

RASTREIO DE ALTERNARIA SPP. EM SEMENTES DE BRÓCOLO.

Cátia Agostinho¹; Eugénio Diogo²; M^a do Céu Godinho¹&Ana F. Pinto¹

¹Instituto Politécnico de Santarém, Escola Superior Agrária

²Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV)

RESUMO

A cultura do brócolo é das culturas hortícolas com maior expressão em Portugal sendo utilizada para a transformação industrial ou para consumo em fresco. No Ribatejo, tem-se observado a expansão do fungo *Alternaria spp.*, o que poderá vir a comprometer a cultura em determinados locais. Pretendeu-se com este trabalho realizar o rastreio do fungo *Alternaria brassicicola* e *Alternaria brassicaea* em três lotes de sementes de brócolo. Foram feitas análises laboratoriais e observações da presença do fungo ao longo do desenvolvimento da semente. Determinou-se a quantidade de sementes infetadas por este fungo, obtendo resultados pouco significativos (duas sementes infetadas em 2400 sementes testadas).

Palavras-chave: *Alternarioses, Alternaria brassicicola, Alternaria brassicaea.*

ABSTRACT

The broccoli crop is one of the vegetable crops with the highest expression in Portugal, being used for industrial processing as well as for the fresh market. In Ribatejo, we have seen the spread of the fungus *Alternaria spp.*, which may compromise crops in certain locations. In this work, the screening of *Alternaria brassicicola* or *Alternaria brassicaea*, on three different batches of broccoli seeds, was made. Laboratory tests and subsequent observations were made during the development of the seeds. The amount of infected seeds by this fungus was determined, obtaining results with a very low expression (two seeds infected in 2400 seeds tested).

Keywords: Broccoli seeds, Alternarioses, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria brassicaea*

INTRODUÇÃO

O cultivo das brássicas tem uma elevada importância na horticultura em Portugal. No entanto, a produção destas plantas está a ser gravemente afetada por fungos do género *Alternaria*, provocando as designadas alternarioses, causadas por *Alternaria brassicicola* e *Alternaria brassicaea*.

A família *Brassicaceae* é composta por várias espécies vegetais de destaque dentro das hortícolas, como couve-brócolo (*Brassica oleracea L. italica*), couve-flor (*Brassica oleracea L. botrytis*), couve-lombarda (*Brassica oleracea convar. capitata var. sabauda*), couve-nabiça (*Brassica napus L. emend Metzg*), couve-portuguesa (*Brassica oleracea L. var. costata DC*) e couve-repolho (*Brassica oleracea L. capitata*) (DGAV, 2015).

O brócolo, ou a couve-brócolo, é uma variedade botânica de *Brassica oleracea L. var. italica plenk.* ou, são consideradas as cultivares de brócolo referentes ao grupo *italica* da espécie. Também surge a designação *B.oleracea var. botrytis f. cymosa* (Almeida, 2006).

A cultura dos brócolos em Portugal é recente, tendo-se desenvolvido a partir da década de 70 do século XX. O país produz cerca de 2,8 mil hectares, dos quais cerca de mil com produção para a indústria. As culturas que ocupam mais área são a couve-repolho (3,2 mil hectares), a couve-brócolo (2,8 mil hectares, dos quais mil com

produção para a indústria) e a couve-lombarda (2,0 mil hectares), culturas que registaram aumentos de área muito significativos a 2012 (INE, 2013).

O brócolo é uma hortaliça com dois períodos de cultivo por ano (Primavera-Outono). Este apresenta uma inflorescência de cor verde, designada por “cabeça”, distinguindo-se da couve-flor, por ser uma inflorescência mais desenvolvida, composta por pequenos botões florais precoces. Se a inflorescência principal for cortada, a planta produz inflorescências secundárias, de menor calibre, na axila das folhas (Almeida, 2006).

O brócolo é uma cultura de estação fresca tolerante à geada, com exigências edafoclimáticas idênticas à couve-flor. A melhor qualidade é obtida quando o ciclo cultural decorre com temperaturas médias entre 13 °C e 20 °C. Acima dos 25 °C, a compactação da cabeça é reduzida, abaixo dos 5 °C o crescimento é muito lento. As necessidades de frio para a diferenciação da inflorescência são menores nos brócolo do que na couve-flor (Almeida, 2006).

Prefere solos ricos em matéria orgânica, textura areno-argiloso e com boa capacidade de armazenamento de água. É uma cultura moderadamente sensível à salinidade, mas mais tolerante do que as couves de repolho e de couve - flor (Maynard & Hochmuth, 1997).

