

CAROLINE GERALDI PIEROZZI

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E TRANSMISSÃO DE FUNGOS EM
SEMENTES DE OLERÍCOLAS**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutora em
Agronomia - Proteção de Plantas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Zanin Kronka

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio
Fujihara

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

P624i Pierozzi, Caroline Geraldi, 1985-
Identificação morfológica e transmissão de fungos em sementes de olerícolas / Caroline Geraldi Pierozzi. - Botucatu: [s.n.], 2017
59 p.: il., color., grafs., tabs.

Tese(Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017
Orientador: Adriana Zanin Kronka
Coorientador: Ricardo Toshio Fujihara
Inclui bibliografia

1. Sementes - doenças e pragas. 2. Fungos - Identificação. 3. Fungos fitopatogênicos. I. Kronka, Adriana Zanin II. Fujihara, Ricardo Toshio. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar na escolha dos melhores caminhos.

À minha amada família, minha mãe Benedita, meu pai Marcos, minha irmã Aline e minha sobrinha Lívia, pelo apoio incondicional, compreensão nas horas mais difíceis e incentivo nos momentos de dúvida.

Ao meu namorado, Efrain, pelo companheirismo, compreensão, incentivo e encorajamento. Este apoio foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Aos meus queridos sogros, Aparecida e Wanderley, pelo apoio e carinho.

À Prof^a. Dr^a. Adriana Zanin Kronka, pela orientação durante todo o doutorado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara, pela orientação, apoio e paciência durante o desenvolvimento da tese.

Ao Prof. Dr. Gary Munkvold, pela orientação e por me receber tão bem nos EUA.

Ao Derrick, por todo ensinamento durante os seis meses de convivência nos EUA.

À Prof^a. Dr^a. Cecília Amaral e à Camila Fernanda da Silva (Dep. de Zoologia – UNICAMP), pela cessão e orientação no uso dos equipamentos para produzir as fotografias.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Sartori, pela orientação na análise estatística.

À Dr^a. Christiane Ceriani do Instituto Biológico de São Paulo, por fornecer os isolados fúngicos utilizados no primeiro capítulo deste trabalho.

À FCA, por ser minha morada durante os últimos 12 anos de minha vida.

À Iowa State University, por me proporcionar uma experiência inesquecível.

A minha querida amiga Marília, pela parceria e incentivo.

A minha prima Maria Luisa, pelo apoio em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida para doutorado sanduíche nos Estados Unidos da América.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida.

Muito obrigada!

RESUMO

A identificação morfológica e a transmissão de fungos são dois ramos importantes da Patologia de Sementes. As chaves interativas, que têm como base a morfologia fúngica, auxiliam a pesquisa e trabalhos técnicos, de forma que a identificação digital se torne mais presente. Por este método, desenvolveu-se uma chave interativa que auxilie a identificação de onze espécies fúngicas associadas às sementes de cebola, cenoura, pimentão e tomate. Esta baseou-se em uma matriz composta por seis caracteres: cultura, conídio, conidióforo, coloração do conidióforo longo, coloração do micélio e presença ou não de setas. O usuário seleciona respostas aos caracteres oferecidos no software e o microrganismo é corretamente indicado. A validação desta ferramenta foi realizada por meio de teste com grupos de voluntários compostos por alunos de graduação e pós-graduação. Analisou-se o tempo despendido por cada voluntário para analisar 25 sementes com fungos comuns aos da chave, como também a porcentagem de acerto e o grau de dificuldade de cada participante. Os resultados foram confrontados com um grupo controle, o qual utilizou o meio convencional (manuais impressos de identificação). A elevada porcentagem de acertos na diagnose com o auxílio da chave e a classificação de fácil uso pelos usuários confirmou a eficiência do método. Também observou-se um aumento da acurácia dos resultados quando comparado ao sistema convencional. Além disso, esta chave pode ser útil em vários setores, desde auxiliar no treinamento de iniciantes na Patologia de Sementes até em atividades acadêmicas. Já para o estudo da transmissão de fungos via sementes, foram necessários tanto os conhecimentos morfológicos quanto os moleculares. Neste sentido, avaliou-se a transmissão das três raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) por sementes de tomate. Foram utilizados dois isolados de cada raça e para cada um deles foram inoculadas 200 sementes em suspensão de esporos à concentração de 10^7 esporos/mL. Estas sementes foram semeadas em bandejas com células e mantidas sob condições controladas até completarem três semanas após a emergência. Foram avaliadas 100 plântulas por isolado quanto a massa, comprimento de raízes e severidade. Além disso, pequenos fragmentos da parte aérea e raiz, de cada plântula, foram plaqueados em meio de cultura para posterior análise molecular e confirmação da transmissão. Analisou-se também a eficiência do tratamento de sementes de tomate com ácido clorídrico (HA) e fosfato trissódico (TSP) no controle de FOL. Para isso, foram utilizados três lotes de sementes, cada um deles inoculado com uma raça diferente

de FOL e tratados com os diferentes tratamentos. Os resultados demonstraram baixa taxa de transmissão para as raças 1 e 3 e nula para a raça 2. Em relação aos resultados de massa das plântulas e comprimento de raízes, notou-se que o baixo desenvolvimento de plântulas é inversamente proporcional a elevada transmissão. Além disso, a doença apresenta-se de forma assintomática em plântulas. Ao analisar os resultados dos tratamentos de sementes, constatou-se que o ácido clorídrico foi 100% eficiente no controle de FOL, enquanto que o fosfato trissódico não controlou as raças de FOL.

