Sobrevivência saprofítica de *Alternaria brassicicola* e manejo de restos foliares de brócolos

Saprophytic survival of Alternaria brassicicola and management of broccoli leaf debris

Luiz Augusto Martins Peruch^I Sami Jorge Michereff^{II}

RESUMO

A sobrevivência saprofítica do fungo Alternaria brassicicola foi investigada em restos foliares de brócolos (Brassica oleracea var. italica), em diferentes profundidades de incorporação no solo, períodos do ano e sistemas de manejo do solo. Os restos foliares infectados pelo patógeno foram distribuídos em parcelas no campo, na superfície do solo e nas profundidades de 5 e 10cm. Periodicamente, os restos foliares foram coletados e a concentração de conídios quantificada, sendo obtida a longevidade da esporulação e a taxa de extinção da esporulação. Foi verificada maior longevidade da esporulação nos restos foliares no período com temperaturas amenas, maior umidade relativa do ar e menor precipitação pluvial. Menor esporulação ocorreu quando os restos culturais foram incorporados a 10cm de profundidade. Quando comparados os sistemas de manejo convencional e orgânico, houve diferença na taxa de extinção da esporulação do patógeno quando a fonte de inóculo foi depositada nas profundidades de 5 e 10cm, sendo superior no solo sob manejo convencional, enquanto na superfície do solo não houve diferença. O manejo da alternariose em brócolos na região do estudo pode ser realizado pela incorporação dos restos foliares infectados no solo, à profundidade mínima de 10cm, visando a um intervalo mínimo de 60 dias entre cultivos de brássicas.

Palavras-chave: Brassica oleracea var. italica, alternariose, fonte de inóculo, esporulação.

ABSTRACT

The saprophytic survival of the fungus Alternaria brassicicola was investigated in leaf debris of broccoli (Brassica oleracea var. italica), at different depths of soil incorporation, periods of the year, and systems of soil management. Infected leaf debris were distributed in field plots, at the soil surface and

at depths of 5 and 10cm. Periodically, the debris in the bags were collected and conidia concentrations were quantified for longevity of spore production and extinction rate. Higher spore production longevity was observed on leaf debris in the period with lower temperatures, higher air relative humidity and lower rainfall. The lowest spore production occurred when leaf debris incorporation was made at 10cm depth. In relation to soil management systems, when the inoculum source was deposited at the soil surface no differences in the rate of spore production were observed, but at depths of 5 and 10cm, the rate was significantly higher in the soil under conventional management. The management of Alternaria black spot on broccoli at the area under study can be accomplished by incorporating infected leaf debris in the soil, at least 10cm depth, for no less than a 60-day interval in subsequent brassica plantings.

Key words: Brassica oleracea var. italica, Alternaria black spot, inoculum source, sporulation.

INTRODUÇÃO

A alternariose, causada por *Alternaria brassicicola* (Schwn.) Wilt. e *A. brassicae* (Berk.) Sacc., é considerada a doença mais comum e destrutiva das brássicas no mundo (HUMPHERSON-JONES, 1992; VERMA & SAHARAN, 1994).

No Brasil, *A. brassicicola* tem sido a espécie predominante em plantios de brássicas com alternariose (AZEVÊDO et al., 2000; RODRIGUES et al., 2004). Os sintomas da doença ocorrem principalmente em plantas adultas, nas folhas mais velhas, sob a forma de

Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. (EPAGRI), Estação Experimental de Urussanga, 88840-000, Urussanga, SC, Brasil. E-mail: lamperuch@epagri.rct-sc.br.

^{II}Departamento de Agronomia, Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: sami@ufrpe.br. Autor para correspondência.

14 Peruch & Michereff

manchas. Na fase inicial, são lesões marrom-escuras pequenas e necróticas e, posteriormente, tornam-se manchas circulares grandes, concêntricas e com halo clorótico. Essas lesões podem coalescer e, em ataques mais severos, as folhas amarelecem e secam (VERMA & SAHARAN, 1994).