Alternaria é um género de fungos pertencente ao filo *Ascomycota*, família *Pleosporaceae*. A maior parte das espécies de *Alternaria* é saprófica sendo encontrada no solo ou em tecidos vegetais em decomposição. No entanto algumas espécies são patogénicas causando doenças com elevado impacto económico numa grande variedade de culturas tais como cereais, ornamentais, hortícolas, batata, tomate, citrinos e macieira (Thomma, 2003)

A alternariose é uma doença fúngica comum em hortaliças. Causadas por fungos do género *Alternaria* caracterizam-se por afetar plântulas, folhas, caules, hastes, flores e frutos de várias hortaliças tais como solanáceas, apiáceas, aliáceas, crucíferas e cucurbitáceas. Em função da cultura que afeta podem apresentar diferentes nomenclaturas como “pinta preta” para tomate, batata e pimentão; “mancha de alternaria”, para crucíferas e cucurbitáceas em geral; “mancha púrpura” para aliáceas e queima das folhas para cenoura (Töfoli *et al.*, 2015) As diferentes espécies, hospedeiros e órgãos afetados estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Várias espécies de *Alternaria* que causam doenças nas variedades de hortícolas e os órgãos afetados (adaptado Koike *et al.* 2007).

Espécies	Culturas	Órgãos afetados
<i>Alternaria brassicae</i> , <i>Alternaria brassicicola</i> <i>Alternaria raphani</i>	Couve-brócolo, couve-flor, couve-lombarda, couve-nabiça, couve-portuguesa , couve- repolho	Folha e inflorescência
<i>Alternaria solani</i>	Batateira e tomateiro	Folhas, pecíolos, hastes e tubérculo
<i>Alternaria dauci</i>	Cenoura, aipo, salsa	Folha e inflorescência
<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria tenuis</i>	Tomate	Folhas, caules e frutos

As espécies *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. e *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire que causam doenças nas brássicas, incluindo o brócolo, vulgarmente conhecidas por alternarioses, podem infetar as plantas e manifestar-se em qualquer fase de crescimento da planta. Inicialmente, surgem pequenos pontos negros na folha e nos talos, ao fim de algum tempo, estes pequenos pontos aumentam de tamanho e é neste momento que se pode observar as diferenças entre os dois tipos. A *Alternaria brassicicola* produz pequenas lesões negras, pontuais que se fundem. A *Alternaria brassicae*, caracteriza-se por lesões castanhas de maior tamanho, nas quais se desenvolve uma massa castanha escura de esporos. Passado algum tempo, as lesões rasgam-se, formando orifícios nas folhas (Figura 1).

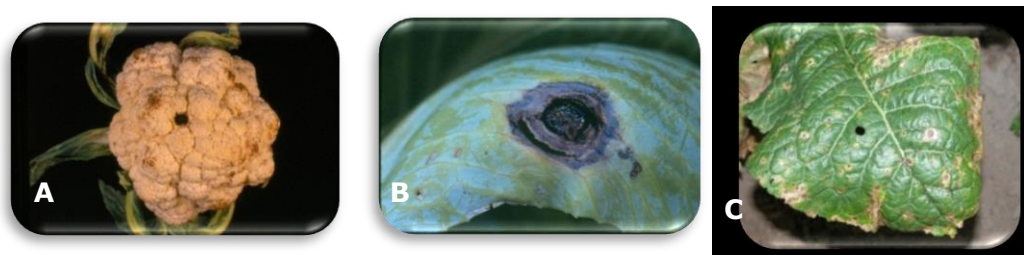


Figura 1. Manchas foliares causada por *Alternaria brassicae* e *A. Brassicicola* (A – Lesão na flor, B e C – Lesões foliares) (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires Rurales,2009).

Os esporos da *Alternaria* spp. são disseminados pelo vento, salpicos de água, equipamentos e utensílios durante o verão. Períodos prolongados de humidade a temperaturas de 15 a 25 °C favorecem infeções por *Alternaria* spp. Além disso, alta humidade e temperaturas acima de 14 °C promovem a esporulação.

Na reunião geral do projeto “Safebrocolo” a decorrer até final de 2017, foi referido que estas alternarioses têm sido responsáveis por grandes prejuízos nos últimos três anos (Nunes, comunicação pessoal, junho 2015). Este projeto foi a resposta de várias entidades para minimizar este grave problema. Coordenadas pelo COTHN, a Cadova, o IPS-ESAS, o INIAV, a Univ. Évora e o ISA desenvolvem este projeto, com a finalidade de encontrar soluções para tomada de decisão e combate mais eficazes (projeto PRODER 57150 “SAFEBROCOLO” 2015-2017).

