



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

BACHARELADO EM AGRONOMIA

EVANDRO LUIS CALVANO

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

RECIFE-PE

2021

EVANDRO LUIS CALVANO

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório apresentado a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Sede, sob a orientação do professor Dr. Jonas Alberto Rios, em atendimento às exigências para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

RECIFE-PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C167r Luis Calvano, Evandro
Relatório de estágio supervisionado obrigatório / Evandro Luis Calvano. - 2021.
24 f. : il.

Orientador: Jonas Alberto Rios.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Agronomia, Recife, 2021.

1. Bipolaris oryzae. 2. Nanotecnologia. 3. Mancha parda. I. Rios, Jonas Alberto, orient. II. Título

CDD 630

Dedico este trabalho aos meus pais, Cirlene Mendonça de Almeida e Luis Antonio Calvano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal Rural de Pernambuco; desde os professores, técnicos e funcionários que fazem a instituição funcionar.

Aos amigos e futuros colegas de profissão, que colaboraram desde o início até o final da minha formação acadêmica, compartilhando momentos bons e difíceis.

A minha honrada mãe Cirlene Mendonça, que me educou para que eu me tornasse um homem de bem e aprendesse a aceitar com humildade os desafios que a vida impõe.

“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará.”

(Salmos 23:1)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
APRESENTAÇÃO	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	12
2.1 Cultivo experimental de arroz e feijão-caupí	12
2.2 Isolamento e Preservação de Fitopatógenos	17
2.3 Aplicação de nanopartículas	19
2.4 Inoculação de <i>Bipolaris oryzae</i>	21
2.5 Avaliação da Mancha-parda do arroz	22
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Cultivo experimental de arroz em casa de vegetação

FIGURA 2 – Cultivo experimental de feijão-caupi em casa de vegetação

FIGURA 3 – *Spodoptera frugiperda* em plantas de arroz

FIGURA 4 – Plantas de feijão-caupi atacadas por ácaros

FIGURA 5 – Pragas de ocorrência em plantas de feijão-caupi. A – Pulgão-preto (*Aphis rumicis*); B – Percevejo ; C – Mosca-minadora (*Liriomyza sativae*)

FIGURA 6 – Oídio (*Oidium* sp.) em plantas de feijão-caupi

FIGURA 7 – Obtenção de cultura pura de *Bipolaris oryzae*

FIGURA 8 – Preparo de experimento *in vitro*

FIGURA 9 – Avaliação de crescimento de *Bipolaris oryzae in vitro* sob concentrações distintas de nanopartículas

FIGURA 10 – Ajuste da solução de nanopartículas de prata

FIGURA 11 – Avaliação da mancha parda em plantas de arroz. A – Quantidade de lesões; B – Tamanho das lesões

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Cultivares de arroz e feijão-caupí.

APRESENTAÇÃO

Em conformidade aos dispostos na Lei Nº 11.788, de 25 de setembro de 2008, que institui e regulamenta o estágio supervisionado como parte do projeto pedagógico de instituições de educação básica, profissional e superior, foram desenvolvidas no Laboratório de Interação Planta-Patógeno do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, campus sede, entre 5 de abril e 24 de maio de 2021, as atividades educacionais complementares inerentes ao processo para obtenção do título de Bacharel em Agronomia pela referida instituição, sob a orientação do Doutor Jonas Alberto Rios.

As atividades compreenderam o suporte no cultivo experimental de arroz e feijão-caupi apresentando diferentes padrões de resistência a *Bipolaris oryzae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, respectivamente, em estudos de herança de resistência genética e uso potencial de nanopartículas no controle de fitopatógenos.

O laboratório de Interação Planta-Patógeno integra o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, situado à sede da instituição no Edifício Otávio Gomes, sob a responsabilidade do Doutor Jonas Alberto Rios, contribuindo com pesquisas concentradas nas áreas de Resistência Genética de Doenças de Plantas e Fisiologia do Parasitismo.

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais culturas cerealíferas do mundo, caracterizando a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas, sendo cultivado em todos os continentes, desempenhando papel estratégico sob os aspectos econômico e social. O Brasil está consolidado entre os maiores produtores mundial do grão, com produção registrada de 11.183,4 mil toneladas referentes ao ano safra 2019/2020, conforme dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab).