As fontes de inóculo primário de *A. brassicicola* são as sementes infectadas e os restos culturais que permanecem na lavoura após a colheita. Nos restos culturais, *A. brassicicola* sobrevive saprofiticamente produzindo conídios, que constituem importante fonte de inóculo primário, principalmente em cultivos sucessivos (HUMPHERSON-JONES, 1992; VERMA & SAHARAN, 1994). A extinção da esporulação é um forte indicativo da extinção do inóculo de *A. brassicicola*, uma vez que, até o momento, não foi constatada a formação de estruturas de resistência por esse patógeno.

A longevidade da esporulação de *A. brassicicola* e *A. brassicae* em restos culturais de brássicas foi investigado na Inglaterra e na Índia. Na Inglaterra, em folhas de canola (*Brassica rapa*) e repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) distribuídas na superfície do solo em campo, lesões de *A. brassicicola* produziram esporos por até oito semanas em canola e 12 semanas em repolho, ambos no verão (HUMPHERSON-JONES, 1989). Na Índia, restos culturais de mostarda (*Brassica juncea*) e canola, naturalmente infectados com *A. brassicae*, foram incorporados no solo a 10cm de profundidade, sendo o patógeno recuperado mensalmente por até 12 meses, o tempo de duração do experimento (ANSARI et al., 1989).

Tendo em vista a inexistência de estudos dessa natureza nas condições brasileiras, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência saprofítica de *A. brassicicola* em restos foliares de brócolos em diferentes condições de manejo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados em dois experimentos na Estação Experimental de Urussanga da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. (EPAGRI), em Urussanga – SC (S 28° 31' - O 49° 19'; altitude: 48m), no período de maio de 2003 a janeiro de 2004. Durante os experimentos, foram monitoradas a temperatura do ar, a umidade relativa do ar e a precipitação pluvial, por uma estação meteorológica automática situada entre 100 e 800m das áreas experimentais.

Restos foliares de brócolos (cv. "Ramoso Piracicaba") com sintomas severos de alternariose

foram coletados em quatro ocasiões (maio, julho, outubro e novembro de 2003) num cultivo comercial sob manejo orgânico, sem a aplicação de fungicidas, no município de Paulo Lopes – SC. Mediante a análise microscópica da morfologia dos conídios presentes nas lesões, foi determinado que o cultivo estava infectado somente por *A. brassicicola* (ELLIS, 1971). Os restos foliares foram mantidos em sacos de papel, à temperatura de 5±1°C, por no máximo dois dias, durante a montagem dos experimentos. As folhas foram cortadas em peças de 49cm² e as áreas com sintomas marcadas com alfinetes coloridos, sendo acondicionadas em sacolas de polietileno de 100cm² perfuradas com malha de 1mm².

No primeiro experimento, foram estabelecidas quatro parcelas no campo, com 2,5m² cada parcela e distanciadas 5m em relação às bordas. O solo das parcelas foi classificado como Argissolo (43% argila), situado numa área de transição entre granito e diabásico (pH = 5.1 e matéria orgânica = 2.9%), cultivado previamente sob manejo convencional (adubação química, capina manual e aplicação de fungicidas e inseticidas) com abóbora e cebola. As sacolas com os restos foliares infectados foram distribuídas dentro de cada parcela nas profundidades de 0, 5 e 10cm em relação à superfície do solo, em dois períodos, maio (19/05/2003) e novembro (28/11/2003). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 2, representado por três profundidades do inóculo e dois períodos de distribuição das sacolas, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de uma sacola por parcela, contendo os fragmentos de folhas de brócolos com áreas doentes.

