

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE AGRONOMIA**

FRANCYELLE MARTINS

**ISOLAMENTO “IN VITRO” DE *RAMULARIA AREOLA* NA CULTURA DO
ALGODOEIRO**

**Uberlândia – MG
Abril – 2013
FRANCYELLE MARTINS**

**ISOLAMENTO “IN VITRO” DE *RAMULARIA AREOLA* NA CULTURA DO
ALGODOEIRO**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Agronomia,
da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em 18 de abril de 2013

Prof. Fernando César Juliatti
Membro da Banca

Eng. Agr. Joyce Dorneles Moura
Membro da Banca

Prof. Júlio César Viglioni Penna

Orientador

FRANCYELLE MARTINS

**ISOLAMENTO “IN VITRO” DE *RAMULARIA AREOLA* NA CULTURA DO
ALGODOEIRO**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Agronomia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Engenheiro
Agrônomo.

Orientador: **Júlio César Viglioni Penna**

UBERLÂNDIA

2013

ISOLAMENTO “IN VITRO” DE *RAMULARIA AREOLA* NA CULTURA DO ALGODOEIRO

Francielle Martins¹, Júlio César Viglioni Penna², John Allis³, Joyce Dorneles Moura³
e Lucas Kenji Takami³

RESUMO: As condições ambientais que favorecem a produção do algodoeiro, como relevo e precipitação, também favorece a incidência de algumas doenças como a mancha-de-ramulária, causada pelo fungo *Ramularia areola*. Essa doença provoca lesões na folha levando a uma redução da área foliar fotossintetizante e consequentemente a redução da produção. Até o momento não existem estudos conclusivos para a caracterização do patógeno, de forma a viabilizar estudos visando o melhoramento genético voltado a obtenção de genótipos resistentes. Por isso, este trabalho teve como objetivo estudar a estrutura morfológica, a partir do isolamento e da multiplicação, assim como estabelecer a melhor forma de conservação e manutenção do isolado. Foi avaliado diferentes métodos de isolamento, multiplicação e conservação. A avaliação foi realizada levando em consideração a sua capacidade de reprodução e esporulação, e a virulência do patógeno. Os métodos de isolamento avaliados foram caracterizados pela eficiência e praticidade em retirar as estruturas reprodutivas do patógeno de folhas oriundas do campo. Para isso foram testados os métodos de isolamento direto e indireto, nos meios de cultura BDA e V8. O isolamento indireto foi realizado a partir de fragmentos de folhas de aproximadamente 0,5 cm² contendo uma quantidade satisfatória de esporos do fungo. O isolamento direto foi realizado com o auxílio de uma agulha onde os esporos da folha foram retirados e inoculados em três pontos equidistâtes de uma placa de Petri, contendo meio de cultura. As avaliações foram realizadas com 3, 15 e 30 dias. Quando foi constatado melhores resultados para os isolados obtidos através do isolamento direto. Para a conservação do inóculo, o melhor resultado obtido foi mantendo-o em óleo mineral e acondicionado no refrigerador, paralisando o seu desenvolvimento e reduzindo o seu metabolismo.

Palavras-chave: *Ramularia areola*, inóculo, isolamento e multiplicação.

Isolation and multiplication of Grey Mildew disease (*Ramularia areola*) in cotton
(*Gossypium hirsutum* L. r. *Latifolium* Hutch).

Francielle Martins¹, Júlio César Viglioni Penna², John Allis³, Joyce Dorneles Moura³
and Lucas Kenji Takami³

ABSTRACT –The environmental conditions that favor cotton growth as topography and rainfall also favors the incidence of some diseases such as grey mildew caused by the fungus *Ramularia areola*. In grey mildew infection the surface of the leaves gets uniformly covered by white powdery growth of the fungus, leading to a reduction of photosynthetic area. To date there are no conclusive informations to characterize the pathogen in order to facilitate studies aiming the development of resistant genotypes. Therefore the goal of this study was to understand the morphological structure, from isolation, multiplication and also establish the best form of conservation and maintenance of the fungus isolates. It was evaluated different methods of isolation, multiplication and conservation. The evaluation was performed considering the ability of reproduction, sporulation and the pathogen's virulence. The isolation methods evaluated were characterized by efficiency and easiness of removing the reproductive structures of the pathogen from the leaves. For that matter were tested the methods of direct and indirect isolation in PDA and V8 media. The indirect isolation was performed from leaf fragments of approximately 0.5 cm² with a satisfactory amount of fungal spores. The direct isolation was performed with a needle when the spores were removed from the leaves and inoculated at three equidistant points in a Petri plate and evaluated after 3, 15 and 30 days. It was concluded that the best results were obtained from the direct isolation method. For inoculums conservation, the best results were obtained when keeping it in mineral oil and stored in the refrigerator, paralyzing its development and reducing the fungus metabolism.

