



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
ÁREA DE FITOSSANIDADE

RELATÓRIO DO ESTAGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO – ESO

**LABORATÓRIO DE RESISTÊNCIA DE DOENÇAS DE PLANTAS/ FISIOLOGIA
DO PARASITISMO**

GLEICIELLEN SILVA ROCHA DOS SANTOS

RECIFE, DEZEMBRO 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA

ÁREA DE FITOSSANIDADE

RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO – ESO
LABORATÓRIO DE RESISTÊNCIA DE DOENÇAS DE PLANTAS/ FISILOGIA
DO PARASITISMO

Relatório das atividades realizadas durante o Estágio Supervisionado Obrigatório no Laboratório de Resistência de Doenças De Plantas / Fisiologia Do Parasitismo ao Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (SEDE), como parte integrante dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo. Orientador: Prof. Drº. Jonas Alberto Rios. Supervisor: :Profº. Drº. Jonas Alberto Rios

RECIFE, DEZEMBRO 2019

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)

- S237r Santos, Gleiciellen Silva Rocha dos
Relatório do Estágio Supervisionado Obrigatório Laboratório de Resistência de Doenças de Plantas
Fisiologia do Parasitismo / Gleiciellen Silva Rocha dos Santos. - 2019.
16 f. : il.
- Orientador: JONAS ALBERTO RIOS.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Agronomia, Recife, 2020.
1. *Fusarium oxysporum*. 2. *Elsinoe ampelina*. 3. Feijoeiro. I. RIOS, JONAS ALBERTO, orient. II. Título

CDD 630

**RELATORIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO – ESO
LABORATÓRIO DE RESISTÊNCIA DE DOENÇAS DE PLANTAS/ FISIOLOGIA
DO PARASITISMO**

Gleiciellen Silva Rocha Dos Santos
Discente do curso de Agronomia/UFRPE (SEDE)

Prof. Dr. Jonas Alberto Rios; Nota atribuída _____
Orientador – Fitossanidade/UFRPE (SEDE)

Prof. Dr. Jonas Alberto Rios; Nota atribuída: _____
Supervisor – Laboratório de Resistência de Doenças de Plantas/
Fisiologia do Parasitismo

RECIFE, DEZEMBRO DE 2019

Sumário

INTRODUÇÃO	6
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	6
Isolamento indireto em placas.....	6
Crescimento do patógeno em Placa de petri.....	7
Preservação dos isolados de Antracnose.....	8
Isolamento indireto de <i>Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum</i> do caule do feijoeiro	11
Preservação em água, óleo e sílica do fungo <i>Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum</i>	12
Preservação em Sílica.....	14
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	15
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	16
AGRADECIMENTOS.....	17

INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um amplo grupo de organismos bastante diversificados entre si no que se refere a parte filogenética, possuindo uma grande importância na parte econômica, pois aos que causam doenças em plantas, se não manejados podem dizimar a produção ou acarretar alguma desordem fisiológica na planta fazendo com que tenha queda na produção, possuem também sua importância ecológica, pois nem todos os fungos são de ordem maléfica e possuem papel fundamental na manutenção dos ecossistemas. Possuem estruturas de reprodução como hifas, esporos, esclerócios. E para sua sobrevivência realizam absorção de nutrientes do seu hospedeiro. (KRUGNER; AMORIM, 1995)

Diante da importância que os patógenos de solo e parte aérea tem para agricultura de pequeno e grande porte dentro e fora do estado de Pernambuco, realizou-se um estágio no período de 01/10/2019 à 29/11/2019 na Universidade Federal Rural de Pernambuco, prédio da Fitossanidade, Laboratório de Resistência de Doenças de Plantas/ Fisiologia do Parasitismo, que trabalha com resistência de plantas aos ataques de patógenos, no caso Antracnose (*Elsinoe ampelina*) em videira e *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum* em várias cultivares. O objetivo do estágio foi aplicar técnicas habituais de fitopatologia na preservação, repicagem, isolamento, inoculação de fungos, assim como, acompanhar a montagem de experimento em casa de vegetação com diferentes cultivares de feijão e posterior avaliação dos níveis de severidade. Todas as atividades foram registradas por fotos feitas pela autora do relatório.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Isolamento indireto em placas

Foi realizado isolamento indireto em placa de petri do fungo Antracnose (*Elsinoe ampelina*), presente em folhas de videira colhidas através de visita à campo.