segundo experimento, foram estabelecidas quatro parcelas com as mesmas dimensões do primeiro experimento, em duas áreas experimentais, sendo uma cultivada sob manejo convencional e outra sob manejo orgânico. Na área convencional, o solo das parcelas era classificado como Argissolo (50% argila), situado numa área de transição entre granito e diabásico (pH= 4,7; matéria orgânica= 2,1%), cultivado previamente sob manejo convencional com mandioca e feijão. A área destinada à produção orgânica era explorada nesse sistema há cinco anos e atendia às exigências da Instrução Normativa nº 007, de 19/05/1999, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que dispõe sobre normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais. Nessa área, o solo das parcelas foi classificado como Argissolo (55% argila), situado numa área de transição entre granito e diabásico (pH= 4,9 e matéria orgânica= 2,5%) e havia sido cultivado previamente com aveia e milho, em rotação, pelo período de um ano, sem histórico de cultivo de brássicas. As sacolas com os restos foliares infectados foram distribuídas dentro de cada parcela nas profundidades de 0, 5 e 10cm em relação à superfície do solo, em dois períodos, julho (28/07/2003) e outubro (24/10/2003). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x3x2, composto por dois tipos de áreas de cultivo, três profundidades do inóculo e dois períodos de distribuição das sacolas, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de uma sacola por parcela.

As amostras de restos foliares foram avaliadas quanto à concentração de conídios de A. brassicicola no dia da distribuição das sacolas nas parcelas e a diferentes intervalos, até não ser mais detectada a presença de conídios em duas avaliações consecutivas. Em cada avaliação, a amostragem foi destrutiva, pela coleta das sacolas contendo os fragmentos de folhas na superfície do solo e desenterradas nas diferentes profundidades. De cada sacola, foram coletadas cinco amostradas de 1cm² dos tecidos com sintomas previamente marcados. As amostras foram enxaguadas em água destilada esterilizada para eliminar partículas de solo, secadas em papel toalha e depositada sobre uma lâmina de vidro. Essa foi acondicionada em câmara úmida, constituída de placa de Petri com duas camadas de papel de filtro umedecido em água destilada. Após 72 horas de incubação a 20±1°C sob escuro contínuo, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio com 10ml de solução de água destilada + Tween 20 (150ml de água + 3 gotas de Tween) e agitadas vigorosamente por 30 segundos. Após a retirada dos restos vegetais, a parte líquida foi submetida à centrifugação de 2000rpm por 10 min. Com a eliminação do sobrenadante, os conídios foram ressuspendidos e a concentração (conídios.cm⁻² de folha) determinada pela leitura em câmara de Neubauer.

Em cada experimento, os dados de concentração de conídios de **A. brassicicola** nos restos foliares foram utilizados para plotagem de curvas em relação ao tempo, bem como para cálculo da taxa de extinção da esporulação (TEE), pela expressão $TEE = -((logY_f - logY_o)/(T_f T_o))$, onde Y_o é a concentração inicial de conídios, Y_f a concentração de conídios na última avaliação antes de zerar, T_f o tempo (em dias) da última avaliação sem zerar e T_o o tempo da primeira avaliação (dia = 0) (KOCKS et al., 1998). Os dados foram submetidos à análise de variância e a separação de médias efetuada pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois experimentos em que foi analisada a sobrevivência saprofítica de A. brassicicola nos restos foliares de brócolos, as condições climáticas variaram entre os períodos de avaliação. No primeiro período, a temperatura do ar média (16,4°C e 15,8°C) e a precipitação pluviométrica diária média (2,3mm e 1,2mm) foram inferiores às verificadas no segundo período (temperatura = 22,6°C e 21,6°C; precipitação diária = 7,6mm e 2,9mm). Por outro lado, as médias de umidade relativa do ar verificadas no primeiro período I (85,7% e 79,5%) foram superiores às do segundo período (75,9% e 74,3%).

No primeiro experimento, realizado em solo previamente cultivado sob manejo convencional, a concentração do inóculo de A. brassicicola detectada nos restos foliares no dia da distribuição desses nas parcelas foi de 3,8x10⁵ e 9,4x10⁴ conídios.cm⁻² de folha, respectivamente, nos períodos de maio-julho e novembro-janeiro. O tempo necessário para extinção dos conídios do patógeno nos restos foliares foi maior no período iniciado em maio, independentemente da profundidade de deposição da fonte de inóculo (Figura 1A). Quando a fonte de inóculo foi depositada na superfície do solo, os conídios do patógeno foram detectados até 52 dias no período de maio-julho, enquanto até 21 dias no período de novembro-janeiro. Na profundidade de 5cm, o inóculo foi verificado por 21 dias no período de maio-julho e por 14 dias no período de novembro-janeiro. Com a deposição do inóculo a 10cm de profundidade, no período de novembro-janeiro, não foi possível a detecção de conídios aos sete dias, o mesmo não sendo verificado em relação ao período de maio-julho (Figura 1A).

