

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE AGRONOMIA
AGR 99003 - ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO SUPERVISIONADO**

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

Aline Dutra Freitas

00141711

**FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
LABORATÓRIO DE FITOPATOLOGIA**



PORTO ALEGRE, Abril de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE AGRONOMIA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO
SUPERVISIONADO

ALINE DUTRA FREITAS
00141711

Supervisor de campo do Estágio: Andréia Mara Rotta Oliveira
Orientador Acadêmico do Estágio: Simone Mundstock Jahnke

COMISSÃO DE AVALIAÇÃO

Profa. Beatriz Maria Fedrizzi (Departamento de Horticultura e Silvicultura)
Prof. Carlos Ricardo Trein (Departamento de Solos)
Prof. Fábio Kessler Dal Soglio (Departamento de Fitossanidade)
Profa. Lúcia Brandão Franke (Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia)
Profa. Mari Lourdes Bernardi (Departamento de Zootecnia)
Profa. Renata Pereira da Cruz (Departamento de Plantas de Lavoura)

PORTO ALEGRE, Abril de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família por ter conseguido passar com êxito por mais uma etapa da graduação. Meu pai, minha mãe, meu filho e meus irmãos e minha cunhada, por todo apoio e credibilidade, pois sem eles nada seria possível.

Especial a minha mãe e meu pai que estiverem comigo integralmente nessa luta, aliviando muitas vezes meu cansaço e sempre com atitudes e palavras de incentivo, abdicaram de muitas coisas para que fosse possível o término dessa etapa.

Todo percurso percorrido, todo esforço feito, tudo com o apoio deles, que em todos os momentos estavam ali, me apoiando e acreditando e tornando as coisas mais fáceis para eu poder continuar a minha luta.

A minha estimada Orientadora Dra. Andréia Mara, por toda a compreensão e aprendizado, por toda paciência e credibilidade.

RESUMO

Este relatório consiste na descrição das informações referentes à realização do estágio supervisionado da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, realizado na FEPAGRO - Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Laboratório de Fitopatologia, localizada em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, tendo a orientação da pesquisadora Dra. Andréia Mara Rotta de Oliveira. A instituição escolhida foi criada em 1994, é uma fundação pública vinculada à Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária e Agronegócio.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia, com diversas atividades, com ênfase no isolamento de fitopatógenos de diversas culturas e na seleção de antagonistas para o controle biológico de *Fusarium guttiforme*, em abacaxi, totalizando 300 horas de estágio nos meses de novembro a janeiro de 2014/15.

LISTA DE TABELAS

1. Tipos de meio de cultura.....	24
2. Amostras de <i>F. guttiforme</i> preservados.....	28
3. Medidas de crescimento radial do fungo <i>Fusarium guttiforme</i>.....	30

LISTA DE FIGURAS

1. Preservação de amostras de <i>Fusarium guttiforme</i>	16
2. Esquema de distribuição do fungo (centro) e as bactérias do solo (laterais)....	17
3. Folhas de Goiabeira Serrana com sintomas de Antracnose.....	18
4. Caule de Feijão com micélio.....	19
5. Pimentão com micélio do fungo <i>Fusarium sp</i>	19
6. Folhas de tomate com sintomas de fusariose (amostra 040).....	20
7. Folha de Tomate com sintomas de septoriose (amostra 041).....	20
8. Folhas de Tomate com sintomas de fusariose (amostra 042).....	21
9. Folhas de Tomate com sintomas de fusariose (amostra 043).....	21
10. Folhas de Tomate com sintomas de septoriose (amostra 044).....	22
11. Folhas de Tomate com sintomas de fusariose (amostra 045).....	22
12. Folhas de Morangueiro com micélio de oídio/míldio	23
13. Partes do rebento do Abacaxi – crescimento do micélio do fungo	26
14. Esporos de <i>Fusarium guttiforme</i> -micronídios	27
15. Crescimento das bactérias antagonistas em comparação com o crescimento do fungo patogênico	29
16. Crescimento das bactérias antagonistas em comparação com o crescimento do fungo patogênico	29
17. Crescimento das bactérias antagonistas em comparação com o crescimento do fungo patogênico	30
18. Esporos de <i>Alternaria alternata</i>	32
19. Esporos de <i>Fusarium sp</i> (amostra 043 em meio cultura Mathur).....	33
20. Esporos de <i>Fusarium sp</i> (amostra 043 em meio cultura BDA+AL).....	33
21. Banco de imagens LF-Fepagro- Esporos de <i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	34
22. Crescimento micelial em meio de cultura BDA+AL.....	35
23. Estruturas de bactérias GRAM-POSITIVA	36
24. Crescimento do fungo <i>Sclerotium rolfsii</i>	37
25. Crescimento em colônia pura de <i>Sclerotium rolfsii</i>	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. CARACTERIZAÇÃO DO MEIO FÍSICO E SOCIOECONÔMICO DA REGIÃO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO.....	2
3. CARACTERIZAÇÃO DA FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- FEPAGRO	3
4. REFERENCIAL TEÓRICO	4
4.1 FITOPATOLOGIA.....	4
4.1.1 <i>Meio de Cultura:</i>	4
4.1.2 <i>Isolamento de patógenos de plantas</i>	5
4.1.3 <i>Preservação de Microorganismo</i>	5
4.1.4 <i>Controle Biológico</i>	5
4.2 ESPÉCIES DE PLANTAS ESTUDADAS.....	6
4.2.1 <i>Abacaxi (Ananas comosus)</i>	6
4.2.2 <i>Lichia (Litchi chinensis)</i>	10
4.2.3 <i>Goiabeira serrana (Acca sellowiana)</i>	10
4.2.4 <i>Uva (Vitis vinifera)</i>	10
4.2.5 <i>Manga (Mangifera indica)</i>	11
4.2.6 <i>Pitangueira (Eugenia uniflora)</i>	11
4.2.7 <i>Feijão (Phaseolus vulgaris)</i>	12
4.2.8 <i>Pimentão (Capsicum annum)</i>	12
4.2.9 <i>Morango (Fragaria vesca)</i>	12
4.2.10 <i>Tomateiro (Solanum lycopersicum)</i>	13
4.2.11 <i>Melância(Citrullus lanatus)</i>	14
5. ATIVIDADES REALIZADAS	14
5.1 METODOLOGIAS PARA ISOLAMENTO, PRESERVAÇÃO E TESTE IN VITRO DE PATÓGENOS DE ABACAXIZEIRO (ANANAS COMOSUS)	14
5.1.1 <i>Isolamento</i>	14
5.1.2 <i>Preservação</i>	15
5.1.3 <i>Testes in vitro para controle biológico de Fusarium guttiforme</i>	16
5.2 OUTRAS ATIVIDADES	17
5.2.1 <i>Isolamento e preservação de fitopatógenos</i>	17
5.2.2 <i>Meios de Cultura</i>	23
6. RESULTADOS	25
6.1 ISOLAMENTO E PRESERVAÇÃO DE FUSARIUM GUTTIFORME	25
6.2 TESTES IN VITRO PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE FUSARIUM GUTTIFORME.....	28
6.3 OUTRAS ATIVIDADES.....	32
6.3.1 <i>Morango</i>	32

6.3.2	<i>Pimentão</i>	33
6.3.3	<i>Tomate</i>	33
6.3.4	<i>Lichia</i>	34
6.3.5	<i>Manga</i>	35
6.3.6	<i>Melancia</i>	36
6.3.7	<i>Pitangueira</i>	37
6.3.8	<i>Uva</i>	37
6.3.9	<i>Feijão</i>	38
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
8.	ANÁLISE CRÍTICA	39
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	411
10.	APÊNDICE	48

1. INTRODUÇÃO

O Laboratório de Fitopatologia da Fepagro localiza-se em Porto Alegre-RS, conta com uma estrutura que possibilita o isolamento, a multiplicação, inoculação de fungos e bactérias de interesse agrícola e preservação, visando à identificação de fitopatógenos e a seleção de microrganismos antagonistas para o controle biológico. Possui equipamentos para o diagnóstico e caracterização de fitopatógenos por métodos moleculares, como termociclador, sistema de foto documentação, centrífugas, cubas para eletroforese, entre outros.

É muito importante dispor de recursos para desenvolver pesquisas sobre doenças de plantas. Os estudos de doenças de plantas levam em consideração diversas variáveis, do meio ambiente e da própria planta. O desenvolvimento e rendimento das plantas dependem de nutrientes, água no solo e manutenção de certos limites de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz. Portanto, qualquer elemento que afete o seu desenvolvimento pode ocasionar perdas e reduzir sua utilidade para o homem. Outros fatores também ocasionam perdas como às doenças que tem como seu agente causal os fitopatógenos.

Segundo a EMBRAPA (2011), doenças de planta são desordens fisiológicas ou anormalidades estruturais deletérias às plantas ou para alguma de suas partes ou produtos.

Os agentes de natureza infecciosa incluem fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus e viróides, nematóides, protozoários e plantas parasitas superiores. Esses patógenos causam uma série de danos e para controlá-los utiliza-se, em grande escala, produtos químicos. Entretanto, seus efeitos prejudiciais têm impulsionado a redução de seu uso e a adoção de métodos menos agressivos. O controle biológico vem como uma possível solução para a diminuição do uso desses agroquímicos, pois baseia-se em métodos ambientalmente corretos e que podem fazer parte de um controle integrado de doenças.

Controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos”, ou seja, a diminuição do crescimento, infectividade e virulência do patógeno por meio de agentes biológicos apatogênicos e com potencial para interferir em processos vitais do causador da doença, chamados de antagonistas dos patógenos. É principalmente utilizado para aumentar a resistência do hospedeiro e garantir um tempo de vida mais longo,

controlando de forma menos agressiva o ambiente e com menos problemas que o controle químico (MICHEREFF, 2001).