Key-words: *Ramularia areola*, inoculum, isolation, multiplication.

1. INTRODUÇÃO

O algodão é considerado a mais importante fibra têxtil utilizada. O algodoeiro, é uma planta de aproveitamento mais completo, além da fibra, pode oferecer os mais variados produtos de utilidade, como por exemplo, o caroço do algodão para consumo animal, instrumentos médicos, óleo mineral e produção de biodiesel.

É uma espécie do gênero *Gossypium*, da família das *Malvaceae*. Esse gênero é composto por diversas espécies nativas das áreas tropicais da África, Ásia e América. Atualmente, quatro espécies são aproveitadas em larga escala, são elas *Gossypium hirsutum*, que representa cerca de 90% da produção mundial, *Gossypium barbadense*, que possui dentro de suas características uma fibra com maior resistência e de alto padrão de qualidade, *Gossypium herbaceum* e *Gossypium arboreum*, produzidos principalmente na China e na Índia.

Na última safra (2011/2012), a produção mundial de algodão em pluma chegou a 26,9 milhões de toneladas, tendo o Brasil como importante aliado para o crescimento da produtividade mundial, contribuindo com 1,95 milhão de toneladas, sendo que cerca de 0,82 milhão de toneladas foram destinadas a exportação, ou seja, 42,2% da produção nacional. Ainda em relação a produção brasileira, os Estados que mais contribuem para o aumento dos índices de produtividade são o Mato Grosso e a Bahia, chegando a produzir cerca de 4 a 5 vezes mais que Goiás, terceiro Estado produtor. (CONAB, 2012)

As condições ambientais como precipitação e temperatura que favorecem a produção do algodoeiro, também condicionam o aparecimento de doenças fúngicas, como é o caso da Mancha-de-Ramulária, causada pelo fungo *Ramularia areola*. É considerada uma das principais doenças do algodoeiro. Ocorre com maior frequência na região do cerrado, principalmente, em locais onde não se costuma adotar a rotação de cultura como prática cultural. O primeiro relato da doença foi feito nos Estados Unidos, em 1932. (EHRICH; WOLF, 1932)

Essa doença já foi considerada uma doença de final de ciclo, no entanto, com a expansão dos cultivos e utilização de cultivares susceptíveis, ela tem aparecido cada vez mais cedo.

A dispersão do patógeno é muito rápida, uma vez que, o fungo sobrevive sobre lesões em restos de cultura, e os esporos produzidos são facilmente carregados pelo vento. (LUTENAU, 2007)

Dentre as cultivares em uso atualmente, somente a FMJ 705, possui resistência comprovada. Por isso, pode chegar a ser realizada oito aplicações para o controle da doença, aumentando drasticamente os custos de produção.

Até o momento não existem estudos conclusivos para a caracterização do patógeno, de forma a viabilizar estudos visando o melhoramento genético voltado a obtenção de genótipos resistentes. (LUTENAU, 2007)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO DA DOENÇA NO BRASIL

O Brasil tem como histórico de produção nos últimos quinze anos um aumento exacerbado da área cultivada com algodão, principalmente nas condições do cerrado

brasileiro, como os estados do Mato Grosso, Goiás e Bahia. A busca pela produtividade alta tem feito com que as tecnologias relacionadas ao desenvolvimento e incorporação de cultivares aumentem muito (SUASSUNA et al., 2006).

Os atuais sistemas agrícolas do Brasil, cuja forma de desenvolvimento são baseados na revolução verde (cultivares melhoradas, irrigação e uso de pesticidas) têm maximizado a produção em diversas regiões do Brasil. Recentemente, tem-se observado um aumento na prática do uso de fungicidas no controle de doenças de plantas, nas culturas da soja, algodoeiro, milho, cafeeiro e hortaliças. Severas epidemias têm ocorrido no Brasil, como a cercosporiose do milho, a ferrugem da soja, a mancha de ramulária do algodoeiro que tem desestabilizado os atuais sistemas de produção.