Palavras-chave: Patologia de sementes. Chave de identificação. Fungos fitopatogênicos.

ABSTRACT

Morphological identification and fungi transmission are two important Seed Pathology branches. Interactive keys, based on fungal morphology, help research and technical work, so that digital identification becomes more present. Through this method, an interactive key was developed to help identify eleven fungal species associated with carrot, onion, pepper and tomato. It was based on a matrix composed by six characters: crop, conidium, conidiophore, long conidiophore coloration, mycelial staining and presence of setae. The user selects responses to the features offered in the software and the micro-organism is correctly indicated. The validation was performed through volunteers groups composed of undergraduate and graduate students. It was analysed the time spend by each volunteer to examine 25 seeds with fungi common to the key, as well as the percentage of hits and the difficulty level of each participant. The results were compared with a control group, which used the conventional means (printed identification manuals). The high percentage of correct answers in the diagnosis with the key use and the user easy classification confirmed its efficiency. There was also an increase in the results accuracy when compared to the conventional system. In addition, this key can be useful in many sectors, from assisting in training beginners in seed pathology to academic activities. For the study of fungi transmission through seeds, both morphological and molecular knowledge were necessary, which made the result safer. In this sense, the three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* transmission by tomato seeds were analyzed. Two isolates of each race were used and 200 seeds were inoculated in spore suspension at 10^7 spores/mL concentration. These inoculated seeds were planted in trays with individual cells and kept under controlled light and humidity conditions until completed three weeks after emergence. The evaluation consisted in weight, root length and severity from 100 seedlings. In addition, small parts of the shoot and root of each seedling were plated in medium culture for further molecular analysis and confirmation of the transmission. The efficiency of tomato seed treatment with hydrochloric acid (HA) and trisodium phosphate (TSP) in FOL control was also analyzed. For this, three seed lots were used, each one inoculated with a different race of FOL and treated with the different treatments. The results showed a low transmission rate for races 1 and 3 and null for race 2. Regarding the results of seedling mass and the root length, it was observed that the low seedling development is inversely proportional to high transmission. In addition, the disease presents asymptotically in seedlings. When

analyzing the seed treatments results, it was verified that hydrochloric acid was 100% efficient in the FOL control, whereas trisodium phosphate did not control the FOL race.

Keywords: Seed Pathology. Identification key. Phytopathogenic fungi.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO DE UMA CHAVE INTERATIVA (LUCID) PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS EM SEMENTES DE OLERÍCOLAS.....	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	19
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
1.2.1 ISOLADOS FÚNGICOS E SEMENTES SELECIONADAS.....	20
1.2.2 INOCULAÇÃO DAS SEMENTES.....	21
1.2.3 TESTE DE SANIDADE E OBTENÇÃO DAS FOTOGRAFIAS.....	21
1.2.4 LUCID KEY.....	22
1.2.5 VALIDAÇÃO DA CHAVE.....	24
1.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
1.3 RESULTADOS.....	24
1.3.1 LUCID PLAYER.....	24
1.3.2 VALIDAÇÃO.....	27
1.4 DISCUSSÃO.....	30
REFERÊNCIAS.....	32
CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA TRANSMISSÃO DAS RAÇAS DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ATRAVÉS DE SEMENTES DE TOMATE.....	35
2.1 INTRODUÇÃO.....	38
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.2.1 DETERMINAÇÃO DAS RAÇAS.....	39
2.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	40

2.2.3 ANÁLISES DE PCR.....	41
2.2.4 ISOLADOS FÚNGICOS USADOS NO ESTUDO DE TRANSMISSÃO.....	42
2.2.5 INOCULAÇÃO DAS SEMENTES.....	42
2.2.6 ENSAIO EM CÂMARA DE CRESCIMENTO.....	43
2.2.7 TRATAMENTO DE SEMENTES.....	44
2.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
2.3 RESULTADOS.....	44
2.3.1 DETERMINAÇÃO DAS RAÇAS.....	44
2.3.2 ENSAIO EM CÂMARA DE CRESCIMENTO.....	46
2.3.3 TRATAMENTO DE SEMENTES.....	48
2.4 DISCUSSÃO.....	49
2.4.1 ENSAIO EM CÂMARA DE CRESCIMENTO.....	49
2.4.2 TRATAMENTO DE SEMENTES.....	50
REFERÊNCIAS.....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
REFERÊNCIAS.....	58

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa objetivou enfatizar a problemática em torno da associação entre microrganismos fúngicos e sementes, já que, dentro da Fitopatologia, muitas vezes, não é destinada a devida atenção a este setor. Esta informação pode ser confirmada através da própria legislação brasileira, que não torna obrigatória a realização de testes de sanidade pelas certificadoras antes da liberação do comércio interno de lotes de sementes, ficando restrito apenas às sementes importadas.