A incidência de doenças caracteriza como um dos principais fatores limitantes da cultura, sendo responsável por perdas consideráveis na produção e na qualidade dos grãos. A mancha parda, causada pelo fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker, é uma das doenças mais importantes da cultura do arroz (OU, 1985). *B. oryzae* é um patógeno com relação parasitária necrotrófica, a qual é caracterizada pela morte da célula do hospedeiro para então extração dos nutrientes necessários ao micro-organismo (Sunder et al, 2014). Os danos associados à doença são decorrentes da infecção dos grãos, da redução na germinação das sementes, da morte de plântulas originadas de sementes infectadas e da destruição da área foliar (BEDENDO, 1997).

Segundo Sunder et al. (2014), os sintomas aparecem como pequenos pontos no coleóptilo, lâmina foliar, bainha foliar e gluma, sendo a maioria proeminente nas lâminas das folhas e glumas. Nas folhas, as manchas típicas são de coloração marrom com centro cinza ou esbranquiçado, de formato cilíndrico ou oval, geralmente com halo amarelo, enquanto as manchas jovens são pequenas, de formato circular, podendo aparecer como pontos de coloração marrom escuro ou marrom arroxeadado. A medida que a doença progride, os pontos coalescem e resultam por fim, naseca total da folha. De acordo com Bedendo (1997), as manchas nos grãos são de cor marrom escuro ou marrom avermelhado, que em ataques severos podem cobrir parcial ou totalmente a superfície dos grãos, resultando no chochamento, redução de peso, e gessamento que provoca a quebra durante o beneficiamento, diminuindo o rendimento em termos de grão inteiros.

A ocorrência da mancha parda está relacionada as condições de cultivo desfavoráveis ao desenvolvimento das plantas e a suscetibilidade de cultivares. Segundo Bedendo (1997), o controle é baseado no uso de sementes sadias ou

tratadas de cultivares com certo grau de resistência, cultivo sob condições adequadas de adubação e irrigação, prática de rotação de culturas, eliminação de gramíneas das proximidades da área de produção, e pulverização de produtos químicos.

Pesquisas envolvendo a nanotecnologia vêm sendo desenvolvidas em diversas áreas, como na Física, Química, Biologia, Eletrônica, Medicina e mais recentemente na Agricultura (FURLANETO, 2011). Entre as inúmeras possibilidades de aplicações da nanotecnologia no meio rural está a incorporação de nanosensores e nanocatalisadores capazes de monitorar e acelerar o diagnóstico de doenças nas plantas, o tratamento molecular de doenças, o melhoramento da habilidade das plantas para absorver os nutrientes, a eficiência na aplicação dos pesticidas, herbicidas e fertilizantes (GRANZIERA et al., 2012). As nanopartículas de metal, tais como Ag e Cu possui elevado potencial antimicrobiano e seu efeito tem sido atribuído ao pequeno tamanho e alta superfície em relação ao volume, que lhes permite interagir de perto com as membranas microbianas, e não apenas devido à liberação de íons metálicos em soluções (RAMYADEVI et al., 2012).

Diante do exposto, as atividades do estágio supervisionado obrigatório foram desenvolvidas no âmbito de estudo, visando o uso potencial de nanopartículas de cobre e prata no controle de *Bipolaris oryzae* em plantas de arroz.

2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades do estágio supervisionado obrigatório foram desenvolvidas presencialmente cumprindo de maneira rigorosa as medidas adotadas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), embasadas nas orientações do Ministério da Saúde e da Organização Mundial de Saúde (OMS) para a prevenção contra o novo Coronavírus (Covid-19).

2.1 Cultivo experimental de arroz e feijão-caupi

O cultivo de *O. sativa* (arroz) e *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) para fins experimentais foi conduzido em casa de vegetação no setor de fitossanidade do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), objetivando estudos do uso potencial de nanopartículas de cobre e prata para o controle de *Bipolaris oryzae*, agente causal da mancha-parda no arroz, e de herança da resistência genética de feijão-caupi à *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, agente causal da murcha de fusarium, a partir de cultivares apresentando distintos padrões de resistência as respectivas doenças.