O aumento na área plantada com algodão no Brasil e as tecnologias que prezam cultivares cada vez mais produtivas são os dois principais fatores que fizeram com que surgissem problemas importantes na cotonicultura nos últimos anos. Entre tais problemas, os principais são os fitossanitários. Pode-se destacar na cotonicultura, então, a mancha de ramulária (UTIAMADA et al., 2003). A doença em questão, nos anos em que a cotonicultura não exercia papel tão fundamental na agricultura brasileira, ocorria no final do ciclo da cultura e, por esse motivo, não se refletia em grandes problemas fitossanitários. O que ocorre, atualmente, é uma situação totalmente diferente: a mancha de ramulária passou a ser um problema mais precoce, causando desfolha e consequentes perdas na produção (SUASSUNA et al., 2005) e se agrava em áreas em que as práticas de rotação de culturas não são adotadas.

A doença mancha de ramulária, causada pelo fungo *Ramularia areola*, foi primeiramente descrita em 1890 e, a partir de então, relatada em todas as regiões produtoras de algodão no mundo inteiro. Atualmente, é considerada uma das principais doenças do algodoeiro, devido a vários motivos, tais como o aumento na área plantada, desuso da prática de rotação de culturas, clima tropical favorável à doença, manejo da lavoura e uso de genótipos com baixa resistência horizontal (PAIVA, 2001).

2.2 SINTOMATOLOGIA

De acordo com Ehrlich e Wolf (1932), citados por Chitarra (2011) e Suassuna et al. (2006), os sintomas iniciais da doença são lesões de formato angular com coloração branco azulada na face inferior das folhas mais velhas. Sob condições climáticas favoráveis, que são altas umidade e temperatura, acontece a maior possibilidade de

ocorrência de manifestações precoces da doença, causando intensa esporulação do patógeno. A consequência da precocidade da doença é uma evolução muito rápida dos sintomas, que ocupam o limbo foliar nas duas faces, provocando queda de folhas.

As perdas são variáveis de acordo com alguns fatores, entre eles condições climáticas, cultivares e densidade de semeadura. Em lavouras cujas condições climáticas são de precipitações constantes e altas temperaturas, associadas a um denso dossel decorrente de espaçamento menores ou maiores densidades de semeadura, a doença tende a ser mais severa, justificando, desse modo, medidas de controle químico. No caso das cultivares, o que acontece é que praticamente todas as cultivares utilizadas no Brasil tem algum nível de suscetibilidade à mancha de ramulária. No geral, a tendência é que quanto mais produtiva seja uma cultivar, mais suscetível a pragas e doenças ela se torna. Por isso, a resistência se dá de forma parcial e está mais ligada à arquitetura da planta (copa mais espaçada) do que a qualquer outra forma de resistência (SUASSUNA et al., 2006).

2.3 MÉTODOS DE CONTROLE

Os métodos de controle da doença mais utilizados estão relacionados aos métodos químicos, pelas vantagens de eficácia e facilidades que oferecem, principalmente por se tratar de necessidade de controle de grandes áreas. Aliado a este método, há a possibilidade muito válida do uso de métodos físicos, que são o uso de espaçamentos maiores, densidades de semeadura menores e uso de cultivares que apresentam dossel de plantas mais aerado.

Nesses casos de controle químico, a recomendação é pela aplicação de fungicidas registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Também, deve-se atentar ao fato da alternância de grupos químicos de fungicidas, para que não ocorra a resistência do patógeno.

Alguns autores recomendam determinar o estágio de desenvolvimento da doença para o início do uso de fungicidas, que é quando a doença atinge 25% da área foliar do terço inferior das plantas (ANDRADE et al., 1999; MEIRA et al., 2005; PRADE et al., 2000). Outros autores contestam essa tese, principalmente considerando as extensões das lavouras brasileiras de algodão. Por isso, consideram que o momento de controle aconteça anteriormente. Por fim, a partir do momento em que a doença aconteça de forma mais severa, atingindo as maçãs, o controle químico já não é mais eficaz.

De acordo com Souza et al. (2002), citados por Meira et al. (2005), os fungicidas mais eficazes para o controle do patógeno *Ramularia areola* são os fungicidas dos grupos dos benzimidazóis, triázóis e estrobirulinas, apesar destas já apresentarem problemas com resistência. Assim, tem sido testados com eficácia de resultados, de acordo com os autores, os fungicidas tiofanato metílico, propiconazol, carbendazim, procloraz, entre outros.

3. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo estudar metodologias de isolamento de *Ramularia areola*, a partir de folhas infestadas oriundas do campo, assim como a posterior multiplicação e manutenção do inóculo obtido.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi conduzido na fazenda experimental da Monsanto do Brasil, localizada a 18°59'52,20" S, 48°04'53,59" O a uma altitude de 893 metros, no município de Uberlândia, onde as folhas infestadas por *Ramularia areola* foram coletadas e os esporos inoculados.