2. CARACTERIZAÇÃO DO MEIO FÍSICO E SOCIOECONÔMICO DA REGIÃO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Porto Alegre está inserida na região fisiográfica da depressão central é a capital do estado do Rio Grande do Sul. Possui uma área de aproximadamente 476 km², circundada por morros, possui planícies e é limitada pela orla fluvial do lago Guaíba (WIKIPÉDIA).

Faz divisa de município ao norte com os municípios de Triunfo, Nova Santa Rita, Canoas e Cachoeirinha; ao sul com Viamão e Lago Guaíba (Barra do Ribeiro); ao leste com Alvorada e Viamão e a oeste com o lago Guaíba (Eldorado do Sul, Guaíba e Barra do Ribeiro). Possui uma população de 1 467 823 habitantes, segundo o IBGE (2013) é a décima cidade mais populosa do Brasil.

3. CARACTERIZAÇÃO DA FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- FEPAGRO

A Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro), criada em 1994, é uma fundação pública vinculada à Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária e Agronegócio. Contudo, os trabalhos de pesquisa tiveram início em 1919, época da criação da Estação de Seleção de Sementes de Alfredo Chaves, hoje Veranópolis.

Atualmente, a fundação dispõe de centros de pesquisa localizados em 19 municípios do Rio Grande do Sul, estando presente em suas diversas regiões fisiográficas. Conta com laboratórios na sede, em Porto Alegre, e na Fepagro Saúde Animal, em Eldorado do Sul, além de outros no Interior.

O Laboratório de fitopatologia localiza-se na sede em Porto Alegre, que dispõe de equipamentos básicos como autoclaves, câmara de fluxo laminar, microscópios, lupas, estufas bacteriológicas e para incubação tipo BOD, possibilitando a diagnose, isolamento, multiplicação, inoculação de fungos e bactérias de interesse agrícola. Além disso, possui equipamentos para o diagnóstico e caracterização de fitopatógenos por métodos moleculares, como termociclador, sistema de foto documentação, centrífugas, cubas para eletroforese, entre outros.

Para experimentos com plantas, o laboratório dispõe de câmaras de crescimento em condições controladas (tipo Fitotron), campo experimental e estruturas de casa de vegetação, localizadas no município de Viamão.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Fitopatologia

Fitopatologia é uma palavra de origem grega (phyton = planta, pathos = doença e logos = estudo) é a ciência que estuda as doenças de plantas, abrangendo todos os seus aspectos, desde a diagnose, sintomatologia, etiologia, epidemiologia, até o seu controle.

Doença é o mau funcionamento de células e tecidos do hospedeiro, no caso a planta, que resulta da sua irritação contínua por um agente patogênico ou fator ambiental e que conduz ao desenvolvimento de sintomas. Este mau funcionamento pode resultar em dano parcial ou morte da planta ou de suas partes. As alterações podem ser provocadas por agentes bióticos, por patógenos ou parasitas, e abióticas, por deficiência nutricional e hídrica, por exemplo. (BERGAMIN FILHO et al.,1995).

A determinação de um agente causal de doenças é feita através de certos procedimentos, os Postulados de Koch, que auxiliam na correta diagnose.

Os Postulados de Koch são efetuados em quatro etapas: o microorganismo deve estar presente nas lesões das plantas doentes (associação constante); o microorganismo deve ser isolado e cultivado em cultura pura; o microorganismo isolado deve reproduzir os sintomas quando inoculado em uma planta sadia; o microorganismo deve ser reisolado da planta inoculada artificialmente e corresponder, em todas as suas características, com o isolado das lesões (MICHEREFF, 2001).

4.1.1 Meio de Cultura:

É o material nutriente preparado para o crescimento de micro-organismos em um laboratório. Para sustentar o crescimento microbiano (bactérias, fungos, algas, parasitas), um meio deve fornecer uma fonte de energia, permitindo a nutrição fora do seu ambiente natural. (TORTORA et al., 2012).

No entanto, há uma grande diversidade de necessidades nutricionais e ambientais entre os microorganismos e por isso é que só compreendendo as suas necessidades que se consegue ter sucesso na cultura de microorganismos no laboratório. (MICROBIOLOGIA MÉDICA, 2006/2007).

4.1.2 Isolamento de patógenos de plantas

A identificação do agente causal se inicia com o isolamento a partir de tecidos da planta doente. O isolamento pode ser: direto, onde a estrutura do patógeno é visualizada na planta hospedeira em lupa e transferida para meio de cultura; ou indireto, que consiste no corte de partes lesionadas do hospedeiro, desinfestação superficial e transferência deste material ao meio de cultura (ALFENAS et al., 2007).

4.1.3 Preservação de Microorganismo

Coleções de culturas são centros de conservação que tem a função de coletar organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, tornando-os disponíveis para usuários interessados. A maneira mais eficiente de conservar microrganismos de importância econômica é a preservação em coleções. A preservação e manutenção das culturas devem ser feitas de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, conservando características genéticas e propriedades morfo/fisiológicas (ABREU & TUTUNJI, 2004).

4.1.4 Controle Biológico

Controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos”, ou seja, a diminuição do crescimento, infectividade e virulência do patógeno por meio de agentes biológicos apatogênicos e com potencial para interferir em processos vitais do causador da doença, chamados de antagonistas dos patógenos. É principalmente utilizado para aumentar a resistência do hospedeiro e garantir um tempo de vida mais longo, controlando de forma menos agressiva ao ambiente e com menos problemas que o controle químico (MICHEREFF, 2001).

A utilização intensiva de agrotóxicos pode ser altamente impactante para o meio ambiente. Os agrotóxicos ocasionam desequilíbrio biológico do sistema, com eliminação de

inimigos naturais e competidores dos fitopatógenos. Além disso, são responsáveis ainda pela ressurgência de doenças e pelo aparecimento de novas doenças (CAMPANHOLA *et al.*, 1998).

4.2 Espécies de plantas estudadas

4.2.1 Abacaxi (*Ananas comosus*)

Segundo a maioria dos naturalistas e historiadores, o abacaxi é originário da América tropical e subtropical e, muito provavelmente, do Brasil (MEDINA *et al.*, 1978). Há indícios que sua domesticação ocorreu muitos séculos anteriores à era pré-colombiana (SIMÃO, 1998). Sua dispersão pelos vários países americanos iniciou com o intercâmbio entre tribos; contudo, com o descobrimento da América, se tornou conhecido mundialmente, quando foi levado para a Europa, Ásia e África e se disseminou pelos vários países rapidamente (CTENAS & QUAST, 2000).

O abacaxizeiro é uma planta monocotiledônea, herbácea perene, de caule grosso e curto, cujas folhas crescem ao seu redor, em forma de calhas com inserção de raízes axilares. Seu sistema radicular é fasciculado, fibroso e superficial, sendo encontrado na maioria das vezes de zero a 30 centímetros da superfície do solo. O gênero *Ananas* diferencia-se dos outros da família Bromeliaceae por apresentarem um fruto do tipo sincarpo, formado pela coalescência de frutos individualmente soldados uns aos outros, enquanto nos outros gêneros os frutos continuam livres (REINHARDT *et al.*, 2000).

A espécie produz brotações (mudas), que podem ser nomeadas da seguinte forma: coroa, filhote, filhote-rebento, rebento-lateral e rebento enraizado ou rebentão (MANICA, 2000). O abacaxi é um fruto composto, formado de 100 a 200 frutinhos, que se unem após a fecundação. Esses frutinhos podem ser de cor vermelha, laranja, amarela, verde e se juntam ao redor de um eixo central, que possui comprimento entre 30 e 60 cm, formando uma infrutescência do tipo sorose (LORENZI; MATOS, 2008).

As variedades mais plantadas no Brasil são Smooth cayenne e Pérola. O ciclo de cultivo do abacaxi pode ser dividido em três fases, sendo a primeira vegetativa, a segunda reprodutiva e a última propagativa (LIMA *et al.*, 2002).

Reinhardt (2007) descreve as três fases. Em conformidade com esse autor, a fase vegetativa se resume ao estabelecimento da cultura após o plantio, ocorrendo o enraizamento e o crescimento vegetativo (folhas), durando de 8 a 12 meses. A fase reprodutiva compreende a emissão do pendão floral, fecundação de todas as flores e formação do fruto, podendo durar de 13 até 18 meses. A fase propagativa se inicia com a emissão e a formação das mudas (REINHARDT, 2007).

A abacaxicultura é uma atividade muito importante para a economia brasileira. Dados divulgados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2008), evidenciam que o Brasil ocupa a primeira posição na produção mundial de abacaxi, mesmo apresentando uma produtividade 30 t/ha, abaixo da média de 50 t/ha, alcançada por outros países. Entre os estados brasileiros com maior produção, destacam-se Paraíba, Minas Gerais, Pará, Bahia, São Paulo e Espírito Santo (IBGE, 2010). Entretanto, segundo Aquije *et al.* (2010), a produção de abacaxi no Brasil enfrenta sérios problemas fitossanitários, o que tem ocasionado perdas econômicas e limitado a exportação desse produto. Entre as doenças de maior importância para a cultura do abacaxizeiro, destaca-se a fusariose.

As plantas de abacaxi estavam com sintomas de fusariose e foram coletadas nos municípios de Terra de Areia e Maquiné no Rio Grande do Sul. O município de Terra de Areia é considerado a capital do abacaxi do estado, embora sua área de produção esteja diminuindo ano a ano. Em 2007, a área produtiva chegou a 343 hectares. Em 2015, parou em 260. A quantidade de produtores também vem caindo. Há quatro anos, eram 130. Hoje, sem renovação da mão de obra, eles não passam de 90. Cada hectare produz, em média, 21 toneladas por ano.