Como parte integrante deste projeto, foi sugerido a avaliação da existência de *Alternaria* spp. em sementes de brócolo, no âmbito da unidade curricular de projeto de área científica do Curso de Engenharia Agronómica da Escola Superior Agrária de Santarém. Pretendeu-se, assim, avaliar em que medida as sementes utilizadas para produção de plantas em viveiro e posterior distribuição aos agricultores estão isentas de estruturas de reprodução do fungo capazes de infetar as jovens plantas no campo definitivo. Esta informação é de extrema importância na medida em que qualquer programa de protecção integrada deve iniciar com a garantia de utilização de material vegetal são.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi iniciado na Unidade Estratégica de Sistemas Agrários e Florestais e Sanidade Vegetal do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Oeiras, onde se delineou todo o trabalho e se iniciaram as sementeiras. Posteriormente o trabalho laboratorial transitou para o laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia Alimentar, Biotecnologia e Nutrição (DTABN) da ESAS. Para a abordagem ao tema proposto "Rastreio de espécies de *Alternaria* spp. em sementes de brócolo" optou-se por fazer dois tipos de ensaio, em placa de Petri (com papel de filtro humedecido, com meio de cultura semi-seletivo), e em vaso.

Utilizaram-se neste trabalho sementes de três fontes diferentes, conforme a tabela 2:

Tabela 2. Sementes utilizadas nos ensaios

Amostra	Marca	Variedade	Tratamento
1	Sakata	F-1 Hybrid Parthenon	AA Tiran 65/ Thiram
2	Bejo	Malibu	Thiram, iprodrene, metalaxyl-M
3	Sakata (facultado pela Monliz)	Parthenon	?

Ensaio em placa

Estes ensaios seguiram as metodologias indicadas pela ISTA ISTA (International Seed Testing Association) (ISTA, 2014)

Ao todo foram utilizadas 2400 sementes dos 3 lotes de sementes referidos na tabela 2. Metade destas, 1200 sementes (400 de cada tipo de sementes utilizadas) sofreram um processo de lavagem. Esta lavagem foi feita com água destilada esterilizada, à temperatura ambiente (± 25 °C), em frasco de 100 ml com ± 40 ml (três mudas) durante um período de 24 horas com agitação orbital. Deste modo obtivemos seis amostras, sementes 1,2,3 e sementes SL1, SL2 e SL3.

Ensaio de placas com papel de filtro

Preparamos 48 caixa de Petri, em condições de assepsia, com papel de filtro (\emptyset 90mm), que foi humedecido com água destilada esterilizada.

Ensaio de placas em meio CW

Preparamos 48 placas de Petri, em condições de assepsia, com o meio semi-selectivo CW (Wu & Chen, 1999).

Procedeu-se à distribuição de 25 sementes por placa (com papel de filtro e com meio CW) das amostras lavadas e não lavadas, em condições de assepsia, conforme o referido na tabela 3 e figura 2.

Tabela 3. Número de placa de Petri e de sementes utilizadas no ensaio.

Amostras de Sementes	Placas de Petri com papel de filtro	Placas de Petri com meio CW	Nº de sementes
1	8	8	400
2	8	8	400
3	8	8	400
SL1	8	8	400
SL2	8	8	400
SL3	8	8	400
Total	48	48	2400



Figura 2. Início dos ensaios em placa (papel de filtro e meio CW).

Para finalizar colocou-se parafilme nas 96 placas de Petri preparadas, e deixaram-se a incubar durante 7 dias à temperatura e luz ambiente (25 ± 27 °C). Durante o ensaio foi monitorizada a temperatura do ar, com um termómetro.

As seis amostras de sementes utilizadas neste ensaio foram avaliadas quanto à germinação e à visualização do aparecimento de colónias de *Alternaria brassicae* e *Alternaria brassicicola*. Relativamente às colónias suspeitas de serem *Alternaria brassicae* e *Alternaria brassicicola*, fez-se observação microscópica dos esporos e o seu registo fotográfico (microscópio Nikon eclipse Ci, com câmara fotográfica Jenoptik C5).

Ensaio em Vaso

Realizaram-se também dois ensaios em vaso. Cada um destes ensaios teve a duração de 21 dias.

Utilizaram-se 60 sementes (1,2,3 e SL1,SL2,SL3) em cada ensaio. Foi colocado substrato universal esterilizado em 12 vasos onde se semearam 5 sementes em cada. Nos dois

ensaios efetuados foram semeadas 120 sementes. Regaram-se todos os vasos com uma periodicidade diária, durante 21 dias. Registou-se a temperatura do ar, com um termómetro.