4.1 REGIÃO DA PLANTA EM QUE AS FOLHAS FORAM COLETADAS

Foram coletadas folhas com uma quantidade satisfatória de esporos e com boas condições sanitárias, apresentando baixas quantidades de partículas de solo aderido as folhas, com o intuito de evitar problemas relacionados à posterior contaminação da cultura.

Diante desses aspectos, foram coletas folhas presentes no terço mediano da planta. Após a coleta, as folhas foram levadas para o laboratório em sacos plásticos e manipuladas no mesmo dia, para que os esporos retirados tivessem uma maior probabilidade de estarem viáveis e virulentos.

4.2 MEIO DE CULTURA ADEQUADO PARA O ISOLAMENTO, MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DO INÓCULO

De acordo com a literatura, os meios de cultura, mais utilizados para isolamento e multiplicação de *Ramularia areola*, são V8 e BDA. O meio de cultura V8 é um suco de vegetais, composto por, tomate, cenoura, aipo, beterraba, salsa, alface e espinafre, comumente empregado para promover a esporulação da colônia. Trata-se de um meio mais rico em nutrientes, de custo mais elevado e preparo mais complexo. Já o BDA, Potato-Dextrose-Ágar, é bastante utilizado para se conseguir o isolado e apropriado para condicionar o crescimento micelial do fungo. Trata-se de um meio de cultura, mais prático e de menor custo.

Inicialmente, assim como MENTEN E MARQUES (1979), verificou-se que o meio de cultura V8, seguido de BDA, são considerados uns dos melhores meios de cultura para o crescimento micelial. Sendo que, o meio mais adequado ao crescimento inicial do fungo seria o BDA e, posteriormente, para uma melhor esporulação, o V8.

Para a confecção de 1 litro do meio de cultura V8, são utilizados 900 mL do concentrado do suco V8, 100 mL de água destilada, 7 g de ágar e 3 g de carbonato de cálcio. O mesmo é submetido a fervura a fim de diluir o ágar e por fim, autoclavado a uma temperatura de 120°C por um período de 20 minutos. Para o meio de cultura BDA, foi utilizado um concentrado em pó de Potato-Dextrose-Ágar, da marca Merck, foram adicionados 39 g do concentrado para 1 L de água destilada. A solução também foi submetida a fervura e então autoclavada, a 120°C por 20 minutos.

4.3 METODOLOGIAS TESTADAS PARA O ISOLAMENTO DO PATÓGENO

Foram testadas duas metodologias para o isolamento do patógeno e diferentes meios de cultura. Os dois métodos básicos de isolamento que são, o método indireto e o método direto, e os meios de cultura BDA, V8 e grãos de sorgo.

4.3.1 ISOLAMENTO INDIRETO

No isolamento indireto, faz-se a transferência para o meio de cultura, de porções infectadas de tecido do hospedeiro.

Foi realizada a assepsia das folhas coletadas utilizando álcool 70%, por um período de 30 segundos, e hipoclorito de sódio nas concentrações de 2; 3 e 4%, com duração variando entre 5 e 10 minutos.

O isolamento indireto foi realizado na câmara de fluxo de ar unidirecional, devidamente esterilizada com álcool 70% e com lâmpadas germicidas por um período de 30 minutos, e com o auxílio de um bisturi previamente flambado. A partir de folhas oriundas do campo, foram retirados fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² contendo esporos do fungo. Esses fragmentos foram transferidos, de forma aleatória, para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar). Após a inoculação, as placas foram devidamente fechadas com Parafilm, para impedir a entrada de microrganismos presente no meio ambiente, e então acondicionadas nos germinadores, à temperatura de 25°C, por um período de três dias, quando foi realizada a primeira avaliação.

4.3.2 ISOLAMENTO DIRETO

O isolamento direto consiste na remoção de estruturas do patógeno, como esporos ou hifas, com auxílio de uma agulha, e posterior transferência para uma placa de Petri contendo meio de cultura.

Para esse processo, foram retiradas folhas de plantas instaladas no telado da estação experimental que continham uma quantidade satisfatória de esporos e boas

condições sanitárias. Após a coleta, as folhas foram levadas para o laboratório de fitopatologia.

Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, uma agulha asséptica e uma lamparina, na câmara de fluxo de ar, os esporos da folha foram retirados e inoculados em uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Nesse momento, a inoculação é feita em três pontos equidistantes da placa. Esse método é utilizado para aumentar as probabilidades de se obter uma cultura limpa, uma vez que, quanto menos pontos inoculados, menores são as chances de se desenvolver fungos indesejáveis, e caso contenham fungos oportunistas ou bactérias, a limpeza da placa é facilitada, seja através da retirada dos microrganismos indesejáveis ou através da transferência do isolado de *Ramularia areola* para outra placa. Após a inoculação, as placas são devidamente fechadas com Parafilm, identificadas e acondicionadas nos germinadores, por um período de aproximadamente 30 dias.

Transcorrido os 30 dias necessários para o crescimento da cultura, as placas que se encontraram totalmente livres de contaminações, foram submetidas a um processo de repicagem. Nesse processo, dessas placas contendo culturas limpas, foram retirados os esporos e transferidos para outra placa contendo o meio de cultura BDA. Nesse segundo momento, foram inoculados vários pontos na placa, com o objetivo de se obter uma maior superfície específica contendo esporos, uma vez que, o crescimento desse fungo é muito lento e bastante limitado. Após a repicagem, as placas foram devidamente fechadas e acondicionadas nos germinadores. As placas foram mantidas à temperatura de 25°C e com fotoperíodo de 12 horas.



4.3.3 INCUBAÇÃO EM GRÃOS DE SORGO

A partir de um protocolo vindo dos Estados Unidos, foi testada a possibilidade de multiplicar *Ramularia areola* utilizando grãos de sorgo como fonte de energia, já que se trata de um cereal com elevados índices de lipídeos em sua constituição.

Foi colocado 1 Kg de sorgo em um saco plástico resistente a altas temperaturas, para que fosse realizada a assepsia dos grãos. Para esse procedimento, foram realizados três ciclos de autoclavagem, à temperatura de 121°C e com tempo de esterilização de 20 minutos. Após realizado o processo de esterilização, o saco contendo os grãos foi mantido em repouso, dentro do germinador, por 24 horas, para que fosse retirada a umidade do seu interior, evitando assim o crescimento de bactérias. Todo processo de inoculação é realizado no interior da câmara de fluxo de ar unidirecional, após ter sido devidamente limpa com álcool 70%.

Quando os grãos de sorgo encontram-se totalmente secos, em uma placa contendo o fungo desejado, é feito um corte em forma de cruz para retirar o patógeno da placa. Posteriormente, o mesmo é transferido para o interior do saco contendo o sorgo. Depois de inoculado, os dois componentes, sorgo e meio de cultura, devem ser homogeneizado para que todos os grãos contenham esporos do patógeno. O excesso de ar no interior do saco foi removido e o mesmo lacrado com grampos e fita adesiva. Os

sacos contendo os grãos de sorgo e os esporos do patógeno desejado foram acondicionados nos germinadores, por um período de 20 dias.

4.4 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA REPICAGEM DO INÓCULO

4.4.1 FRAGMENTOS DO MEIO DE CULTURA CONTENDO ESPOROS DO PATÓGENO

Nesse processo, a repicagem é feita a partir da transferência de fragmentos de meio de cultura contendo esporos para outra placa com meio de cultura.

Esse procedimento foi realizado na câmara de fluxo de ar, com o auxílio de um bisturi e uma espátula. Após detectar uma porção jovem e esporulante da colônia, aproximadamente 0,5 cm² dessa cultura foi retirado juntamente com o meio de cultura que o nutre e transferido para outra placa contendo o meio de cultura BDA. Em seguida, as placas foram fechadas de forma adequada e preservadas nos germinadores, à temperatura de 25°C.

4.4.2 SUSPENSÃO CONTENDO CONÍDIOS DO PATÓGENO

Nesse método, realizou-se a repicagem a partir de uma solução contendo esporos em suspensão que são transferidos para outra placa contendo meio de cultura.

Na câmara de fluxo, adicionou-se, às placas contendo a cultura, 10 mL de água destilada e autoclavada, e com o auxílio de um pincel os esporos foram retirados. Uma pipeta foi utilizada para promover a sucção da solução, água e esporos, e transferi-la para a outra placa contendo meio de cultura BDA. Após esse processo, as placas foram devidamente fechadas com Parafilm, armazenadas nos germinadores e mantidas também a 25°C.

4.4.3 TRANSFERÊNCIA SOMENTE DOS ESPOROS PARA OUTRA PLACA CONTENDO MEIO DE CULTURA

Nesse processo, retirou-se somente os esporos da colônia pura e inoculados em outra placa contendo meio de cultura.