O cultivo do abacaxi “Terra de Areia” tem origem com a chegada de mudas da variedade Pérola. A variedade Pérola possui hábito de crescimento ereto, folhas com espinhos e pedúnculo longo. Os frutos têm forma cônica, a poupa é branca, suculenta e pouca ácida. Têm boas características organolépticas, sendo os mais apreciados para o consumo *in natura*, porém sendo menos adequados para a indústria. Contudo, o abacaxi “Terra de Areia” diferencia-se do “Pérola” por apresentar um fruto de formato menor, por seu sabor doce e aromático e por possuir uma coroa pequena (SANTIN E PINHEIRO, 2009). Não é possível precisar, entretanto, se tais características são resultado de uma adaptação ao meio, quantas e/ou quais características foram/são influenciadas por condições de solo e clima, forma de

cultivo, e, por fim, se houve variabilidade genética passível de diferenciar essa variedade daquela original, qual seja “Pérola” (FEPAGRO, comunicação pessoal).

Fusariose:

As plantas coletadas estavam com sintomas característicos da doença causada pela Fusariose que possui como agente etiológico o fungo *Fusarium guttiforme*. É considerada a doença mais importante para o cultivo do abacaxi no país (VENTURA & ZAMBOLIM, 2002). Causa danos de alta intensidade (cerca de 80%) nos frutos (BORRÁS *et al.*, 2001). Em mudas causa perdas de 20% e 30% nas plantas.

O gênero *Fusarium* possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em quase todos os ambientes. O fungo *F. guttiforme* pertence à família Tuberculariaceae (KIMATI *et al.*, 2005). Conforme Ventura & Zambolim (2002), o fungo causador da Fusariose do abacaxi possui especificidade no gênero *Ananas*. Isso havia sido comprovado por Ventura (1993), que, após inocular mudas de abacaxizeiro da cv. Pérola, com diferentes isolados da espécie, atestou que apenas os oriundos de abacaxi tiveram a patogenicidade comprovada.

Apesar de não produzir clamidósporos, pode permanecer no ambiente em folhas de abacaxizeiro na forma epífita (KIMATI *et al.*, 2005). Segundo estudos realizados por Alves (2006), a sobrevivência do *F. guttiforme* no solo pode variar, conforme a porcentagem de matéria orgânica existente, contudo esse fungo não permanece por mais de quatro meses no solo sem que haja um hospedeiro.

O patógeno é capaz de infectar todas as partes da planta. Em frutos verdes observa-se exsudação de goma na sua superfície. Com a evolução da doença os frutos se tornam deformados. No estágio final, podem ser parcialmente ou totalmente afetados, perdem a rigidez e mumificam, podendo ocorrer crescimento rosado do fungo nos tecidos mais externos.

No talo, as lesões normalmente restringem-se à parte basal, tanto em plantas adultas como em mudas aderidas à planta-mãe. Em mudas, a exsudação gomosa normalmente é menos pronunciada; em plantas, adultas as lesões sempre são acompanhadas de podridão gomosa (BERGAMIN FILHO *et al.*, 1995).

Manejo da Doença

Matos e Cabral (2005) sugerem um manejo integrado para o controle da doença, que deve iniciar pela aquisição de mudas saudáveis e, se possível, a utilização de material resistente juntamente, se necessário, controle biológico através de microorganismos antagonistas.

Estudos realizados por alguns pesquisadores evidenciaram que o uso constante de fungicidas sistêmicos, como benomyl, induziu a ocorrência de populações de *F. guttiforme* resistentes a esse grupo de produtos químicos (SANTOS *et al.*, 2002).

A utilização intensiva de agrotóxicos pode ser altamente impactante para o meio ambiente. Os agrotóxicos ocasionam desequilíbrio biológico do sistema, com eliminação de inimigos naturais e competidores dos fitopatógenos. Além disso, são responsáveis ainda pela ressurgência de doenças e pelo aparecimento de novas doenças (CAMPANHOLA *et al.*, 1998).

Devido a isso, pesquisa na área do controle biológico vem ganhando força como uma alternativa ao uso indiscriminado de produtos químicos.

4.2.2 Lichia (*Litchi chinensis*)

O consumo e a produção de lichia estão crescendo nos últimos anos. Apesar de cultivada no país desde a década de 70, a lichia pode ser considerada uma fruta exótica para os brasileiros, devido à limitada produção nacional, oriunda de pequenas áreas, além de apresentar pouca divulgação científica (MOTTA, 2009).

As plantas foram coletadas no Município de Maquiné-RS, e estavam com sintomas característicos de Antracnose. A antracnose afeta principalmente os frutos, sendo possível encontrar o patógeno infectando folhas, flores e ramos, porém sem ocasionar danos à cultura.

Sintomas em folhas são caracterizados por manchas necróticas de coloração escura, com bordos definidos e formatos irregulares (BERGAMIN FILHO et al., 1997).

4.2.3 Goiabeira serrana (*Acca sellowiana*)

É uma frutífera pertencente à família das mirtáceas. Cultivada em muitos países do mundo, *Acca sellowiana* é nativa do sul do Brasil e Uruguai, havendo um primeiro registro de ocorrência natural na Argentina, sul da província das Missões, bacia dos Rios Paraná e Paraguai (KELLER & TRESSSENS, 2007).

As plantas coletadas vieram do município de Maquiné-RS e estavam com sintomas característicos de antracnose. Os sintomas nas folhas e frutos são característicos por apresentarem áreas de formato mais ou menos circulares e de coloração escura. Nos frutos, onde os sintomas são mais severos, pode-se observar o surgimento de pequenas machas circulares de coloração marrom que aumentam de tamanho e tornam-se deprimidas (BERGAMIN FILHO et al., 1997).

4.2.4 Uva (*Vitis vinifera*)

É uma trepadeira da família das vitáceas, com o tronco retorcido, ramos flexíveis, folhas grandes e repartidas em cinco lóbulos pontiagudos, flores esverdeadas em ramos. Originária da Ásia, a videira é cultivada em todas as regiões de clima temperado.

Quando cultivada em condições climáticas favoráveis (elevada umidade e temperaturas amenas) ao desenvolvimento de fungos, está sujeita a uma série de doenças, as quais poderão acarretar graves prejuízos se não forem devidamente controladas (EMBRAPA, 2003). As plantas recebidas no Laboratório de Fitopatologia foram coletadas no município de Canoas-RS.

4.2.5 Manga (*Mangifera indica*)

A mangueira é uma árvore frutífera da família Anacardiaceae, nativa do sul e do sudeste asiáticos. Foi introduzida com sucesso no Brasil, em Angola, em Moçambique e em outros países tropicais. A mangueira cresce e desenvolve-se em diferentes condições climáticas, mas o plantio de áreas comerciais somente é viável dentro de valores bem definidos de temperatura, precipitação, altitude, insolação e umidade relativa. É uma árvore frutífera de clima tropical e o cultivo está, principalmente, concentrado nas regiões tropicais (25°N, 25°S) e subtropicais (35°N, 35°S) do planeta. No país, a mangueira é cultivada em todas as regiões do Brasil, no entanto, o sudeste e o nordeste respondem juntos por 97% da produção nacional (AGRIANUAL, 2008). As plantas foram coletadas no município de Maquiné-RS.

4.2.6 Pitangueira (*Eugenia uniflora*)

É uma mirtácea perene, de porte arbóreo, que possui inflorescências racemosas com flores pediceladas inseridas nas axilas foliares (ANGELY, 1965; ROMAGNOLO E SOUZA, 2006; SILVA E PINHEIRO, 2007)

No Brasil não há registros de microorganismos responsáveis por doenças de importância econômica atacando a pitangueira (BEZERRA et al., 2000). De acordo com Morton (1987), na Flórida foram registrados casos de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), podridão-das-raízes (*Rhizoctonia solani*) e manchas foliares causadas por *Cercospora eugeniae*, *Helminthosporium sp.* e *Phyllostica eugeniae*.

Os materiais foram trazidos do município de Eldorado do Sul-RS e chegaram com sintomas característicos de Antracnose.

4.2.7 Feijão (*Phaseolus vulgaris*)

Cultivado por pequenos e grandes produtores, em diversificados sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, o feijoeiro comum reveste-se de grande importância econômica e social. Dependendo da cultivar e da temperatura ambiente, pode apresentar ciclos variando de 65 a 100 dias, o que o torna uma cultura apropriada para compor, desde sistemas agrícolas intensivos irrigados, altamente tecnificados, até aqueles com baixo uso tecnológico, principalmente de subsistência (EMBRAPA, 2003).

O material coletado foi trazido do município de Viamão- RS e estava com micélio em várias partes das plantas.

4.2.8 Pimentão (*Capsicum annuum*)

O pimentão é uma olerícola da família Solanácea, sendo originário da região tropical da América. Está entre as dez hortaliças mais importantes cultivadas no Brasil, difundido principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, sendo os frutos de coloração verde e vermelha, os mais aceitos pelos consumidores (FONSECA, 1986; BLAT-MARCHIZELI et al., 2003; FILGUEIRA, 2007).

As plantas foram coletadas no município de Caxias do Sul, e estavam com grande quantidade de micélio na parte de dentro dos frutos.

4.2.9 Morango (*Fragaria vesca*)

O morangueiro é uma planta herbácea estolonífera, perene, com caule semi-subterrâneo, conhecido como coroa (caule modificado). O morangueiro possui estolões ou caules que se desenvolvem a partir das gemas basais das folhas, crescem sobre a superfície do solo e têm a capacidade de emitir raízes e dar origem a novas plantas (EMBRAPA, 2006).

No Brasil, sua produção é mais significativa nos meses de junho a dezembro, e requer boa umidificação do solo. Por este motivo, ácaros e pulgões são suas principais pragas. A fase

vegetativa do ciclo do morangueiro inclui a formação de estolões, a emissão de folhas e a formação de coroas secundárias, e a fase reprodutiva abrange a indução floral, iniciação e surgimento das flores, crescimento e maturação dos frutos (DARROW, 1966). As plantas foram coletadas no município de Caxias do Sul e trazidas para o Laboratório de Fitopatologia.