Quando analisada a taxa de extinção da esporulação (*TEE*), foi constatada interação significativa entre períodos e profundidades de deposição da fonte de inóculo (Tabela 1). Não houve diferença na *TEE* entre 0 e 5cm de profundidade do inóculo dentro de cada período. Por outro lado, quando a fonte de inóculo foi depositada a 10cm de profundidade, a *TEE* foi superior às demais profundidades nos dois períodos. Somente nessa profundidade houve diferença significativa na *TEE* entre os dois períodos de deposição do inóculo, sendo superior no período de novembro-janeiro (Tabela 1).

No segundo experimento, realizado em solos previamente cultivados sob manejo convencional e orgânico, a concentração inicial do inóculo de *A. brassicicola* detectada nos restos foliares foi de 2,8x10⁵ e 3,1x10⁵ conídios.cm⁻² de folha, respectivamente, nos períodos de julho-setembro e outubro-novembro. A

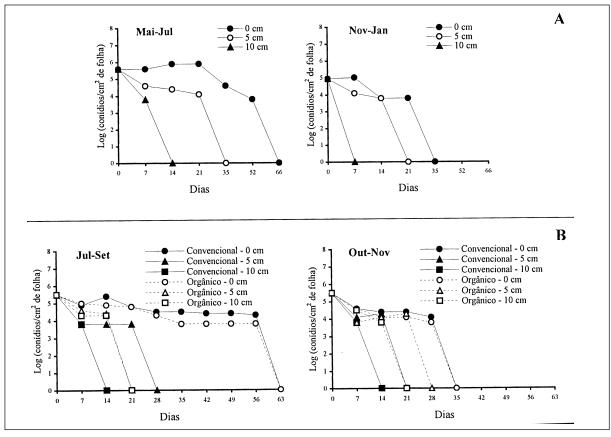


Figura 1 – Esporulação de *Alternaria brassicicola* em restos foliares de brócolos distribuídos em solo: A) Sob manejo convencional em três profundidades e dois períodos (mai-jul/2003; nov/2003-jan/2004); B) Sob manejo convencional e orgânico em três profundidades e dois períodos (jul-set/2003; out-nov/2003). Urussanga – SC.

exemplo do verificado no primeiro experimento, o tempo necessário para extinção dos conídios do patógeno nos restos foliares foi maior no primeiro período (julhosetembro), independentemente dos solos terem sido cultivados sob manejo convencional ou orgânico (Figura 1B). Quando a fonte de inóculo foi depositada

Tabela 1 - Taxa de extinção da esporulação de *Alternaria*brassicicola (TEE)¹ em restos foliares de brócolos
distribuídos em solo sob manejo convencional em
três profundidades e dois períodos, em Urussanga,
SC

Profundidade (cm) -	Taxa de extinção da esporulação – TEE [log (conídios)/dia] ¹		
	mai-jul	nov-jan	
0	0.036 bA^3	0.059 bA	
5	0,036 bA 0,074 bA	0,039 bA 0,089 bA	
10	0,178 aA	0,364 aB	

¹Calculada conforme KOCKS et al. (1998). ²Média de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan (P=0,05). na superfície do solo, os conídios do patógeno foram detectados até 56 dias no período julho-setembro, mas somente até 28 dias no período outubro-novembro. Na profundidade de 5cm, o inóculo do patógeno foi verificado por até 14 dias no solo sob manejo convencional e por até 21 dias no solo sob manejo orgânico. Com a deposição do inóculo a 10cm de profundidade, nos dois períodos, foi possível a detecção de conídios por apenas sete dias no solo sob manejo convencional e por 14 dias no solo sob manejo orgânico (Figura 1B).