Com o auxílio da lupa e de uma agulha, na câmara de fluxo, os esporos foram retirados da colônia e transferidos para outra placa com meio de cultura BDA. Nesse método, foram inoculados vários pontos de forma aleatória, com o intuito de aumentar a área contendo esporos em uma placa. Após inoculadas, as placas foram fechadas e mantidas nos germinadores, sob temperatura de 25°C até que a cultura atingisse o tamanho adequado, aproximadamente 1 cm².

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REGIÃO DA PLANTA EM QUE AS FOLHAS FORAM COLETADAS

As folhas do baixeiro possuem uma grande quantidade de esporos, no entanto, apresentam partículas de solo aderidas a elas, com isso o risco de haver contaminação no momento da inoculação é eminente. Já as folhas que estão na parte apical da planta não apresentam quantidades relevantes de resíduos de solo, contudo não possuem uma quantidade de esporos adequada para realizar o isolamento. Diante disso, as folhas foram coletadas do terço mediano da planta, uma vez que, apresentam melhores condições sanitárias quando comparadas as folhas do baixeiro e uma quantidade satisfatória de esporos, quando são comparadas com as folhas da parte superior da planta.

5.2 MEIO DE CULTURA ADEQUADO PARA O ISOLAMENTO, MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DO INÓCULO

Após realizado alguns experimentos, pudemos verificar que, conseguimos uma eficiente esporulação do fungo, caso colocássemos as placas de Petri, contendo a colônia, sob temperatura de 40°C e umidade relativa de aproximadamente 100%, por um período de dois dias.

A esporulação do fungo ocorreu após o mesmo ser submetido a condições de estresse, uma vez que, foi exposto a uma temperatura muito superior a adequada ao seu desenvolvimento.

Com isso, foi constatado que, podemos utilizar somente o meio de cultura BDA, tanto para o crescimento micelial como para a esporulação, uma vez que, se trata de um meio de cultura mais prático e principalmente, mais barato.

5.3 METODOLOGIAS TESTADAS PARA O ISOLAMENTO DO PATÓGENO

5.3.1 ISOLAMENTO INDIRETO

O isolamento indireto resultou no aparecimento de um alto índice de agentes contaminantes, sendo eles, fungos oportunistas e bactérias.

Em relação a assepsia, verificou-se que, as concentrações de 2 e 3% de hipoclorito de sódio não foram suficientes para eliminar os agentes patogênicos e à concentração de 4% além dos microrganismos oportunistas, o fungo desejado (*R. areola*) também foi eliminado. Dessa forma, optou-se por não realizar a assepsia antes de proceder com o isolamento indireto.

Aproximadamente dois dias após a inoculação de partes do tecido foliar, foi observado um rápido crescimento dos agentes contaminantes oportunistas. A taxa de crescimento desses fungos é muito superior ao crescimento da *R. areola*, com isso foi detectado uma supressão no crescimento do patógeno em questão. Além da referida inibição na taxa de crescimento da *Ramularia areola*, a distinção da morfologia de ambos patógenos se tornou bastante dificultada, com isso, a transferência das estruturas do fungo desejado sem que os microrganismos oportunistas fossem concomitantemente transferidos, tornou-se impossibilitada.

O principal fator para a ocorrência dessa grande quantidade de patógenos indesejados, foi devido, principalmente, a deterioração dos fragmentos do tecido foliar contendo os esporos de *Ramularia areola*, utilizados como inóculo.

Devido aos impedimentos mencionados, o referido método foi considerado ineficiente.

5.3.2 ISOLAMENTO DIRETO

Após realizada as duas metodologias descritas anteriormente, isolamento indireto e a utilização de grãos de sorgo como fonte de energia, foi avaliado o isolamento direto.

Os resultados positivos com a utilização desse método foram observados após 35 dias, quando obtivemos placas com o fungo *Ramularia areola* livres de outros patógenos contaminantes e com tamanho satisfatório para proceder com a repicagem, (aproximadamente 0,5 cm²).



Tal procedimento possibilitou, também, o desenvolvimento de um protocolo, nomeado SOP, que permite aos usuários do sistema da empresa Monsanto, o direcionamento para posteriores pesquisas com esse patógeno. A elaboração desse documento é de grande importância para que haja economia de tempo e investimentos com eventuais trabalhos nessa área, uma vez que, todos os procedimentos para o isolamento, multiplicação, manutenção e conservação desse patógeno estão ali de forma bastante pormenorizada.