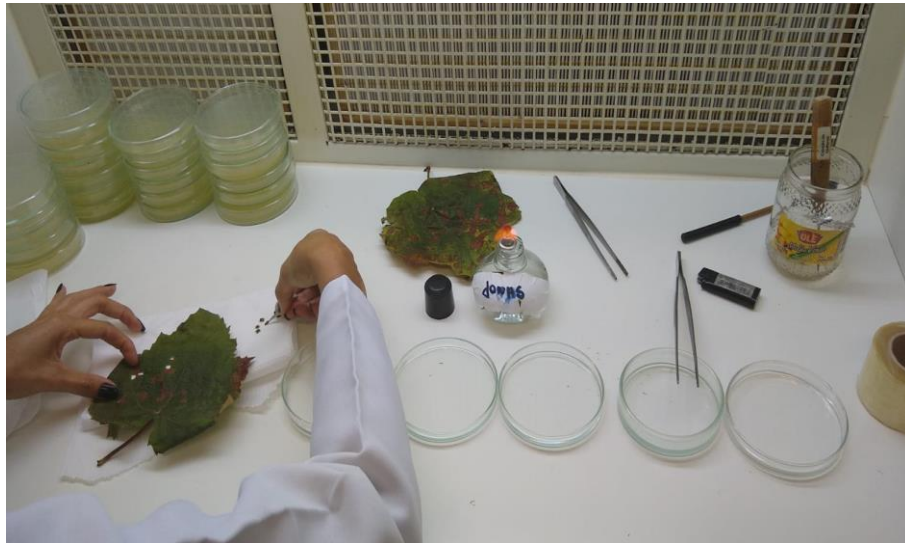


Figura 1: A - Procedimento para isolamento indireto de fungos

No processo de isolamento de fungos pelo método indireto, devemos seguir alguns procedimentos padrões para minimizar a ocorrência de organismos saprófitas que não sejam de interesse no crescimento da colônia do fungo em placa de petri. Precisamos de um local estéril, logo, toda a técnica é realizada em câmara de fluxo previamente limpa com álcool 70% e luz UV. Os materiais necessários para o isolamento são partes do tecido vegetal retirados de área de transição, cortados em cubos com auxílio de bisturi, lamparina, pinça, placas de petri devidamente esterilizadas, álcool 70%, hipoclorito de sódio, água esterilizada e placas contendo meio de crescimento BDA (batata, dextrose e ágar). (ALFENAS et. al., 2007).

Crescimento do patógeno em Placa de petri

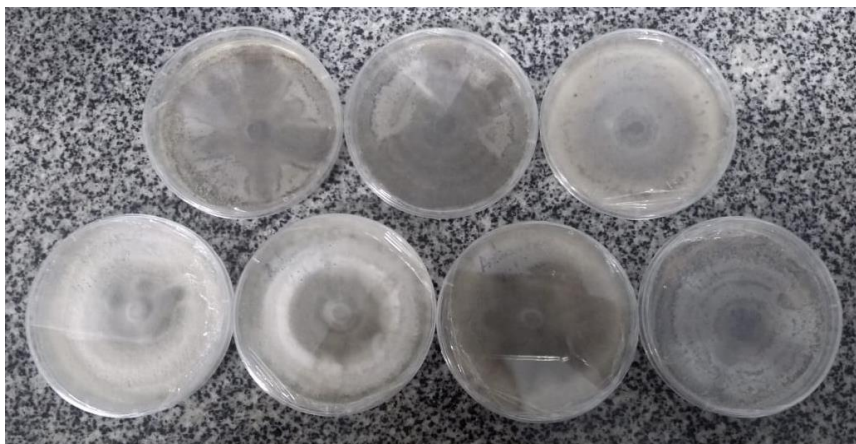


Figura 2: Crescimento em Placa do Fungo Antracnose

Após repicagem para placa de petri contendo meio de crescimento batata, dextrose e ágar (BDA) é necessário aguardar um tempo de incubação de no mínimo 7 dias para que a colônia do fungo cresça, se estabeleça e ganhe cor característica do patógeno. As placas foram deixadas em bandejas no próprio laboratório e vedadas com rolopack para evitar a entrada de insetos que poderiam contaminar o material.