As cultivares utilizadas no estudo consistem em genótipos desenvolvidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), compreendendo arroz para cultivo irrigado e feijão-caupi para cultivo de sequeiro, conforme especificado na tabela 1.

Tabela 1 – Cultivares de arroz e feijão-caupi e padrão de resistência a mancha parda e murcha de fusarium, respectivamente

Espécie	Genótipo	Origem	Padrão de resistência
<i>Oryza sativa</i>	BRS A702CL	EMBRAPA	Suscetível
	BRS Pampeira	EMBRAPA	Moderadamente resistente
	BRS Tropical	EMBRAPA	Moderadamente resistente
<i>Vigna unguiculata</i>	BR 17 Gurguéia	EMBRAPA	Suscetível
	Miranda IPA 207	IPA	Moderadamente resistente

As sementes foram desinfestadas em álcool a 70% durante um minuto, hipoclorito de sódio a 0,5% por igual período, e em seguida passou por triplo enxágue em água destilada esterilizada. Logo após foram semeadas em vasos plásticos com capacidade para 3 dm³ contendo substrato comercial a base de casca de pinus, turfa, carvão e vermiculita. A condução do cultivo consistiu de cuidados permanentes com rega diária, aplicação de solução nutritiva, tutoramento, e o controle de pragas e fitopatógenos (figuras 1 e 2).

Figura 1 – Cultivo experimental de arroz em casa de vegetação



Fonte: SILVA, K. W. L.

Figura 2 – Cultivo experimental de feijão-caupi em casa de vegetação



Fonte: SILVA, K. W. L.

Entre os problemas fitossanitários relacionados as culturas, observou-se a ocorrência da lagarta desfolhadora *Spodoptera frugiperda* nas plantas de arroz, sendo controlada através de catação manual (figura 3). As principais ocorrências no cultivo do feijão-caupi consistiram da incidência de ácaros, observados em plantas com as folhas do ponteiro apresentando aspecto coreáceo e quebradiço (figura 4); mosca-minadora (*Liriomyza sativae*); mosca-branca (*Bemisia tabaci*); pulgão-preto (*Aphis rumicis*); e percevejos , sendo controlados a partir de catação manual e pulverização de produtos recomendados para a cultura (figura 5).

Figura 3 – *Spodoptera frugiperda* em plantas de arroz.



Fonte: SILVA, K. W. L.

Figura 4 – Plantas de feijão-caupi atacadas por ácaros



Fonte: SILVA, K. W. L.

Figura 5 – Pragas de ocorrência em plantas de feijão-caupi. A – Pulgão-preto (*Aphis rumicis*); B – Percevejo ; C – Mosca-minadora (*Liriomyza sativae*)



Fonte: SILVA, K. W. L.

Além das pragas foi observada a ocorrência de oídio (*Oidium* sp.) ao final do ciclo das plantas de feijão-caupi, caracterizado pela presença de estruturas circulares de coloração branco-acizentada e aspecto pulverulento sobre a face adaxial das folhas, conforme mostra a figura 6.

Figura 6 – Oídio (*Oidium* sp.) em plantas de feijão-caupi



Fonte: SILVA, K. W. L.

2.2 Isolamento e Preservação de Fitopatógenos

O isolamento de fungos fitopatogênicos consiste na sua obtenção em cultura pura a partir de tecidos doentes do hospedeiro, solo, água ou substrato. A obtenção do patógeno em cultura pura é essencial para estudos de morfologia, taxonomia, reprodução e fisiologia, bem como em testes de patogenicidade, resistência genética de plantas e sensibilidade a fungicidas (ALFENAS et al., 2007).