5.3.3 INCUBAÇÃO EM GRÃOS DE SORGO

Os grãos de sorgo utilizado como fonte de energia também resultaram em altos níveis de contaminação.

Mesmo após a submissão a rigorosos métodos de assepsia, houve um rápido desenvolvimento de agentes contaminantes nos grãos de sorgo. Apesar do repouso de 24 horas após cada ciclo de autoclavagem, ocorreu a contaminação, provavelmente foi devido à umidade presente no interior dos sacos autoclavados, o que pode facilitar a proliferação de bactérias.

Com isso, por exclusão dos processos que poderiam levar a tais resultados, pôde-se concluir que a contaminação foi oriunda da umidade ainda persistente no interior dos grãos, levando assim a uma rápida proliferação de bactérias e, posteriormente, o desenvolvimento de uma ampla variedade de espécies fúngicas.

Portanto, apesar dessa metodologia, teoricamente, retornar bons resultados referentes ao volume do patógeno, devido aos fatos mencionados, esse procedimento também foi considerado ineficiente.

5.4 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A REPICAGEM DO INÓCULO

5.2.1 FRAGMENTOS DO MEIO DE CULTURA CONTENDO ESPOROS DO PATÓGENO

Após 24 horas, observou-se ao executar o procedimento, a presença de bactérias.

A manifestação de tais contaminações se deu por bactérias presentes no ar.

Devido à área específica do meio de cultura contendo os esporos ser grande, o contato entre a superfície da porção transplantada com o ar se torna considerável e assim, mais propensa a transferir os agentes contaminantes para a placa a ser inoculada, mesmo com o uso de antibióticos. Uma alternativa seria acidificar o meio de cultura.

5.2.2 SUSPENSÃO CONTENDO CONÍDIOS DO PATÓGENO

Esse procedimento, é considerado o mais prático e rápido método de repicagem, uma vez que, a quantidade de solução contendo esporos obtida em cada placa, é suficiente para inocular cerca de 7 placas de Petri.

No entanto, quando foi realizado essa metodologia, os resultados, tanto de crescimento quanto de níveis de contaminação, foram nulos. Ou seja, não houve nenhum tipo de crescimento micelial.

A hipótese mais relevante para esse comportamento, é a falta de oxigenação nas placas durante a realização do método. Provavelmente, após adicionar a água destilada às placas, o excessivo tempo gasto para a retirada dos esporos causou a morte dos conídios devido a ausência de oxigênio. Para tal processo, faz-se necessário manter a oxigenação de forma artificial nas placas ou reduzir drasticamente o tempo gasto para se retirar os conídios.

5.2.3 TRANSFERÊNCIA SOMENTE DOS ESPOROS PARA OUTRA PLACA CONTENDO MEIO DE CULTURA

Utilizando essa metodologia para realizar a repicagem do fungo, foram obtidos resultados positivos em relação ao satisfatório desenvolvimento do fungo, assim como a obtenção de baixos níveis de agentes contaminantes presentes nas culturas.

A colônia em questão apresentou um diâmetro satisfatório em um tempo considerado normal, tendo em vista o seu lento crescimento. Devido ao diminuto tamanho do esporo, ao ser transplantado o mesmo não agrega agentes contaminantes presente no ambiente, como por exemplo, bactérias, a sua estrutura. Com isso, respeitando os processos de assepsia, os índices de contaminação nas placas foram baixos.

5.5 MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DO INÓCULO

Após o isolamento do fungo, faz-se necessário, manter um cronograma de repicagens para que o isolado não seja deteriorado pelos ácaros. Além disso, entre os problemas da manutenção, destaca-se o envelhecimento das culturas, que normalmente acarreta perda de vigor dos conidióforos e diminuição da esporulação provocado pelo empobrecimento do meio de cultura e/ou acúmulo de metabólitos excretados durante o desenvolvimento do microrganismo no substrato (APARECIDO et al., 2007).



Apesar da necessidade de realizar periódicas repicagens, essa prática resulta em problemas tais como perda da viabilidade, mudanças morfológicas e fisiológicas (aspecto e coloração das culturas), decréscimo e/ou perda da capacidade de esporulação e, posteriormente, na maioria dos casos na perda da patogenicidade dos isolados (BUENO et al., 2006; MEYER et al., 2006; VECHIATO et al., 2003; IGNOFFO et al., 1982). Por isso, ao repicar o fungo, deve-se transferir apenas porções jovens e esporulantes da colônia.