4.2.10 Tomateiro (*Solanum lycopersicum*)

O tomateiro é uma planta anual, herbácea, de caule redondo, piloso e macio quando jovem, torna-se fibroso e anguloso com o passar do tempo. As folhas são alternadas, de forma oval a oblonga, compostas de 11 a 32 cm de comprimento. A flor é hermafrodita, com cleistogamia, caracterizando uma espécie autógama em que preferencialmente realizam a autofecundação acima de 95%, embora possa ocorrer uma pequena taxa de polinização cruzada, dependente da população de insetos polinizadores, intensidade do vento, temperatura e umidade do ar. As flores ocorrem em cachos, que podem ser simples ou compostos; são pequenas e amarelas, com pétalas lanceoladas e largas. Os frutos são bagas carnosas, suculentas, com tamanho e peso diferenciado conforme a cultivar, e se caracteriza por ser bilocular, trilocular ou plurilocular (EMBRAPA, 2006; FILGUEIRA, 2008).

A cultura do tomateiro é caracterizada por dois hábitos de crescimentos distintos: determinado e indeterminado (EMBRAPA, 2006). No Brasil, frutos de tomateiro de hábito de crescimento determinado têm sido utilizados, comumente, na indústria. Porém, em épocas de carência de oferta o tomate para fins industriais é também utilizado para consumo fresco, embora em pequena escala.

As plantas coletadas eram da variedade Paron e Pitanga e vieram do município de Caxias do Sul-RS. Estavam com vários sintomas, alguns deles característicos de espécies de fungos do gênero *Alternaria sp* e *Fusarium sp* e manchas causadas por bactérias patogênicas.

4.2.11 Melância (*Citrullus lanatus*)

É uma planta anual, herbácea, de hábito de crescimento rasteiro, com ramificações sarmentosas e pubescentes. O caule é constituído de ramos primários e secundários, que podem assumir disposição radial — ramo de tamanho similar, partindo da base da planta, ou axial, um ramo mais longo com derivações opostas e alternadas a cada nó. A melancia é monóica — flores masculinas e femininas separadas —, mas também ocorrem plantas andromonoicas (flores masculinas e hermafroditas) ou ginandromonoicas — flores masculinas, femininas e hermafroditas (EMBRAPA, 2010).

As sementes de melancia recebidas no Laboratório de Fitopatologia foram oriundas do município de Viamão- RS.

5. ATIVIDADES REALIZADAS

Preparo de meios de cultura, organização, limpeza e esterilização de materiais, bem como organização geral do laboratório. Auxílio aos projetos dos colegas do laboratório, isolamento, identificação e preservação de fungos e bactérias fitopatogênicos, condução de experimentos para a seleção de bactérias com potencial antagonista a fitopatogênico, auxílio na organização de um banco de imagens para identificação de fungos e bactérias fitopatogênicas, revisões bibliográficas e organização de banco de dados e entrada de materiais.

5.1 Metodologias para isolamento, preservação e teste in vitro de patógenos de abacaxizeiro (*Ananas comosus*)

5.1.1 Isolamento

As plantas de abacaxi com sintomas de fusariose foram levadas ao Laboratório de Fitopatologia onde realizou-se o isolamento do patógeno.

Na borda do tecido lesionado, retiraram-se fragmentos, os quais foram imersos em solução de álcool a 70%, por 30 segundos, seguidos de imersão em solução de hipoclorito de

sódio 2%, por 30 segundos e por último em água destilada e autoclavada por mais trinta segundos para ocorrer a desinfestação. Após ter eliminado o excesso de umidade, os fragmentos foram colocados em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA+ AL (Batata, Dextrose, Ágar e ácido láctico que é um inibidor ao crescimento de bactérias) e incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por oito dias. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas. Após o desenvolvimento de colônias típicas de *Fusarium sp*, essas foram transferidas para placas de Petri contendo meio BDA mais ácido láctico e SNA e cultivadas nas condições descritas anteriormente para obter a colônia pura.

Após o crescimento das colônias foram feitas lâminas para microscopia, das quais foram selecionadas as amostras que tiveram esporulação. Estas apresentaram estruturas de frutificação características de *Fusarium guttiforme*. Nos próximos meses, para a confirmação da identidade do patógeno, será realizado o seqüenciamento das amostras por empresa especializada. As amostras que apresentaram esporulação foram preservadas.

5.1.2 Preservação

A preservação das amostras que obtiveram esporulação do fungo *Fusarium guttiforme* (Figura 1) foi feita através da utilização de dois métodos, frascos de vidro com discos de papel filtro e eppendorfs com glicerol 35%. A preservação serviu para manter o fungo viável para pesquisas posteriores.

No primeiro método adicionou-se 1ml de água destilada e autoclavada em eppendorf e em seguida foram inseridas partes do patógeno que foram retirados por meio de raspagem do micélio formando uma suspensão no microtubo. Após agitou-se em vórtex para homogeneizar, então foi pipetado para o frasco de vidro com discos de papel, identificado e armazenado a temperatura ambiente.

No segundo método foi pipetado 1 ml de glicerol em eppendorf e logo após acrescidas partes do patógeno que foram retiradas das placas de Petri por raspagem e suspensos no meio líquido. Agitados em vórtex para homogeneização e, então, foram identificados e armazenados.

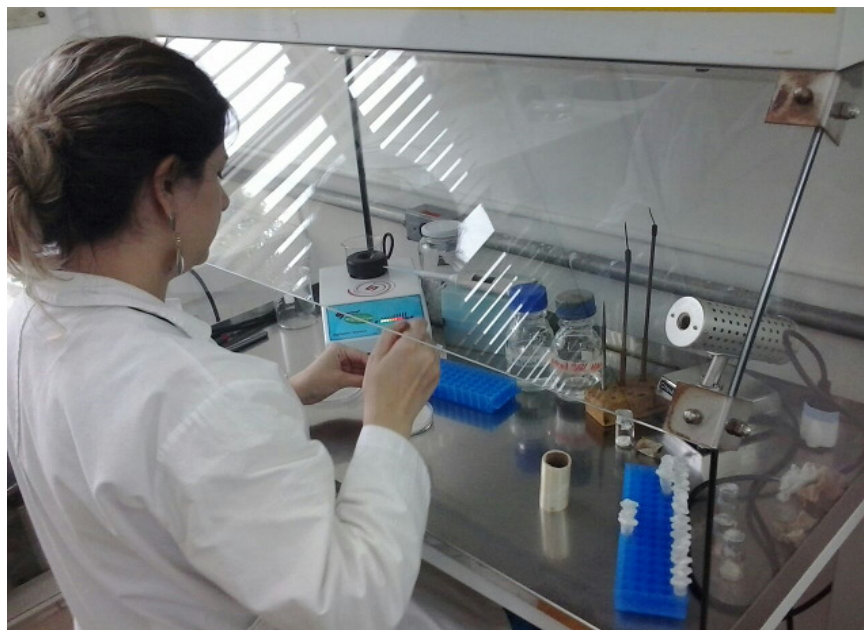


Figura 1- Preservação de amostras de *Fusarium guttiforme*.
Fonte: Milena Zambiasi (2014).

5.1.3 Testes *in vitro* para controle biológico de *Fusarium guttiforme*

Foram utilizados 80 isolados de bactérias do solo da cultura do abacaxi, provenientes da coleção do Laboratório de Fitopatologia da Fepagro. A seleção das bactérias controladoras foi através de testes de antagonismo *in vitro*, frente ao patógeno *Fusarium guttiforme*.

Iniciou-se os testes com a recuperação do fungo *F. guttiforme*, retirado da coleção de preservação do Laboratório de Fitopatologia, em meio de cultura do tipo Kado, para observar como o patógeno iria se desenvolver nesse tipo de meio. Após cinco dias, verificou-se um ótimo crescimento e esporulação do patógeno. Foram, então, recuperadas as 80 amostras de bactérias do solo em meio Kado, juntamente com o fungo seguindo a metodologia anteriormente citada.

Para a realização do teste de antagonismo *in vitro* foram utilizados, quatro isolados bacterianos diferentes por placa, contendo meio de cultura Kado. As bactérias foram dispostas

na forma de uma estria, eqüidistantes e nas extremidades das placas. No centro, foi colocado um disco de 0,5 cm de diâmetro, contendo a cultura de *F. guttiforme*.

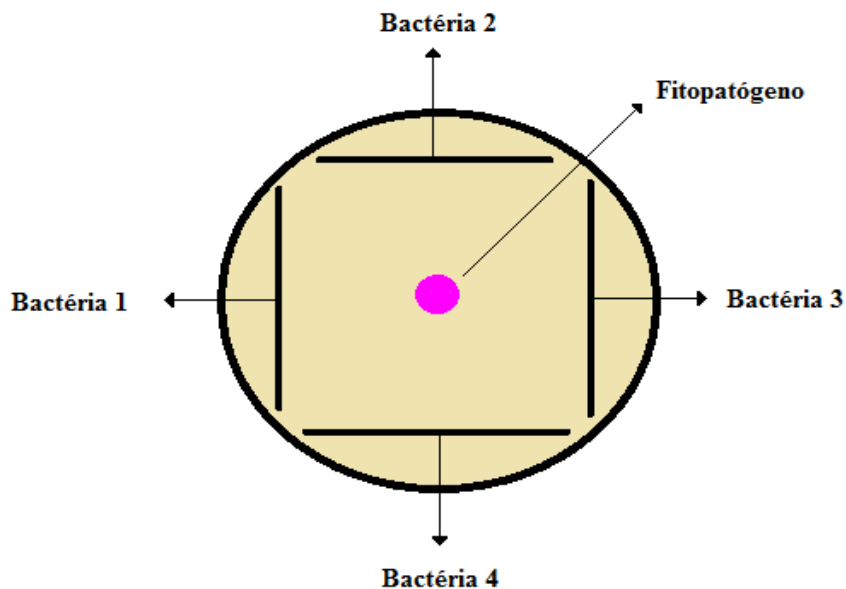


Figura 2- Esquema de distribuição do fungo (centro) e as bactérias do solo (laterais).

Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).