Fizeram-se observações diárias das plantas com o objetivo de detetar o aparecimento de lesões por *Alternaria spp.*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se um elevado índice de germinação (93 %) na totalidade das sementes colocadas em placas de Petri após 36 horas de incubação (Figura 3 a).

Após ± 5 dias de incubação, começou-se a observar o desenvolvimento de fungos filamentosos (Figura 3c).

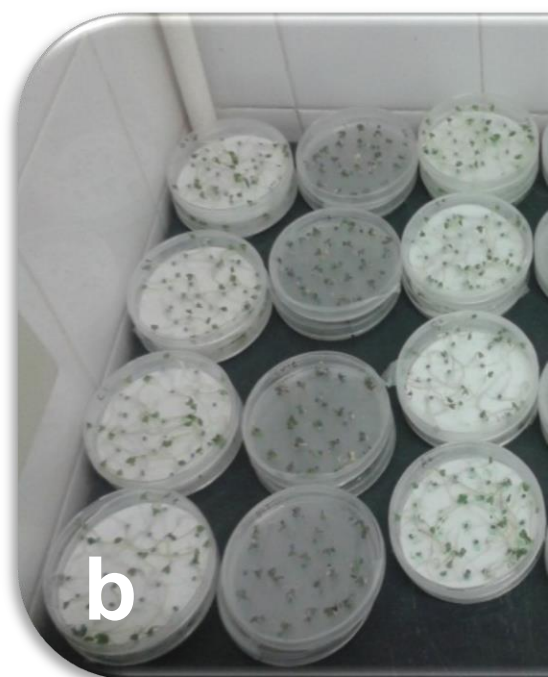


Figura 3 - a Início dos ensaios em placa (papel de filtro e meio CW); b sementes germinadas após 36 h de incubação; c o aparecimento de fungos filamentosos começou aos 5 dias .

Estes fungos filamentosos apareceram principalmente nos ensaios com sementes lavadas e em maior número nas placa de Petri com papel de filtro, Tabela 4).

Tabela 4. Análise de contaminação nas várias amostras de sementes em placas de Petri com papel de filtro e em meio CW.

Amostra de Sementes	Papel de Filtro	Meio CW
1	Aparecimento de fungo (pontos pretos) disperso no papel de filtro em quatro placas.	Não apareceu qualquer contaminação fúngica.
2	Aparecimento de fungo (pontos pretos) disperso no papel de filtro em quatro placas	Não apareceu qualquer contaminação fúngica.
3	Aparecimento de fungo (pontos pretos) disperso no papel de filtro em quatro placas	Não apareceu qualquer contaminação fúngica.
SL1	A placa E, com suspeita de <i>Alternaria</i> spp., pela presença de fungo castanho, não confirmada por microscopia ótica.	As placas B e F, apresentam uma única colónia de fungo ligeiramente acinzentado.
SL2	As placas D e E com suspeita de <i>Alternaria</i> spp., pela presença de fungo castanho, não confirmada por microscopia ótica.	As placas D, G e H, apresentam colónias rosas.
SL3	Placas sem qualquer contaminação fúngica.	A placa A, apresentou uma contaminação fúngica acinzentada que ocupou a totalidade da placa. A placa F, apresenta duas colónias suspeitas de <i>Alternaria</i> spp. confirmadas por microscopia ótica.

Após a análise dos dados deste ensaio foi possível esclarecer o aparecimento de vários fungos (ver tabela 4) que foram analisados por microscopia ótica para confirmar a possível presença de *Alternaria* spp., com base no aspeto morfológico dos fungos. Após esta análise microscópica podemos verificar que as duas colónias suspeitas na placa CW3SLF, confirmaram ser *Alternaria* spp. (*Alternaria brassicicola* ou *Alternaria brassicae*) (Figura 4).