Acredita-se que a chave interativa de identificação de fungos em sementes, desenvolvida no presente trabalho, incentivará o estudo e desenvolvimento de novas ferramentas que facilitem a diagnose de doenças fitopatogênicas, tornando-a mais dinâmica e prática. Além disso, ferramentas simplificadas e de linguagem mais direta ampliam a acessibilidade desses instrumentos, atendendo um extenso público, que atinge desde pesquisadores até produtores.

Estudos de transmissão de fungos através de sementes são raros, sendo este fato justificado pela baixa transmissibilidade de microrganismos via sementes. Porém, pesquisas comprovam que baixas incidências de certos patógenos em um lote de sementes, em torno de 1% de contaminação, pode acarretar em graves perdas na lavoura, independentemente da cultura produzida. Sendo assim, este estudo apresentou taxas de transmissão preocupantes, chegando a alcançar valores próximos a 20% de transmissibilidade de FOL para as raízes de tomate, comprovando e enfatizando a importância do avanço da pesquisa neste setor, visando buscar demonstrar a verdadeira importância da disseminação de fungos através das sementes, já que estas são o principal meio de propagação das culturas agricultáveis no mundo.

REFERÊNCIAS

- BOUKET, A. C., et al. Um programa de identificação baseado na Web para *Pythium* espécies. **Arquivos de Fitopatologia e Sanidade Vegetal**, v. 48, p. 475-484, 2015.
- BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2009.
- CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. Jaboticabal: Funep, 2012. 5 ed. p. 590.
- CHOI, H. W. et al. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing fusarium wilt on tomato in Korea. **Plant Disease**, v. 97, p. 1377, 2013.
- DHINGRA, O. D. Teoria da Transmissão de Patógenos Fúngicos por Sementes. In: ZAMBOLIN, L., et al. **Sementes: Qualidade Fitossanitária**. Viçosa: UFV. 2005. 11-75 p.
- ELIAS, K. S. et al. Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Restriction fragment length polymorphisms provide genetic evidence that vegetative compatibility group is an indicator of evolutionary origin. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 6, p. 565-572, 1993.
- GRATTIDGE, R.; O'BRIEN, R. G. Occurrence of a third race of Fusarium wilt of tomatoes in Queensland. **Plant Disease** v. 66, p. 165–166, 1982.
- JACOBS, A.; GOVENDER, R.; VAN HEERDEN, S. W. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing tomato wilt in South Africa. **Australasian Plant Disease**, v. 8, p. 145-147, 2013.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, 2005. p. 607-626.
- LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, v. 2, p. 336, 1991.
- LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J., WETZEL, M. M. V. S. **Patologia de sementes**. Campinas, SP: Fundação Cargill/Abrates-Copasem, 1987. p. 276-298.
- MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in Mycology**, v. 86, p. 99-2016. 2017.
- MARLATT, M. L.; CORREL, J. C.; KAUFMANN, P. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. **Plant Disease**, v. 80, p. 1336-1342, 1996.
- MAUDE, R. B. Achievements and objectives in research on seed-borne diseases of vegetables. In: NASSER, L. C.; WETZEL, M. M.; FERNANDES, J. M. (Eds.) **Seed**

Pathology: international Advanced course, proceedings. Brasília, **ABRATES**, p. 267-275, 1988.

PEREIRA, R. B. Et al. **Tratamento de sementes de hortaliças**. Emprapa, Brasília, DF, Brazil, 2015.

REIS, A. et al. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 426-428, 2005.

SEPÚLVEDA-CHAVERA, G. et al. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes in the Azapa Valley of Chile. **Plant Disease**, v. 98, p. 1432, 2014.

STRAVATO, V. M.; BUONAURO, R.; CAPPELLI, C. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 on tomato in Italy. **Plant Disease**, v. 83, p. 967. 1999.

TOKESHI, H.; GALLI, F. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Wr) Sny & Hans em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, v. 23, p. 195–209, 1966.

VALENZUELA-URETA, J. G. et al. First report of Fusarium wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in México. **Plant Disease**, v. 80, p.150, 1996.

VOLIN, R. B.; JONES, J. P. A new race of Fusarium wilt of tomato in Florida and sources of resistance. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v. 95, p. 268–270, 1982.