Uma placa contendo um disco de 0,5 cm com micélio de *F. guttiforme*, sem a presença de qualquer isolado, foi a testemunha que serviu de tratamento controle para estimar quanto tempo o micélio levou para ocupar toda a placa. O período de tempo necessário para que o micélio do patógeno tomasse toda a superfície da placa contendo o meio de cultura, serviu de parâmetro para indicar o momento de avaliar a inibição, a qual foi avaliada separando as amostra que, visualmente, controlaram o fungo e medindo a distância percorrida pelas bactérias, diminuindo do crescimento do patógeno e do disco de micélio inicial.

5.2 Outras Atividades

5.2.1 Isolamento e preservação de fitopatógenos

No período de estágio culturas como tomate (Figuras 6-10), lichia, goiabeira serrana (Figura 3), pimentão (Figura 5), morangueiro (Figura 12), feijoeiro (Figura 4), manga,

pitangueira foram encaminhadas para isolamento de fitopatógenos, referente a outros projetos de pesquisa com estas culturas na instituição. Os isolados obtidos tiveram por finalidade compor a coleção de fitopatógenos da instituição, para serem utilizados em experimentos de controle biológico.



Figura 3. Folhas de Goiabeira Serrana com sintomas de Antracnose.

Fonte: Aline Dutra Freitas (2014).



Figura 4. Caule de feijão com micélio de *Sclerotium rolfsii*

Fonte: Aline Dutra Freitas (2014).



Figura 5. Pimentão com micélio do fungo *Fusarium sp.*
Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).



Figura 6- Folhas de tomate fusariose (amostra 040)
Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).



Figura 7. Folha de Tomate com sintomas de Septoriose (amostra 041).
Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).



Fugira 8. Folhas de Tomate com sintomas de fusariose (Amostra 042).
Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).



Figura 9. Folhas de tomate com sintomas de mancha de alternaria (amostra 043).
Fonte: Aline Dutra Freitas (2015)



Figura 10. Folhas de tomate Septoriose (Amostra 044).
Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).



Figura 11. Folha de tomate Fusariose (Amostra 045).

Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).

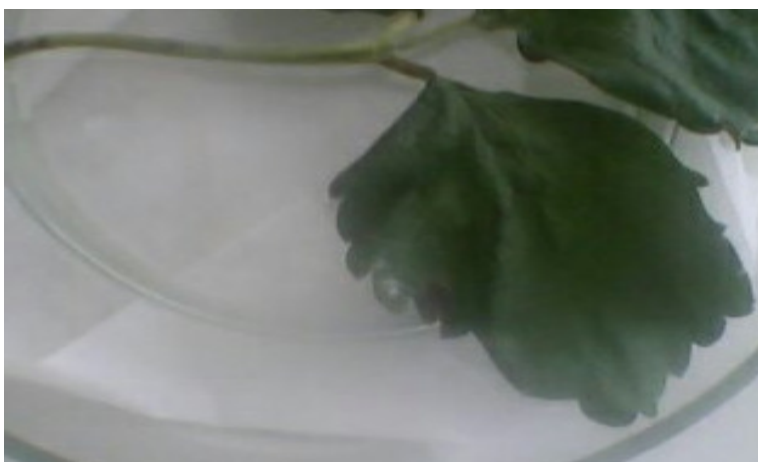


Figura 12. Folha de Morangueiro com micélio de oídio/míldio.

Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).

Das amostras de plantas recebidas no laboratório foram retiradas partes das lesões, feita a assepsia com imersão em solução de álcool a 70%, por 30 segundos, seguidos de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2%, por 30 segundos e por último em água destilada e autoclavada por mais trinta segundos.

Após ter eliminado o excesso de umidade, os fragmentos foram colocados em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA+ AL para as amostras com suspeita do agente causal ser um fungo e BDA para as amostras com suspeita do agente ser bactéria e incubados a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por oito dias. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas. Após o desenvolvimento de colônias foram transferidas para placas de Petri contendo meio específico para cada patógeno observado e cultivado nas condições descritas anteriormente para se obter colônia pura e assim proceder à preservação.

5.2.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura trabalhados no laboratório foram BDA, BDA+AL, SNA, MATHUR, KADO sólido e líquido, LB, KING B, V8, KELMAN, CENOURA, CCDEL, CZAPEK (Tabela 1).

Tabela 1- Tipos de meios de cultura

Meios de Cultura	Constituintes	Quantidade
BDA	PDA	39 g
	H ₂ O destilada	1000 ml
BDA+AL	PDA	39 g
	H ₂ O destilada	1000 ml
	Ácido láctico	0.3 ml
MATHUR	Peptona bacteriological	2g
	Dextrose	2.8g
	MgSO ₄	1.73g
	K ₂ PO ₄	2.72g

	Ágar	20g
	H ₂ O destilada	1000ml
KADO líquido	Sacarose	10g
	Caseína	8g
	Extrato de Levedura	4g
	K ₂ PO ₄	2g
	MgSO ₄	0.3g
	H ₂ O destilada	1000ml
KADO(sólido)	Sacarose	10g
	Caseína	8g
	Extrato de Levedura	4g
	K ₂ PO ₄	2g
	MgSO ₄	0.3g
	H ₂ O destilada	1000ml
	Ágar	18g
LB líquido	Triptona	1g
	Extrato de levedura	0.5g
	H ₂ O destilada	100ml
KING B	Peptona protease	10g
	K ₂ HPO ₄	1.5g
	Glicerol ²	10g
	Ágar	17g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5g
	H ₂ O destilada	1000ml
KELMAN	Peptona	10g
	Caseína hidrolisada	1g
	Glucose	5g
	Ágar	18g
	2,3,5-cloreto de trifenil tetrazólio ³	0,005g
	H ₂ O destilada	1000ml
V8	Suco ou extrato de tomate V8	200ml
	CaCO ₃	3g
	Ágar	18g

	H ₂ O destilada	1000ml
CENOURA	Cenoura cozida	200g
	Ágar	15g
	H ₂ O destilada	1000ml
CCDEL	Extrato de Levedura	10g
	Dextrose ¹	20g
	CaCO ₃	20g
	Ágar	12g
	H ₂ O destilada	1000ml
CZAPEK	Sacarose	30g
	Nitrato de sódio	2g
	Fosfato dipotássico	1g
	Sulfato de magnésio	0.5g
	Cloreto de potássio	0.5g
	Sulfato ferroso	0.01g
	Ágar	15g
	H ₂ O destilada	1000ml

¹ Dextrose: é autoclavada separado.

² Glicerol: Coloca-se por último e aquece por 10 s antes de colocar no meio.

³ 2,3,5-cloreto de trifenil tetrazólio: Diluir em 1ml de água destilada e esterilizar por filtração-seringa e colocar no meio antes de verter nas placas de Petri. São 250µL em 250ml de meio de cultura.

Fonte: Laboratório de Fitopatologia-FEPAGRO

6. RESULTADOS

6.1 Isolamento e preservação de *Fusarium guttiforme*

Após oito dias de crescimento em meio de cultura BDA+AL, os patógenos demonstraram bastante crescimento (Figura 13).



Figura 13. Crescimento do micélio do fungo em BDA+AL após oito dias de incubação.

Fonte: Aline Dutra Freitas (2014).

As repicagens, para se obter colônia pura, foram feitas em meio SNA e BDA+AL, e apresentaram crescimento satisfatório após os oito dias de incubação. Após foram feitas lâminas para a confirmação da esporulação do patógeno e reconhecimento do tipo de esporos (Figura 14).



Figura 14. Esporos de *Fusarium guttiforme*- micronídios.

Fonte: Aline Dutra Freitas (2014).

As seleções foram feitas através dos resultados da visualização nas lâminas em microscópio e, então, separou-se as amostras que seriam preservadas.

Na Tabela 2 estão todos os isolados selecionados das amostras cultivadas em meio de cultura.

Tabela 2. Amostras de *F. guttiforme* preservados

AMOSTRA	Tipo de Microorganismos	Data da Preservação
004.1(BDA+AL,SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
004.2(BDA+AL,SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
004.3(BDA+AL,SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
004.5(BDA+AL,SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
007.1(BDA+AL,SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
007.2(BDA+AL,SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
007.3(BDA+AL,SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
007.4(BDA+AL,SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
007.5(BDA+AL,SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
009.1-1(SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
009.1-2(SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
009.2-1(SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
009.2-2(SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
010.1-2(SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
010.2-1(SNA, KADO)	Fusarium guttiforme	17/12/2014 / 27/01/2015
010.2-2(SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
010.2-3(SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
010.3-1(SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
010.3-2(SNA)	Fusarium guttiforme	17/12/2014
Amostras tiradas de plantas de Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>) da localidade de Terra de Areia-RS e Maquiné- RS.		

6.2 Testes in vitro para controle biológico de *Fusarium guttiforme*

As 80 amostras de bactérias retiradas da coleção do laboratório de fitopatologia foram avaliadas visualmente após terem sido repicadas juntamente com o fungo e incubadas por dez dias em BOD. Foram separadas as que visualmente inibiram o crescimento do fungo (Figuras 15-17).



Figura 15- Placa de Petri1 A- Contendo meio de cultura Kado, mostrando crescimento satisfatório das bactérias antagonistas sobre o fungo (ao centro da placa) em comparação com a Placa de Petri B que continha somente o fungo *F. guttiforme*(testemunha).

Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).



Figura 16. Placa de Petri4 A- Contendo meio de cultura Kado, mostrando crescimento satisfatório das bactérias antagonistas sobre o fungo (ao centro da placa) em comparação com a Placa de Petri B que continha somente o fungo *F. guttiforme*(testemunha).

Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).



Figura 17. Placa de Petri 5 A- Contendo meio de cultura Kado, mostrando crescimento satisfatório das bactérias antagonistas sobre o fungo (ao centro da placa) em comparação com a Placa de Petri B que continha somente o fungo *F. guttiforme* (testemunha).

Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).

Após a separação, foi calculada a medida que o fungo *fusarium guttiforme* percorreu na placa de Petri. Esse valor foi diminuído do disco de micélio que serviu como inóculo inicial (Tabela 3).