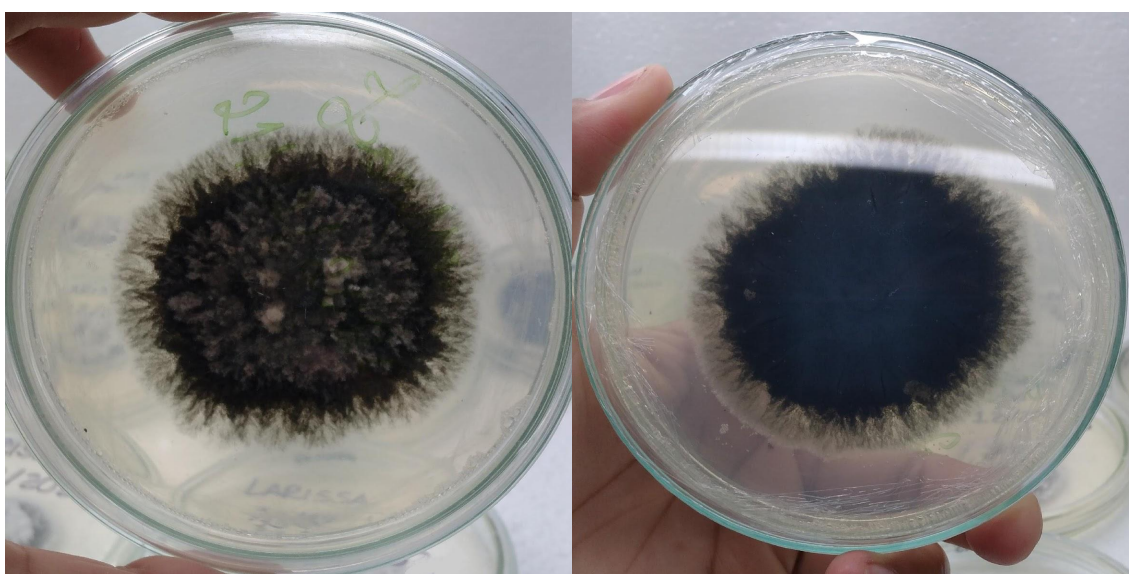
Segundo Alfenas et al. (2007), existem diferentes técnicas de isolamento, aplicadas conforme a natureza do órgão doente, substrato, estágio de desenvolvimento do patógeno (vegetativo ou reprodutivo), e o critério do operador. Os métodos básicos de isolamento são caracterizados em direto, consistindo na transferência direta de estruturas do patógeno (esporos, hifas, rizomorfos, escleródios) diretamente do órgão infectado ou substrato para o meio de cultura; e indireto, consistindo na transferência de fragmentos de tecido infectado do hospedeiro, amostras de solos, substrato ou sementes infestadas para o meio de cultura, não apresentando estruturas evidentes do patógeno, sendo aplicadas técnicas específicas conforme a natureza do órgão infectado (lenhoso, carnososo, não lenhoso, ou não carnososo) ou substrato.

O isolamento de *Bipolaris oryzae* foi realizado pela técnica de isolamento indireto a partir de fragmentos do tecido foliar de plantas de arroz apresentando lesões circulares ou ovais de coloração marrom ou avermelhadas de centro cinza, retirados da região limítrofe entre a área lesionada e a área sadia, caracterizada como a região de maior atividade do patógeno, e evitando possíveis organismos saprófitas existentes nas áreas necróticas do centro das lesões. O procedimento foi conduzido sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar usando ferramentas e materiais desinfestados e esterilizados, submetendo o material vegetal ao corte para retirada das áreas de interesse, desinfestação em álcool 70%, hipoclorito de sódio 0,5%, durante 30 segundos cada, e tripla lavagem em água destilada esterilizada, com posterior secagem sobre papel filtro esterilizado.

Os fragmentos de tecido foliar foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), seguindo para a Incubação em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas, e temperatura de 25 °C, durante 7 a 10 dias.

A cultura pura (figura 7) foi obtida a partir da repicagem do crescimento fúngico proveniente do isolamento, consistindo da sua transferência sob condições assépticas para outra placa de Petri contendo meio de cultura BDA, e retornando para a câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas a temperatura de 25 °C, permanecendo entre 7 e 10 dias, posteriormente identificada através de microscopia ótica.

Figura 7 – Cultura pura de *Bipolaris oryzae*



Fonte: SILVA, K. W. L.

A preservação de fungos fitopatogênicos consiste na aplicação de técnicas específicas para conservação do material a curto, médio ou longo prazo, mantendo as características morfológicas, fisiológicas e genéticas do patógeno. Os principais métodos de preservação são caracterizados em repicagem contínua ou periódica, água destilada estéril, óleo mineral, sílica gel, liofilização, entre outros, aplicados conforme o uso e as especificidades do patógeno.