Foram constatadas interações na *TEE* entre sistemas de manejo e profundidades de deposição da fonte de inóculo, bem como entre períodos e profundidades de deposição do inóculo (Tabela 2). Em todas as situações avaliadas, a *TEE* aumentou com o aumento da profundidade de deposição da fonte de inóculo. Quando a fonte de inóculo foi depositada na superfície do solo, não houve diferença na *TEE* entre os solos sob manejo convencional e orgânico. No entanto, nas profundidades de 5 e 10cm, a *TEE* foi significativamente superior no solo sob manejo convencional. Com a deposição do inóculo na

Tabela 2 - Taxa de extinção da esporulação de *Alternaria brassicicola* (*TEE*)¹ em restos foliares de brócolos distribuídos em solos sob manejo convencional e orgânico em três profundidades e dois períodos, em Urussanga – SC.

Profundidade (cm)	Taxa de extinção da esporulação – TEE [log (conídios)/dia] ¹			
	sistema de manejo		período de deposição do inóculo ²	
	convencional	orgânico	jul-set	out-nov
0	$0,038 \text{ cA}^3$	0,042 cA	0,027 cB	0,054 cA
5	0,086 bA	0,063 bB	0,074 bA	0,074 bA
10	0,213 aA	0,099 aB	0,122 aB	0,190 aA

¹Calculada conforme KOCKS et al. (1998).

superfície do solo e a 10cm de profundidade, a *TEE* foi inferior no período julho-setembro, enquanto a 5cm de profundidade não houve diferença significativa entre os dois períodos (Tabela 2).

Os resultados deste estudo demonstram que restos foliares de brócolos podem ser importantes fontes de inóculo de A. brassicicola, dependendo das condições ambientais, da profundidade de incorporação dos restos e do sistema de manejo do solo. Como A. brassicicola é um patógeno necrotrófico com elevada dependência nutricional pelo substrato que está colonizando, o nível de degradação desse substrato exerce influência direta na longevidade do inóculo (VERMA & SAHARAN, 1994). As diferenças nos tempos e nas taxas de extinção da esporulação verificadas neste estudo podem ser resultantes de diferenças no período necessário para a degradação biológica dos restos foliares. A maior longevidade da esporulação nos restos foliares no primeiro período, nos dois experimentos, na maioria das situações, pode estar associada à ocorrência de temperaturas mais amenas, à maior umidade relativa do ar e à menor precipitação pluvial que no segundo período. Temperaturas amenas reduzem a atividade microbiana e a taxa de degradação, enquanto temperaturas elevadas provocam o oposto (BAIRD et al., 1999).

A umidade relativa do ar afeta a sobrevivência de *A. brassicicola* em restos culturais de brássicas depositados na superfície do solo, pois, sendo mais elevada, propicia condições ideais para aumentar a produção de esporos (HUMPHERSONJONES, 1989). Por outro lado, o efeito da precipitação pluviométrica na sobrevivência de patógenos necrotróficos é indireto, tendo em vista que afeta mais intensamente a umidade do solo e a taxa de degradação dos restos culturais incorporados, pelo estímulo à atividade microbiana. A acelerada destruição de

espécies patogênicas de *Alternaria* em restos culturais incorporados em solos úmidos tem sido atribuída à pobre habilidade de competição saprofítica, tendo em vista que os saprófitos habitantes do solo são mais hábeis para colonizar o substrato, produzir antibióticos e tolerar antibióticos produzidos por competidores (ROTEM, 1994).