Tabela 3 – Medidas de crescimento radial do fungo *Fusarium guttiforme* nas Placas de Petri contendo bactérias do solo e meio de cultura Kado.

Placa Petri (Bactérias+Fungo)		Crescimento radial <i>Fusarium guttiforme</i> (cm)
Placa 1	TAA ₂ C ₁₀	2,25
	TAA ₂ C ₁₁	
	TAA ₂ C ₁₃	
	TAA ₂ C ₁₄	
Placa 2	TAA ₂ C ₂₈	6.8
	TAA ₂ C ₃₀	
Placa 3	TAA ₂ C ₁	6.85
Placa 4	TAA ₂ C ₈	5.8
	TAA ₂ C ₉	
Placa 5	TAA ₂ C ₅	4.8
	TAA ₂ C ₆	
Placa 6	TAA ₂ C ₁₅	6.05
	TAA ₂ C ₁₆	
	TAA ₂ C ₁₇	
Placa 7	TAA ₁ C ₁	6.5
	TAA ₂ C ₃₆	
Placa 8	TAA ₂ C ₁₉	4.75
	TAA ₂ C ₂₀	
	TAA ₂ C ₂₁	
	TAA ₂ C ₂₂	
Placa 9	TAA ₂ C ₂₃	6.0
	TAA ₂ C ₂₄	

6.3 Outras atividades

Todos os isolamentos e preservação feitos com as culturas que chegaram ao laboratório de fitopatologia serviram para que, posteriormente, se pudesse fazer estudos direcionados principalmente ao controle biológico, pois o foco do laboratório é a pesquisa.

6.3.1 Morango

O morango chegou com sintomas de oídio/míldio, após ter sido colocado em câmara úmida por sete dias, apresentando estruturas típicas de oídio/míldio. Os isolamentos feitos com partes do fruto deram resultados positivos para *Alternaria alternata*.

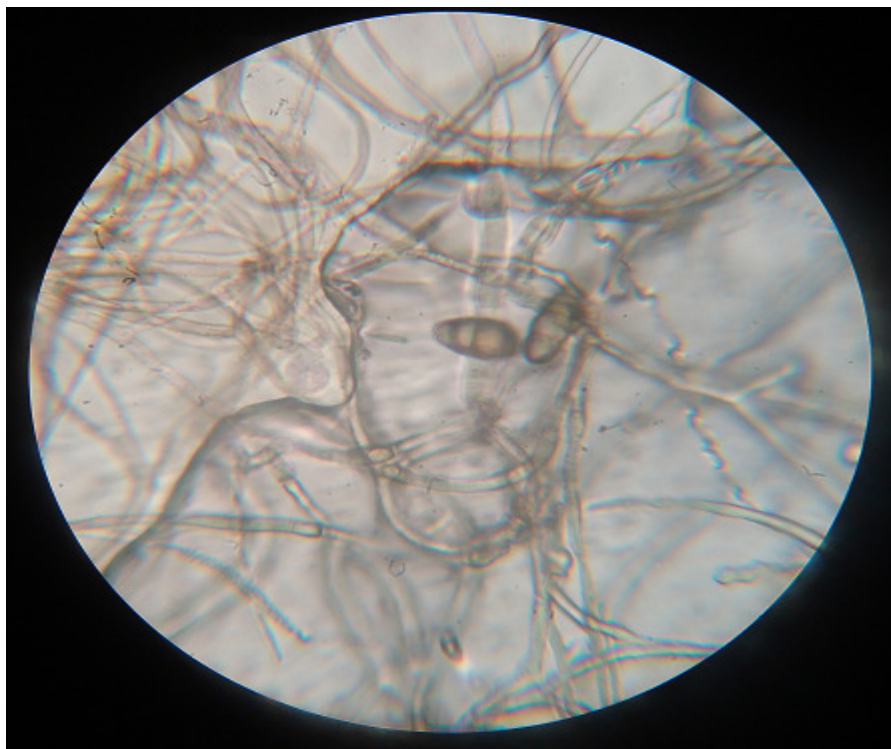


Figura 18. Esporos de *Alternaria alternata*.
Fonte: Aline Dutra Freitas (2015)

6.3.2 Pimentão

As plantas de pimentão apresentavam bastante micélio dentro do fruto, os isolamentos deram como resultados esporos de *Fusarium sp.* Posteriormente serão feitos outros teste para identificar qual a espécie de *Fusarium* se trata.

6.3.3 Tomate

As plantas de tomate quando chegaram ao laboratório de fitopatologia já estavam danificadas e muitas partes já secas. Devido a isto foi mais difícil fazer seus isolamentos. Muitas amostras foram descartadas devido à falta de esporulação do patógeno.



Figura 19- Esporos de *Fusarium sp* (amostra 043 em meio de cultura Mathur).

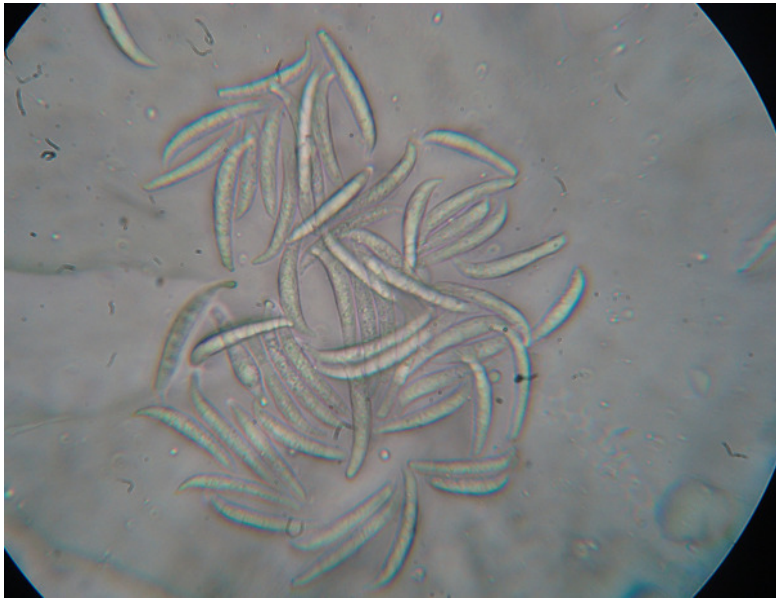


Figura 20. Esporos de *Fusarium sp* (amostra 043 em meio de cultura BDA+AL).
Fonte: Aline Dutra Freitas (2014).

6.3.4 Lichia

As plantas apresentavam sintomas característicos de Antracnose.

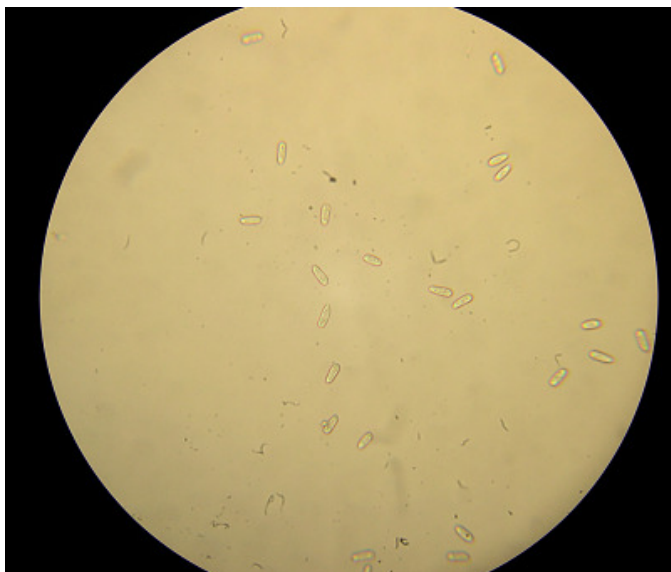


Figura 21. Esporos de *Colletotrichum gloeosporoides*.

Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Fitopatologia da Fepagro.

6.3.5 Manga

Após inúmeras repicagens em diversos meios de cultura, não foi possível preservar nenhum patógeno, pois estes não esporularam.

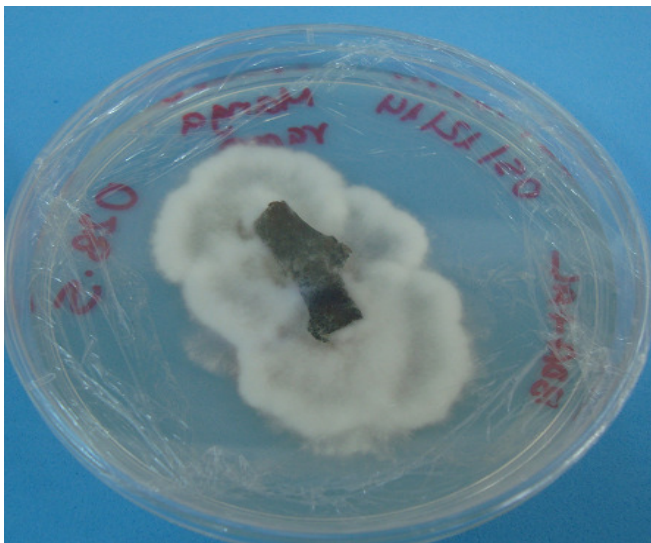


Figura 22. Crescimento do micélio em meio de cultura BDA+AL após oito dias de incubação.
Fonte: Aline Dutra Freitas (2014).

