbiologia e Fitopatologia do Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG), Campus Bambuí.

Para a obtenção do material infectado com requeima para o isolamento, foi realizado um levantamento de plantios da cultura no setor de olericultura do campus e nos produtores da cidade de Bambuí. Tendo em mãos as informações das áreas plantadas, o passo seguinte foi à identificação dentro dessas áreas, quais delas possuíam focos da doença e em quais estágios da mesma elas se encontravam.

De posse dessas informações, o material escolhido para ser manuseado foi colhido no campo e encaminhado acondicionado em sacos de papel ao laboratório de fitopatologia para se proceder o isolamento.

No laboratório, a metodologia utilizada para isolamento dos inóculos do fungo, foi o isolamento indireto. DOS SANTOS (2010) utilizou esta metodologia para isolamento de outro agente etiológico, causador de doença em feijão de corda e outras culturas, porém, diferentemente do autor, o meio utilizado para plaqueamento neste caso foi o meio BDA (Batata Dextrose Ágar) que segundo PULZ (2007) têm sido utilizado constantemente em trabalhos de desenvolvimento e esporulação do fungo.

Após a fase final da técnica de isolamento indireto, que se caracteriza pela incubação das placas de petri contendo meio BDA e partes da planta infectadas com requeima pelo período de sete dias, todas as colônias que cresceram na placa, mais precisamente no entorno dos tecidos lesionados foram repicados a novas placas contendo meio BDA e mantidas em estufa, no escuro a 25° C, até que se notasse seu desenvolvimento e se tivesse material necessário para a identificação.

Para se promover a identificação do fungo, primeiramente foram feitas lâminas microscópicas pelo método de raspagem e colagem com as estruturas fúngicas mantidas nas placas de petri, e posteriormente foi realizada observação das características da colônia e estruturas do fungo para identificação da espécie.

Finalmente, para validação dessa prévia identificação foi realizado o postulado de Koch, que se caracteriza como uma série de etapas a serem seguidas para confirmação da patogenicidade do fungo ou microorganismo (KOCH, 1981).

Para se promover a esporulação do fungo, utilizou-se metodologia similar a utilizada por SHIBATA (2008a), que consistiu em cortar fragmentos da borda da colônia mantida em placa de petri e transferi-la para erlenmeyers (3), contendo BD (Batata dextrose) e mantidas no escuro sob

IV Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG - Campus Bambuí.
IV Jornada Científica
06 a 09 de Dezembro de 2011

agitação constante (110 rpm) em homogeneizador tipo Shaker por sete dias. Em seguida o micélio produzido foi homogeneizado e triturado em agitador magnético e da suspensão de fragmentos de micélio em meio de cultura, alíquotas de 1 ml que foram retiradas e vertidas em placas de petri contendo 10 ml do meio V8- ágar. As placas foram incubadas à 25° C, no escuro por cerca de 8 a 10 dias, e a partir do material destas placas foi preparada a solução de esporos com a mistura de água destilada, para contagem da concentração esporos em Hemacitômetro ou Câmara de Neubauer.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A técnica de isolamento indireto, conforme descrita no item anterior se mostrou eficiente para isolamento e crescimento do fungo *A. dauci*. Seis dias após a realização do procedimento e sob incubação, já foram observadas colônias do fungo crescendo nas placas ao lado dos tecidos infectados. Resultados semelhantes foram alcançados por SHIBATA *et al.* (2008b), que conseguiu recuperar inóculos do fungo utilizando metodologia semelhante.

A fase seguinte de realização do experimento, que se dá pela identificação do fungo, procedeu-se de forma satisfatória, sendo observadas estruturas do fungo que se assemelhavam com as características descritas em literatura, porém, foi de vital importância a realização do postulado de Koch para a comprovação da identificação e patogenicidade do fungo. Os sintomas característicos da doença puderam ser observadas após a inoculação de estruturas fúngicas em plantas sadias, sendo estes sintomas observados em média de 8 a 13 dias após esta inoculação, confirmando o resultado alcançado em inoculação no campo promovida no trabalho de SHIBATA *et al.* (2008b).

Quanto à esporulação do fungo, esta pode ser observada após o período de incubação proposto na metodologia utilizada. Após a contagem em Hemacitômetro ou Câmara de Neubauer, observou-se número médio de 13×10^5 conídios/ml. A partir deste valor, para obtenção de suspensão de inóculos para ser aplicada a campo, deve-se ajustar através de diluição em água destilada e esterelizada, para uma concentração de 5×10^3 conídios/ml.

CONCLUSÃO

Foi perfeitamente possível o isolamento e identificação de colônias do fungo *Alternaria dauci*, a partir de lesões de requeima das folhas de cenoura coletadas no IFMG – Campus Bambuí, sendo que também foi possível a manutenção das colônias do fungo e sua esporulação em laboratório, para que estas possam servir de material a ser utilizado em pesquisas de desenvolvimento de materiais resistentes e produtos para combate da doença.

IV Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG - Campus Bambuí.

IV Jornada Científica

06 a 09 de Dezembro de 2011

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a FAPEMIG e ao IFMG - Campus Bambuí, pela concessão de bolsa para execução do projeto.

LITERATURA CITADA

DOS SANTOS, M.V.O. (2010). ***Phytophthora* spp. em cultivos diversos no sul da bahia e identificação de agentes de biocontrole a estes patógenos.** 2010. 92p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal. Universidade Estadual de Santa Cruz. Bahia, 2010.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal, 2009.** Estimativas representantes do agronegócio de cenoura 2009. Disponível em: http://www.cnpq.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/hortalicas_em_numeros.htm. Acesso em: 29/09/2010.

PULZ, P. **Crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *Alternaria solani* em meios de cultura.** Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz Queiróz, 2007. Piracicaba, SP.

SHIBATA, Eliane Terumi. **Reação de cultivares de cenoura à queima das folhas em campo e à *Alternaria dauci* em casa-de-vegetação** / Eliane Terumi Shibata, Ailton Reis e Jairo Vidal Vieira -- Brasília : Embrapa Hortaliças, 2008a. 14 p.

SHIBATA, Eliane Terumi. **Reação de cultivares de cenoura à queima das folhas, prevalência de patógenos, diversidade genética e sensibilidade de *Alternaria dauci* a fungicidas.** Brasília, Universidade de Brasília, 2008b, 98 p. Dissertação de Mestrado.