Na prática essas alterações que ocorrem nos isolados são decorrentes da constante manipulação exigida devido ao método de conservação que exigem repicagens sucessivas (APARECIDO et al., 2007). Uma forma bastante eficiente encontrada para a conservar o inóculo, foi mantê-lo em óleo mineral e acondicionado no refrigerador. Dessa forma, o isolado paraliza o seu desenvolvimento e reduz, a níveis quase nulos, o seu metabolismo, mantendo-se viável por um período superior a um ano, o que é um período muito longo, quando comparado com as outras formas de conservação do inóculo.



5.6 VIABILIDADE E PATOGENICIDADE DO INÓCULO

No entanto, para que pudesse ser realizado a correta identificação do patógeno e suas estruturas, o mesmo foi enviado para o Laboratório de Fitopatologia da Monsanto, em Saint Louis, onde foram realizados testes morfológicos e comprovada a identidade e patogenicidade do fungo em questão.

6. CONCLUSÃO

O local de coleta das folhas, na planta, é um fator determinante para o sucesso do procedimento, levando em consideração os aspectos sanitários da folha e a quantidade de esporos disponíveis na mesma.

A utilização do método direto de isolamento, assim como a assepsia do ambiente é fundamental para que se obtenha uma cultura limpa, e pura.

A forma adequada de manutenção e conservação do inóculo é de grande importância para que se tenha o patógeno sempre disponível e virulento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, P.M.C.; CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. Controle químico de doenças em algodão no Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 262, 1999 (Abstract).

APARECIDO, C.C.; HUANG, C.T.M.; PASSADOR, M.M.; FINATTI, D.; FIGUEIREDO, M.B. Avaliação da viabilidade de culturas fúngicas preservadas pelos métodos de Castellani (água destilada) e liofilização. **O Biológico**, v. 69, n. 1, p. 5-8, 2007.

BUENO, C.J.; AMBROSIO, M.M.Q; SOUZA, N.L. Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 42-50, 2006.

CHITARRA, L.G. **Controle da mancha de ramulária (*Ramularia areola*) do algodoeiro**. 2011.

IGNOFFO, C.M.; McINTOSH, A.H.; GARCIA, C.; KROHA, M.; JONSON, J.M. Effects of successive *in vitro* and *in vivo* passages on the virulence of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Entomophaga**, v. 27, n. 4, p. 371-378, 1982.

LUCENA, V.S.; Caracterização da resistência do algodoeiro a *Ramularia areola* e variabilidade molecular do patógeno. UFRN, Natal, 2007.

MEIRA, S.A.; CHITARRA, L.G.; MENEZES, V.L. **Controle Químico da Mancha de Ramulária do Algodoeiro, causada por *Ramularia areola*, em função da idade da planta e severidade da doença**. Campina Grande: Embrapa Algodão. 16p. 2005.

MENTEN, J. O. M.; MARQUES. Influência do inóculo, meio de cultura e regime de luz no desenvolvimento micelial e esporulação de *Micosphaerella fragariae* (Tul.) Lind. (*Ramularia tulasnei* Sacc.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, p. 63-71, 1979.

MEYER, M.C.; SILVA, J.C.D.A.; MAIA, G.L.; BUENO, C.J.; SOUZA, N.L. Mancha de irotécio em algodoeiro causada por *Myrothecium roridum*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 390-393, 2006.

PAIVA, F. A. Doenças. In: **ALGODÃO: tecnologia de produção**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Campina Grande: Embrapa Algodão. p. 245-266. 2001.

PRADE, A.G.; FORNAROLLI, D.A.; LIZZI, D.S. et al. Controle químico da mancha de ramulária em algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.413, 2000 (Abstract).

SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W.N.; FERREIRA, A.C.B. **Manejo da Mancha de Ramulária em Algodoeiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. Disponível em: < <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/276751/1/COMTEC272.pdf>> Acesso em: abril de 2013.

SUASSUNA, N.D.; IAMAMOTO, M.M. Controle químico da mancha de ramulária do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, V., 2005, Salvador. **Algodão, uma fibra natural - Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005.

UTIAMADA, C.M.; LOPES, J.C.; SATO, L.N.; ROIM, F.L.B.; KAJIHARA, L.; OCCHIENA, E.M. Controle químico da ramulária (*Ramularia areola*) e ferrugem (*Phakopsora gossypii*) na cultura do algodoeiro. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 4., 2003, Goiânia **Algodão, um mercado em evolução – Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003.

VECHIATO, M.H.; MARINGONI, A.C.; MARTINS, E.M.F.; KOHARA, E.Y. Caracterização de isolados de *Diaporthe* spp. e *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 2, p. 159-167, 2003.