6.3.6 Melancia

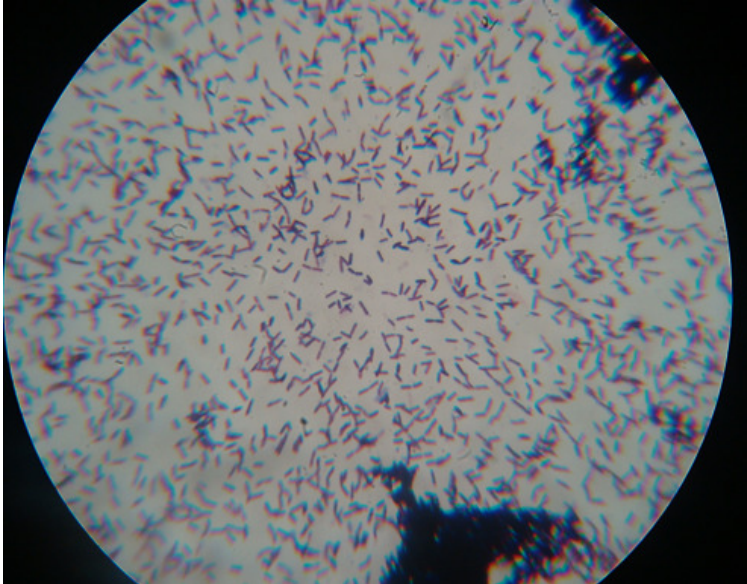


Figura 23- Estruturas de Bactérias GRAM-POSITIVA presentes em sementes da melancia- Bastonetes.

Fonte: Aline Dutra Freitas (2015).

6.3.7 Pitangueira

Após a incubação os patógenos apresentaram bastante crescimento, porém não esporularam.

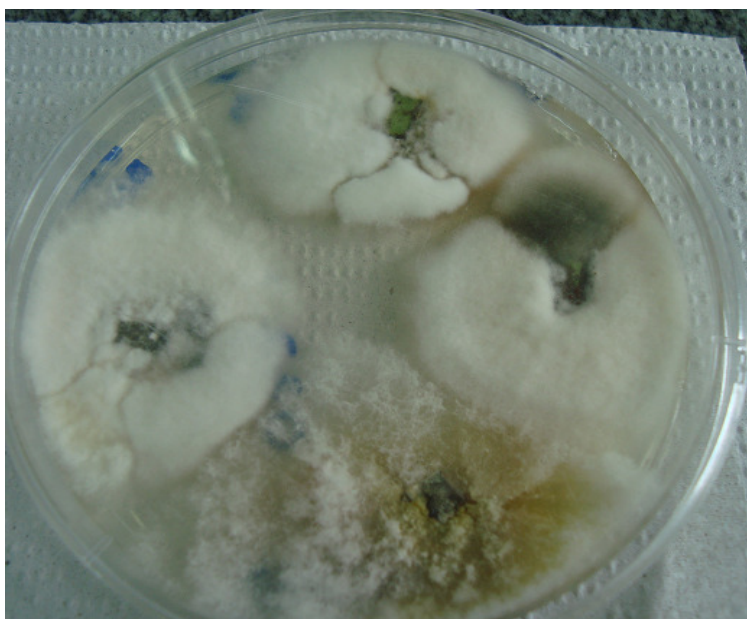


Figura 24. Crescimento após oito dias de incubação.

Fonte: Aline Dutra Freitas (2014).

Foram repicados para BDA+AL, BDA, MATHUR, SNA, V8 e Cenoura e permaneceram sem esporulação.

6.3.8 Uva

As amostras, retiradas do micélio e do pedicelo da planta, isoladas não apresentaram esporulação. Após os oitos dias de incubação, foram feitas repicagens em meio BDA+AL, BDA, MATHUR e permaneceram sem esporulação. Foram descartadas devido a impossibilidade de identificar o agente causal, através dos esporos, e a sua preservação.

6.3.9 Feijão

As plantas chegaram com micélio localizado perto das raízes, após oito dias de incubação em condições ideais para o crescimento do patógeno ele apresentou esporulação.



Figura 25. Crescimento em colônia pura do fungo *Sclerotium rolfsii* após oito dias de incubação.

Fonte: Aline Dutra Freitas (2014).

Após repicagens foram confirmada com *Sclerotinia rolfsii*, e então foram preservadas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A instituição escolhida para fazer o estágio, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária- Fepagro possibilitou-me ampliar os conhecimentos nas áreas de métodos de isolamento, preservação, testes *in vitro* de fitopatógenos de interesse agrícola e outras atividades laboratoriais também. Toda a infraestrutura, disponibilização de materiais para desenvolver os experimentos, flexibilidade de horários, dedicação da orientadora Dra. Andréia Mara, possibilitaram um estágio enriquecedor. Todo embasamento teórico-prático recebido na faculdade pode ser colocado em prática, ajudando, assim, a fixação dos conhecimentos os quais farão muita diferença após a graduação.

8. ANÁLISE CRÍTICA

Os pontos negativos:

Alguns equipamentos poderiam ser melhorados, para facilitar a esterilização dos utensílios, por exemplo. Poderia haver mais agilidade na manutenção dos equipamentos, isso facilitaria a continuidade das pesquisas.

No Laboratório, a Dra Andréia não possui funcionários em quantidade satisfatória para o desenvolvimento das pesquisas, devido a um corte no orçamento.

A falta de conhecimentos sobre a importância das pesquisas na área de fitopatologia acarreta na falta de incentivos para os projetos, interrompendo, assim, estudos que podem servir como base para grandes melhorias ao agricultor e ao meio ambiente.

Se a instituição tiver acesso a recursos financeiros será possível levar adiante projetos de grande importância, como as pesquisas sobre controle biológico.

Se a área total de produção de Abacaxi em Terra de Areia diminuiu drasticamente nos últimos anos, faz considerar quais os principais motivos. A doença causada pelo *Fusarium guttiforme*, que pode ocasionar a perda de até 80% nos frutos, e a falta de mão de obra são os principais fatores que agravaram a diminuição da área plantada.

Eu sei, como estudante de Agronomia que a dificuldade para implementar técnicas, que, muitas vezes, são a longo prazo é difícil.

Pontos Positivos:

Ter a oportunidade de estagiar em um local que forneça quase todas as ferramentas necessárias para elaboração dos experimentos é muito positivo. Na Fepagro tive acesso a infraestrutura adequada, disponibilidade de materiais, flexibilidade de horários, dedicação por parte da orientadora, colegas de trabalho que foram vitais nas atividades laboratoriais e assim tornou-se possível aprender e absorver todo o conhecimento necessário.

As pesquisas realizadas até o final do estágio irão continuar, para assim possa ser apurado quais espécies de bactérias tem potencial antagonista. Quando a pesquisa chegar ao fim, se for comprovado a eficiência do método ela será repassada para o agricultor, o que resultará numa diminuição quase total de alguns tipos de fungicidas, como os recomendados para o controle preventivo do *Fusarium guttiforme*.

Para o controle de *F. guttiforme* existe um manejo integrado de práticas, dentre elas cito, a aquisição de mudas saudáveis, evitando a contaminação dentro da lavoura, se possível, variedades resistentes ao patógeno, e controle biológico com microorganismos antagonistas.

Em 2009 foi lançada pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical uma variedade para o Sul do Brasil que é resistente ao fusarium guttiforme, o Ajubá. Ela é um híbrido resultado do cruzamento de “Perolera” com Smooth Cayenne.

Poderia ser estudada a possibilidade de usar essa variedade em áreas com incidência do patógeno em conjunto com o controle biológico.

Acho que as pesquisas devam avançar para que possamos encontrar um meio, através de práticas mais sustentáveis, para produzir satisfatoriamente pensando no conjunto, meio ambiente e homem.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M.M.V., TUTUNJI, V.L. Implantação e manutenção da coleção de cultura de microrganismos do UniCEUB. *Universitas Ciência da Saúde*, v.2, n.2, p. 236-251, 2004.

Disponível em:

<http://publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/viewFile/535/356>.

Acesso em 05 de abril de 2015.

AGRIANUAL 2008: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2008. p. 382.

ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; M (Ed.). *Métodos em fitopatologia*. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 53-90.

ALVES, G. A. R. **Sobrevivência de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* em solos de diferentes procedências e incorporação de matéria orgânica**. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em agronomia, área de concentração Biologia) – Universidade Rural da Amazônia, Belém, 2006

ANGELY, J. *Flora analítica do Paraná*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1965.

AQUIJE, G. M. F. V.; ZORZAL, P. B.; BUSS, D. S.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B.; FERNANDES, A. A. R. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 10, p.1109-1117, 2010.

BERGAMIN FILHO, Armando; KIMATI, Hiroshi; AMORIM, Lilian. *Manual de Fitopatologia: Volume 1 Princípios e Conceitos*. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda., 1995.

BERGAMIN FILHO, Armando; Kimati, Hiroshi; Amorim, Lilian. Manual de Fitopatologia: Volume 2 Doenças das Plantas Cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 1997.

BEZERRA, J.E.F.; SILVA JÚNIOR, J.F. da; LEDERMAN, I.E. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Jaboticabal: FUNEP, 2000. 30p. (FUNEP. Série Frutas Nativas, 1).

BLAT-MARCHIZELI, S. F. B.; YAÑEZ, L. D. T.; COSTA, C. P. P. Deu oídio. Revista Cultivar Hortaliças e Frutas, v. 4, n. 21, p. 10-11, 2003.

BORRÁS, O.; SANTOS, R.; MATOS, A. P.; CABRAL, R. S.; ARZOLA, M. A first attempt to use a *Fusarium subglutinans* culture filtrate for the selection of pineapple cultivars resistant to fusariose disease. **Plant Breeding**, Berlin, v. 120, n. 5, p.435-438, 2001.

CAMPANHOLA, C; BETTIOL, W; RODRIGUES, G. S. Evolução, situação atual, projeção e perspectivas de sucesso de um Programa de racionalização do uso de agrotóxicos no Brasil. In: RACIONALIZACIÓN del uso de pesticidas en el Cono Sur. Montevideo: PROCISUR, 1998. p. 43-49. (Diálogo, n. 50).

CTENAS, M.L.B.; QUAST, D. Abacaxi. In: ____; _____. (Ed.). Frutas das terras brasileiras. São Paulo: C2, 2000. p.41-45.

DARROW, G. M. The strawberry: History, breeding and physiology. New York: Holt, Rinehart and Wiston, 1966. 447 p.

EMBRAPA Hortaliças. Cultivo de tomates para industrialização.2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial2ed/index.htm>. Acesso em 23 de março de 2015.