Preservação dos isolados de Antracnose

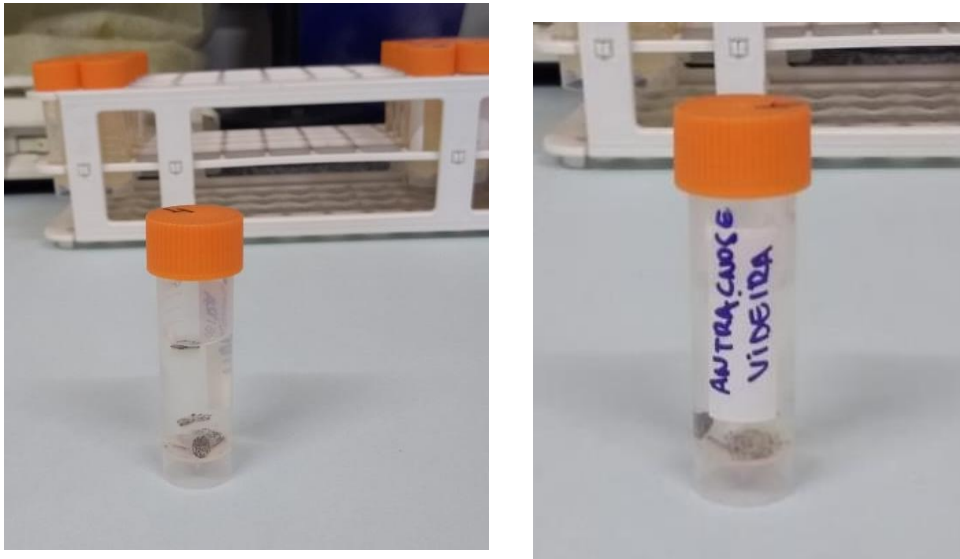


Figura 3: Tubo de preservação de fungos para água e óleo; Tubo com identificação do patógeno

O material do crescimento em placa pode ser preservado em tubos plásticos contendo água destilada esterilizada, isso garantirá viabilidade do patógeno para uso posterior. No caso, foi usado discos de aproximadamente 5mm feitos com auxílio de um furador de metal e os tubos identificados no verso (Gonçalves et. al., 2007).

Avaliação de Resistência em diferentes cultivares de feijão ao fungo *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*.

Foi realizado um ensaio com seis cultivares de feijão, sendo elas: MNCO1-649F-2-1, Miranda IPA 207, BR-17 Gurgueia, Esperança, BRS Purjante, IPA 206,



Figura 4: Cultivares resistentes utilizadas na montagem do ensaio

Inicialmente foram separadas algumas sementes de cada cultivar em placas de petri para serem levadas a casa de vegetação e iniciar o plantio em copos descartáveis. As sementes não sofreram nenhum processo de desinfestação.

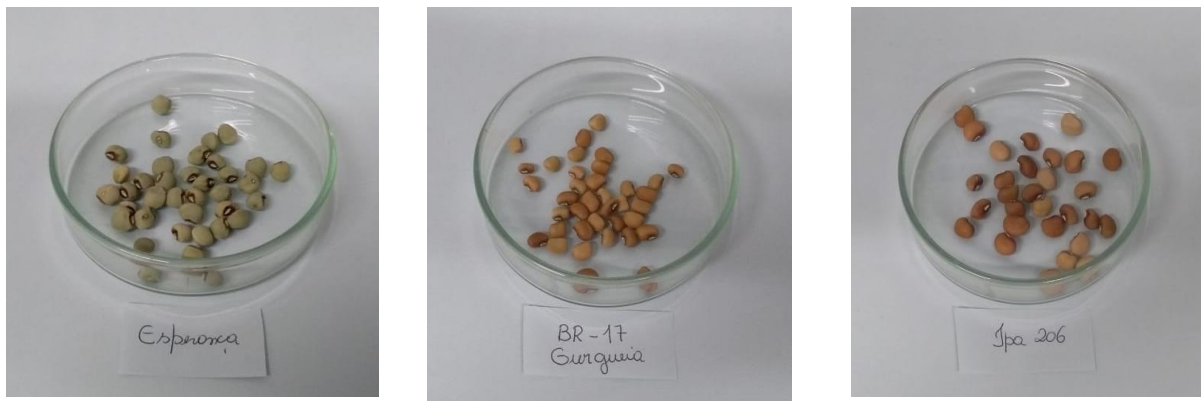


Figura 5: Cultivares resistentes (Esperança) e suscetíveis (Gurguéia, IPA 206) utilizadas no ensaio