A profundidade de incorporação dos restos foliares de brócolos infectados influiu diretamente na esporulação de A. brassicicola, ilustrando o efeito benéfico da incorporação na redução da capacidade de resíduos infestados suportarem a sobrevivência do patógeno. A incorporação dos restos foliares a 10cm de profundidade teve um efeito marcante na redução da esporulação de A. brassicicola e deve ser preferida em relação a incorporações mais superficiais. Esse efeito se deve, provavelmente, ao maior contato dos restos culturais com o ambiente do solo, o que acelerou o processo de degradação biológica da fonte de inóculo. Nesta profundidade, as flutuações ambientais são menos bruscas, propiciando maior equilíbrio na população e atividade microbiana, refletindo-se na decomposição mais acelerada dos restos e na menor sobrevivência do patógeno. Além disso, a incorporação a 10cm ou mais propicia a perda mais rápida da viabilidade dos conídios por submetêlos a uma maior umidade do solo, que é mais pronunciada à medida que aumenta a profundidade (REIS, 1984).

A similaridade nas taxas de extinção da esporulação de *A. brassicicola* quando os restos foliares de brócolos foram depositados na superfície dos solos sob manejo convencional e orgânico pode ser decorrente da pequena atividade de microrganismos degradadores nesse habitat, que aumenta gradativamente até 10cm de profundidade (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Por outro lado, é surpreendente

²Média de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, dentro de sistema de cultivo e período, não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan (P=0,05).

18 Peruch & Michereff

que as taxas de extinção da esporulação no solo sob manejo convencional tenham sido superiores às verificadas no solo sob manejo orgânico, uma vez que maior atividade microbiana é freqüentemente associada a solos submetidos a este último tipo de manejo. Como não existem estudos sobre a influência de sistemas de manejo orgânico na degradação de restos culturais infectados incorporados ao solo, esta abordagem é apenas especulativa, indicando a necessidade de mais estudos sobre o tema.

CONCLUSÕES

O manejo da alternariose em brócolos na região do estudo pode ser realizado pela incorporação dos restos foliares infectados no solo, à profundidade mínima de 10cm, visando a um intervalo mínimo de 60 dias entre cultivos de brássicas, tendo em vista que o período máximo para extinção da esporulação de *A. brassicicola* foi de 56 dias. A adoção destas práticas pode ser mais importante em épocas com temperaturas amenas, como no outono e no inverno, quando a degradação dos restos culturais pode ser mais lenta que em épocas quentes.

APRESENTAÇÃO

Parte da Tese de Doutorado em Fitopatologia do primeiro autor, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

ANSARI, N.A. et al. Survival and perpetuation of *Alternaria brassicae* causing Alternaria blight of oil seed crucifers. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.105, n.1, p.67-70, 1989.

AZEVÊDO, S.S. et al. Levantamento da intensidade da podridão negra e da alternariose do repolho no Agreste de Pernambuco e determinação do tamanho das amostras para quantificação dessas doenças. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.3, p.299-306, 2000.

BAIRD, R.E. et al. Relative longevity of *Leptosphaeria maculans* and associated mycobiota on canola debris. **Phytoprotection**, Sante-Foy, v.80, n.1, p.1-11, 1999.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 512p.

HUMPHERSON-JONES, F.M. Survival of *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola* on crop debris of oilseed rape and cabbage. **Annals of Applied Biology**, London, v.115, n.1, p.45-50, 1989.

HUMPHERSON-JONES, F.M. Epidemiology and control of dark leaf spot of brassicas. In: CHELKOWSKI, J.; VISCONTI, A. (Eds). *Alternaria*: biology, plant diseases and metabolites. Amsterdam: Elsevier, 1992. p.267-288.

KOCKS, C.G. et al. Survival and extinction of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in soil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.104, n.9, p.911-923, 1998.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 2002. 626p.

REIS, E.M. Efeito da incorporação e do tipo de restos culturais de trigo na multiplicação de *Helminthosporium sativum*, no solo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, n.3, p.537-541, 1984.

RODRIGUES, V.J.L.B. et al. Epidemiologia comparativa da alternariose em cultivares de brássicas sob cultivo convencional e orgânico. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.2, p.226-233, 2004.

ROTEM, J. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. St. Paul: APS, 1994. 326p.

VERMA, P.R.; SAHARAN, G.S. **Monograph on** *Alternaria* **diseases of crucifers**. Saskatoon: Minister of Supply and Services Canada, 1994. 162p.