A preservação de *Bipolaris oryzae* foi realizada pelo método de repicagem periódica a cada 10 dias, mediante a transferência do material sob condições assépticas para placas de Petri contendo meio de cultura BDA, e condicionado em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas a temperatura de 25 °C.

2.3 Aplicação de nanopartículas

A determinação de doses das nanopartículas de cobre e prata para uso em experimento *in vivo* com *Bipolaris oryzae*, isto é, a partir da interação com o hospedeiro, foi realizada através de experimentação *in vitro* submetendo o isolado a crescimento em meio de cultura contendo as nanopartículas em concentrações distintas, observadas a maior concentração apresentando crescimento do patógeno, e a menor concentração com potencial inibidor (figuras 8 e 9), sendo as dosagens estabelecidas dentro dos intervalos registrados.

Figura 8 – Preparo de experimento *in vitro*



Fonte: SOUSA, F. A.

Figura 9 – Avaliação de crescimento de *Bipolaris oryzae in vitro* sob concentrações distintas de nanopartículas



Fonte: SOUSA, F. A.

O preparo das soluções de nanopartícula de cobre e prata, foi realizado em água destilada, sendo verificado o potencial hidrogeniônico (pH) e ajustado para o intervalo entre 6,5 à 7,5 (figura 10). A aplicação foi efetuada a partir de pulverização manual até obter uma satisfatória cobertura da área foliar, e reservadas as plantas para inoculação do patógeno após o período de 24 horas.

Figura 10 – Ajuste da solução de nanopartículas de prata



Fonte: SOUSA, F. A.

2.4 Inoculação de *Bipolaris oryzae*

O inóculo foi preparado a partir do isolado de *B. oryzae* adicionando aproximadamente 20 mL de água destilada as placas de Petri, raspando o crescimento fúngico com o auxílio de um pincel de cerdas macias em movimento circular suave, posteriormente filtrando em funil com dupla camada de gazes para retenção dos fragmentos miceliais e detritos do meio de cultura, obtendo uma suspensão de esporos.

A padronização da suspensão de esporos foi realizada em 10^6 esporos/mL retirando uma alíquota de 1mL da suspensão homogeneizada e depositando na câmara de contagem do Hemacitômetro de Neubauer, sendo efetuando a contagem em microscópio ótico com aumento de 100 vezes e registrando o número de esporos presentes nos cinco quadrados secundários, uniformemente distribuídos nos retículos do hemacitômetro, para fins de cálculo de determinação da concentração de esporos e ajuste da suspensão.

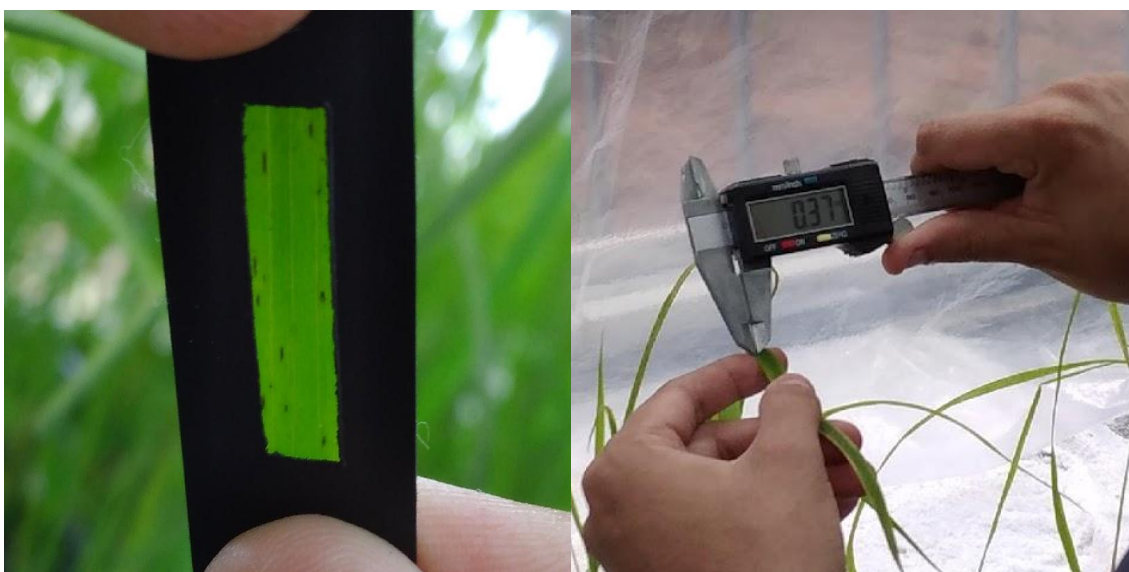
Ajustada a concentração da suspensão foi adicionado Tween 20 na condição de espalhante adesivo e gelatina incolor para a maior aderência do inóculo a superfície foliar do hospedeiro. A inoculação foi realizada a partir de pulverização manual da suspensão de inóculo após 24 horas da pulverização distinta de plantas com fungicida, nanopartículas de cobre e nanopartículas de prata, posteriormente submetidas a condição de câmara úmida por um período de 24 horas sem contato com a luz para germinação dos esporos e penetração do fungo nos tecidos foliares.