Figura 6: Crescimento em copos descartáveis de plântulas de feijão em casa de vegetação

As sementes foram levadas para casa de vegetação e plantadas em copos descartáveis. Nesse processo foram utilizadas 180 sementes uma por copo e após cinco dias de crescimento, todas as plantas foram transplantadas para vasos. Ao total foram usados sessenta vasos, cada um com três plantas e dez repetições.

Antes de realizar o transplante para vasos maiores, as plantas sofreram danos nas raízes para que fosse injetada suspensão de esporos de *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum* e só depois foram para os vasos contendo substrato, onde todos os dias foram irrigadas e observado o aparecimento de sintomas nas plantas. Como o feijão possui um caule herbáceo foi necessário o uso de tutor. O fungo é um habitante natural do solo, saprófita, sobrevivente de restos culturais e disseminado através de água de irrigação, uma vez instalado na área seu controle se torna mais difícil. (KIMATI, 1980).



Figura 7: Dano causado nos feixes vasculares do feijoeiro por *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*

Após alguns dias de inoculação, as plantas começaram a mostrar sintoma de murcha evoluindo para um quadro de necrose. Observamos uma resistência moderada nas cultivares resistentes apresentando melhor resultado a Esperança e BRS Purjante e a cultivar susceptível Gurgueia como era de se esperar não apresentou resistência alguma ao fungo.

Isolamento indireto de *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum* do caule do feijoeiro

Foi realizado o isolamento do fungo para placas de petri, contendo álcool 70%, hipoclorito de sódio e água destilada esterilizada, o caule foi seccionado ao meio lavado com detergente e retirado pedaços de área de transição sadia e doente. Deixando o material em cada solução por 1 minuto e em seguida retirado o excesso de água com papel filtro e colocados em placas de petri contendo meio de cultura de crescimento batata, dextrose e ágar (BDA). As placas foram encubadas durante sete dias



Figura 8: Esquema do isolamento do caule do feijoeiro



Figura 9: Incubação do fungo *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*

Preservação em água, óleo e sílica do fungo *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*

Após incubação de sete dias, foi observado o crescimento da colônia do fungo em placa, de coloração rósea característica do patógeno. Esse material foi preservado em tubos castellani contendo água destilada esterilizada e cinco discos de micélio em cada tubo, o procedimento todo realizado em câmara de fluxo.



Figura 10: P – Crescimento em placa de petri do fungo *Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*

Preservação em Óleo mineral

Para realizar essa preservação é necessário esterilizar o óleo dois dias durante uma hora cada e esperar que fique de coloração transparente. Com meio de crescimento batata, dextrose e ágar (BDA) coloca-se em tubos de 5ml essa solução e esteriliza em autoclave durante 20 minutos, após o tempo descrito esses tubos devem ficar inclinados até seu total resfriamento, pois isso ajuda no crescimento da colônia do fungo, um disco de micélio da margem de uma cultura com sete dias de crescimento é retirado e colocado no tubo inclinado e com mais sete dias é então colocado o óleo, essa pratica garante a preservação do material por mais tempo e garantia de uso em outra ocasião.



Figura 11: Tubo de preservação contendo meio BDA

Preservação em Sílica

Tubos falcon foram esterilizados em autoclave, assim como discos de papel para evitar o contato da sílica com o fungo. Papeis de filtro cortados em tiras foram colocados assim que o fungo foi repicado para placa contendo meio de cultura de crescimento batata, dextrose e ágar (BDA) para que a massa de micélio crescesse por cima dos papeis, após sete dias essas tiras foram retiradas das placas e colocadas em tubos falcon contendo sílica em gel e discos de papel para evitar contato. Esse material foi acondicionado em geladeira para ajudar na preservação, mas é comum a utilização de dessecadores.