EMBRAPA – Arroz e Feijão. Cultivo do Feijoeiro Comum. 2003. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro>. Acesso em 23 de março 2015.

EMBRAPA – Produção de sementes de *Arachis pinto* cv BRS Mandobi no Acre. 2011. Disponível em http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amendoim/ProducaoSementesArachisAcre/doencas_mandobi.html

EMBRAPA SEMIÁRIDO, Sistema de Produção de Melancia. 2010. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm>. Acesso em 5 de abril de 2015.

EMBRAPA UVA E VINHO, Uvas Viníferas para Processamento em Regiões de Clima Temperado. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/doenca.htm> . Acesso em 5 de abril de 2015

EMBRAPA UVA E VINHO, Produção de Morangos nos sistema semi- hidropônico. 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MorangoSemiHidroponico/introducao.htm>. Acesso em 05 de abril 2015.

FAO. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The statistics division:** major food and agricultural commoties and producers. Disponível em:

<http://www.fao.org/statistics/en/>

Acesso em: 23 de março, 2015.

FEPAGRO, Institucional. Disponível em:

http://www.fepagro.rs.gov.br/conteudo/5/?Conhe%C3%A7a_a_Fepagro.

Acesso em 08 de março de 2015

FEPAGRO, Comunicação, Saiu na Midia, 2012 Disponível em:

http://www.fepagro.rs.gov.br/conteudo/2910/?16%2F07%2F2012-Campo_e_Lavoura_-_Pesquisadores_buscam_qualificar_produ%C3%A7%C3%A3o_de_abacaxi_no_Litoral_Norte.

Acesso em 05 de março 2015.

FILGUEIRA, F.A.R. (2008). Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ª.ed., Viçosa: Editora UFV. 402p.

FILGUEIRA, F.A. Novo manual de olericultura, agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças, 3 ed, Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007, 421 p.

FONSECA, A. F. A. da. Avaliação do comportamento de cultivares de pimentão (*Capsicum annum L.*) em Rondônia. Porto Velho: EMBRAPA, 1986. 6.p.

IBGE. Cidades, Porto Alegre. Disponível em:

<HTTP://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=431490>. Acesso em 23 de março de 2015.

Acesso em: 23 de março, 2015.

IBGE. Estimativa Populacional. Disponível em:

ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2013/estimativa_2013_dou.pdf

Acesso em: 23 de março, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Dados da safra de abacaxi no Brasil.**

Disponível em

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp>

Acesso em: 23 de março, 2015.

KELLER, H. A.; TRESSENS, S. G. Presencia en Argentina de dos especies de uso múltiple: *Acca sellowiana* (Myrtaceae) y *Casearia lasiophylla* (Flacourtiaceae). *Darwiniana*, San Isidro, v. 45, n. 2, p. 204-212, ago./dez. 2007.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.) **Manual de fitopatologia**: doenças de plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo. Ceres, 2005. v. 2.

LIMA, V. P.; REINHARDT, D. H.; COSTA, J. A. Desbaste de mudas tipo filhote do abacaxi cv. Pérola: 2: análises de crescimento e de correlações. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, SP, v. 24, n. 1, p. 101-107, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

MANICA, I. *Abacaxi: do plantio ao mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2000. 122 p.

MATOS, A. P. DE; CABRAL, J. R. S. *Manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro*. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 2005. 2p. (Embrapa-CNPMF, Abacaxi em Foco n. 32).

MEDINA, J.C. A cultura do abacaxi. In: MEDINA, J.C. et al. *Frutas tropicais 2*. São Paulo: Canton, 1978. p.06-68.

MICHEREFF, Sami J.. *Fundamentos de Fitopatologia*. 2001. UFRPE. Disponível em: <http://www.ccta.ufcg.edu.br/admin.files.action.php?action=download&id=2084>.

Acesso em: 21 jan. 2015.

MICROBIOLOGIA MÉDICA (Aula prática nº 3) - Cultura de microrganismos – necessidades nutritivas. Meios de cultura: composição, preparação, armazenamento, utilização. Técnicas de sementeira. 2006/2007.

MOTTA, E.L. Avaliação da composição nutricional e atividade antioxidante de Litchi chinensis Sonn. (“Lichia”) cultivada no Brasil. 2009. 75f. ANTRACNOSE EM LICHIA (Litchi chinensis) PRODUZIDA EM SISTEMA ORGÂNICO E CONVENCIONAL. Disponível em:

<http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2012/julho-dezembro-2/1211-antracnose-em-lichia-litchi-chinensis-produzida-em-sistema-organico-e-convencional.html>.

Acesso em 05 de abril 2015.

REINHARDT, D.H.; SOUZA, L.F. DA S.; CABRAL, J.R.S. **Abacaxi. Produção: aspectos técnicos.** Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 77p. (Frutas do Brasil; 7).

REINHARDT, D. H. Abacaxi produção e aspectos técnicos. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2007. Disponível em:

<http://www.embrapa.br/mandioca>.

Acesso em: 03 de abril de 2007.

ROMAGNOLO, M. B.; Sousa, M. C. O. Gênero Eugenia L. (Myrtaceae) na planície alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. Acta Botanica Brasilica, Feira de Santana, v. 20, n.3, 2006.

ROSA, T.H; STRECK, A.N; WALTER, C.L; ANDRIOLO, L.J; SILVA, R.M. Crescimento vegetativo e produtivo de duas cultivares de morango sob épocas de plantio em ambiente subtropical.2013. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE Revista Ciência Agronômica, v. 44, n. 3, p. 604-613, jul-set, 2013

SANTIN, A.; PINHEIRO, M. F. A cultura do abacaxizeiro no Litoral Norte do RS: histórico, problemas e perspectivas. Letras da Terra, Porto Alegre, p. 12 - 13, 01 dez. 2009

SANTOS, B. A.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; VALE, F. X. R. Severidade de isolados de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* sensíveis e resistentes ao benomyl em abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 1, p.101-103, jan-fev. 2002.

SILVA, A. L. G.; PINHEIRO, M. C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) Acta Botanica Brasiliensi, Brasílica, São Paulo, v.21, n.1, p. 235-247, 2007.

SIMÃO, S. O abacaxizeiro. In: SIMÃO, S. Tratado de fruticultura. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.249-288.

TORTORA, Gerard J. Berdell R. Funke, Christine L. Case. Microbiologia. Porto Alegre. 10 ed. Artmed, 2012.

VENTURA, J. A. Fusariose do abacaxizeiro: caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro in vitro. 1993. 111 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa, MG: UFV, 2002. Cap. 8, p.445-509.

WIKIPÉDIA. Mapa da localização do município de Porto Alegre- RS. Disponível em:

http://pt.wikipedia.org/wiki/Porto_Alegre.

Acesso em 10 de março de 2015.

10. APÊNDICE

Apêndice 1- Lista de Patógenos preservados no Laboratório de Fitopatologia da FEPAGRO

AMOSTRA	Tipo de Microorganismos	Data da Preservação
004.1(BDA+AL,SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
004.2(BDA+AL,SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
004.3(BDA+AL,SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
004.5(BDA+AL,SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
007.1(BDA+AL,SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
007.2(BDA+AL,SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
007.3(BDA+AL,SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
007.4(BDA+AL,SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
007.5(BDA+AL,SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
009.1-1(SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
009.1-2(SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
009.2-1(SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
009.2-2(SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
010.1-2(SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
010.2-1(SNA, KADO)	Fusarium oxysporum	17/12/2014 / 27/01/2015
010.2-2(SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
010.2-3(SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
010.3-1(SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
010.3-2(SNA)	Fusarium oxysporum	17/12/2014
Amostras tiradas de plantas de Abacaxi(<i>Ananas comosus</i>) da localidade de Terra de Areia-RS e Maquiné- RS		

Amostra	Tipo de Microorganismos	Data da Preservação
019.1	Fusarium sp	23/12/2014
023.1	Fusarium sp	23/12/2014
023.2	Fusarium sp	23/12/2014
026.2-3	Colletotrichum sp	
035.1	Sclerotinia sp	23/12/2014
035.2	Sclerotinia sp	23/12/2014
035.3-4	Sclerotinia sp	23/12/2014
035.4-2	Sclerotinia sp	23/12/2014
038.2	Alternaria alternata	13/02/2015
039.2	Fusarium sp	23/01/2015
039.3	Fusarium sp	23/01/2015
043.3	Fusarium sp	09/02/2015
044.4-1B	Fusarium sp	09/02/2015
F10		23/12/2014
F11		23/12/2014
F12		23/12/2014
T4R3CT		23/12/2014
<p>Amostras de Bananeira- <i>Musa</i> sp (019/023) da localidade de Três Cachoeiras-RS Amostras de Lichia- <i>Litchi chinensis</i>(026) da localidade de Maquiné-RS Amostras vindas de Santa Maria-RS (F10,F11,F12,T4R3CT) Tomateiro -<i>Solanum lycopersicum</i> (043/044), Pimentão- <i>Capsicum annuum</i> (039), Morangueiro- <i>Fragaria vesca</i>(038) do município de Caxias do Sul-RS</p>		

Amostra	Tipo de Microorganismos	Data da Preservação
037.3	Bactéria GRAM positivo	11/02/2015
040A	Bactéria(confirmar o tipo)	09/02/2015
040B	Bactéria(confirmar o tipo)	09/02/2015
044.1	Bactéria(confirmar o tipo)	11/02/2015
044.2	Bactéria(confirmar o tipo)	11/02/2015
045.1	Bactéria(confirmar o tipo)	28/01/2015
045.2	Bactéria(confirmar o tipo)	28/01/2015
045.5	Bactéria(confirmar o tipo)	11/02/2015
<p>Amostra de Melancia-<i>Citrullus lanatus</i>(037) da localidade de Viamão-RS Amostra de Tomate- <i>Solanum lycopersicum</i>(040,044,045) da localidade de Caxias do Sul-RS</p>		