2.5 Avaliação da Mancha-parda do arroz

A avaliação foi realizada às 48, 72 e 96 horas após a inoculação de *B. oryzae*, selecionando aleatoriamente uma folha amostral de cada planta, abrangendo os quatro tratamentos experimentais caracterizados pelo controle, fungicida, nanopartículas de cobre, e nanopartículas de prata, sendo posteriormente identificadas para quantificação e mensuração das lesões em área delimitada de 1cm² com auxílio de um gabarito e paquímetro (figura 11). Além da determinação do número e tamanho das lesões, foi avaliada a severidade que consiste no método

quantitativo e qualitativo de determinação percentual da área afetada através de medidores em computador, chaves descritivas, sensores remotos, ou escalas diagramáticas como a aplicada ao experimento.

Figura 11 – Avaliação da mancha parda em plantas de arroz. A – Número de lesões por cm² de área foliar; B – Tamanho das lesões



Fonte: SOUSA, F. A.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contribuição de estudos no âmbito da resistência genética de doenças de plantas é evidenciada no suporte prestado a produção agrícola através do desenvolvimento e transferência de tecnologias para o manejo estratégico e eficiente de doenças.

As atividades desenvolvidas no estágio supervisionado obrigatório permitiram aprimorar de maneira integralizada os conhecimentos obtidos ao longo do curso sob os aspectos de cultivo, condições fitossanitárias, e soluções estratégicas, estendendo às habilidades adquiridas mediante as práticas laboratoriais, e o conhecimento específico agregado sobre *Bipolaris oryzae* e a mancha-parda do arroz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Isolamento de Fungos Fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Lavras: UFV, 2007. p. 53-90.
- BEDENDO, S. P. 1997. Doenças do Arroz. In: KIMATI, H.; AMORIM, L; BERGAMIN FILHO, A; CAMARGO, L. E. A; REZENDE, J.A.M., **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1997, v.2, cap.10, p. 88 – 101.
- CAROLLO, E. M.; Santos Filho, H. P. Isolamento de micro-organismos fitopatogênicos. In: CAROLLO, E. M.; SANTOS FILHO, H. P. **Manual básico de técnicas fitopatológicas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2016, cap.3, p. 77 – 85.
- FURLANETO, F. P. B. Nanotecnologia no setor agropecuário. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 2, p. 1-4, 2011.
- GRANZIERA, L. S.; ASSIS, O. B. G.; BRUMATTI, C. R.; JESUS, K. E. Nanotecnologia na agricultura: Prospecção dos indicadores de impactos ambientais e sociais. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6., 2012, Jaguariúna. **Anais...** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 1 CD ROM. Nº 12408.
- RAMYADEVI, J.; JEYASUBRAMANIAN, K.; MARIKANI, A.; RAJAKUMAR, G.; RAHUMAN, A. A. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. **Mater Letters**, v. 71, p. 114-116, 2012.
- SUNDER, S.; SINGH, R; AGARWAL, R. Brown spot of rice: an overview. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 67, n. 3, p. 201-215, 2014.
- OU, S.H. **Rice Diseases** 2ª. ed. England: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1985. 370 pp.