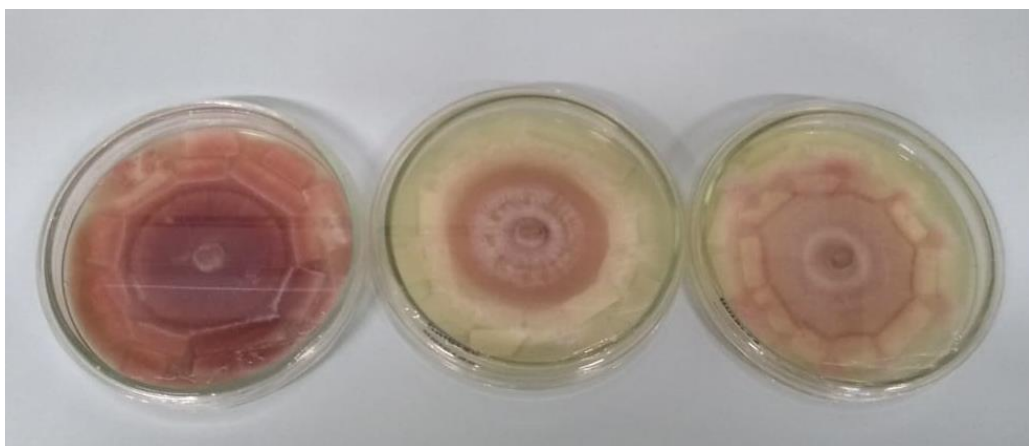


Figura 12: Crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em tiras de papel de filtro,



Figura 13: Técnica de preservação em sílica utilizando tubos falcon

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a realização de todas atividades descritas acima, foi possível inferir que as técnicas usuais disponíveis em metodologias de livros, indicadas para manuseio de fungos fitopatogênicos foi aplicada. Porém alguns pontos precisam ser aprimorados. Destaca-se como pontos fortes:

- Obtenção de propágulos em campo
- Utilização de casa de vegetação para montagem dos ensaios
- Materiais adequados para manuseio de patógenos
- Equipamentos ópticos em perfeitas condições

Em contrapartida existem alguns aspectos que precisam ser aprimorados e dessa forma, podem contribuir para um melhor desempenho do laboratório, tais como:

- Investir em sala de incubação
- Compra de placas de petri de vidro
- Providenciar uma câmara de fluxo
- Investir em um micro-ondas para preparação de meio
- Procurar fazer meio com batata invés de utilizar meio sintético sempre
- Procurar desinfestar substrato antes de usar em ensaios
- Procurar desinfestar sementes
- Descartar fungos antigos em placa

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; MAFIA, R.G.; GONÇALVES , R.D. Isolamento de fungos fitopatogênicos . In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Metódos em Fitopatologia**, 2007, p. 54-71.

KIMATI, H.; Doenças do feijoeiro. In: GALLI, F.; CARVALHO, P.C.T.; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N.; SALGADO, C.L.; KRUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; BERGAMIN, A.F.; Manual de fitopatologia- Doenças das plantas cultivadas vol II. 1980, p. 303-305.

GONÇALVES , R.D.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; Isolamento de fungos fitopatogênicos . In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Metódos em Fitopatologia**, 2007, p. 91- 101.

KRUGNER, T.I.; AMORIM, L.; Fungos. In: Bergamim, A.F.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia, princípios e conceitos**, 1995, p. 46.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meu pais, Elisabete Maria da Silva Santos e meu eterno pai Alcides Rocha dos Santos, por todo apoio, força e suporte durante toda minha trajetória de vida dentro e fora da Universidade.

Agradeço a Deus pela oportunidade de me formar em uma universidade pública e ter o prazer de poder concluí-la.

Agradeço ao Professor Dr. Jonas Alberto Rios, pela oportunidade de realizar o Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) em seu Laboratório De Resistência De Doenças De Plantas/ Fisiologia Do Parasitismo e todos os seus pós- graduandos pelo acolhimento.

Agradeço a todos os professores que pude ter o prazer de conviver durante toda minha graduação, por todo o conhecimento repassado para mim e colegas de curso.

Agradeço ao professor Dr. Sami Jorge Michereff pela oportunidade de estágio em seu laboratório de Epidemiologia de Doenças em Plantas e por todo aprendizado repassado por ele e sua equipe de pós-graduandos.

E por fim, agradeço aos meu colegas de curso que contribuíram direta e indiretamente para minha formação.

.