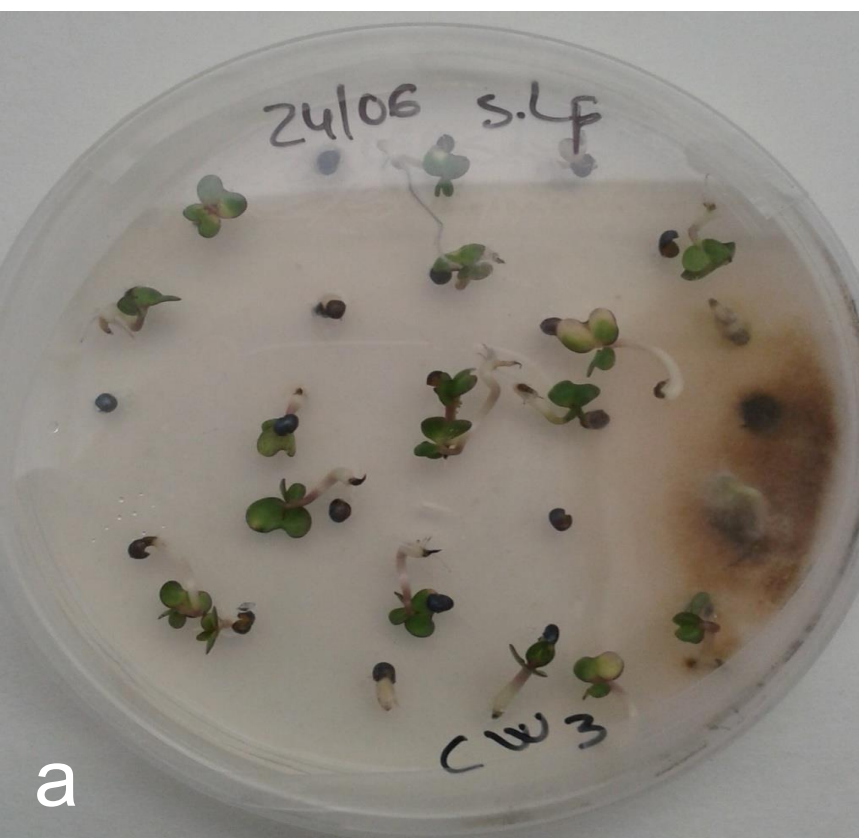


Figura 4 - a colônias suspeitas na placa CW3SLF, b confirmação microscópica de *Alternaria brassicicola* ou *Alternaria brassicae*.

Nos ensaios efetuados em vaso (Figura 5) durante o período em que foram feitas as observações (21 dias) não foram detetadas quaisquer lesões típicas de fungos de *Alternaria spp.*



Figura 5. Ensaio em vaso.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo efetuado foi um estudo preliminar, visto ter sido resultante de um único ensaio de sementes em placa e dois ensaios em vaso (estes últimos com um número de sementes estatisticamente pouco significativo).

Os ensaios permitiram revelar nas amostras de sementes *Alternaria* spp., muito provavelmente *Alternaria brassicicola*, em pequeno número (duas sementes infetadas num total de 2400). Esta contaminação foi detetada nas sementes tipo 3 (Sakata, facultado pela Monliz, variedade: Parthenon) lavadas em meio CW.

No estudo em vaso, durante o período em que se efetuaram as observações (21 dias), não foram detetadas quaisquer lesões características de *Alternaria* spp.

Estes resultados parecem indicar que a gravidade da ocorrência das alternarioses detetadas na cultura do brócolo, em Portugal, nestes últimos anos, não residem na comercialização e qualidade das sementes utilizadas, já que não se verificou contaminação com *Alternaria* spp. (*Alternaria brassicicola*, *Alternaria brassicae*) que por si só justifique o grau de importância da doença.

BIBLIOGRAFIA

Almeida, D. (2006). *Manual de culturas hortícolas* - 1º vo.l Lisboa: Editorial Presença. 348 pp.

Canada. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires Rurales (2009). Tache noire alternarienne. Disponível em: <http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/french/brassicas/diseases-anddisorders/alternaria.html> (consultado em 28.09.2015).

Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Catalogo Nacional de variedades 2016..Disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/> (consultado em 15.02.2016).

INE-Estatísticas Agrícolas 2013, disponível em <http://www.ine.pt>

ISTA - International Seed Testing Association (2014) 7-001ª:Blotter method for the detection of *Alternaria dauci* on *Daucus carota* (carrot). Bassersdorf, Suíça; <https://www.seedtest.org/en/home.html>

Koike, S.T.; Gladders, P. & Paulus, A.O. (2007). *Vegetable diseases: a colour handbook*. Boca Raton: CRC Press, 448 pp.

Maynard, D.N. and G.J. Hochmuth. (1997) *Knott's Handbook for Vegetable Growers*. John Wiley and Sons, 605 Third Ave., New York NY 10157.

Töfoli, J.G.; Domingues, R.J. & Ferrari, J.T. (2015) *Alternaria* spp. em Oleráceas: Sintomas, Etiologia, Manejo e Fungicidas. *Biológico*, São Paulo, v.77, n.1,.21-34 pp.

http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v77_1/tofoli1.pdf

Thomma, Bart P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 225-236

Wu, W.-S and Chen, T. W. (1999). Development of a new semiselective medium for detecting *Alternaria brassicicola* in cruciferous seeds. *Seed Science and technology*, vol.27, nº 1, 397-409 pp.