



Bol. de Pesquisa 8 **Desenvolvimento**

ISSN 1676 - 1340
Novembro, 2001

FOL 05429
2001
FL-5429

**do de Classificação de Espécies
de *Alternaria* spp. Patogênicas a
Senna obtusifolia com base na
Morfologia de Conídios e nos Perfis
Isoenzimáticos dos Isolados**

República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Bonifacio Hideyuki Nakasu
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Luiz Antonio Barreto de Castro
Chefe-Geral

Arthur da Silva Mariante
Chefe-Adjunto de Administração

Bonifacio Peixoto Magalhães
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Manuel Cabral Sousa Dias
Chefe-Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio

Embrapa

ISSN 1676 - 1340

Novembro, 2001

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

***Boletim de Pesquisa
e Desenvolvimento 8***

**Método de Classificação de
Espécies de *Alternaria* spp.
Patogênicas a *Senna obtusifolia*
com base na Morfologia de
Conídios e nos Perfis
Isoenzimáticos dos Isolados**

Sueli C. M. Mello
Zilda M. A. Ribeiro
Gutemberg R. Sousa
Myrian S. Tigano
Glaucia de F. Naghtigal
Eliana Maria G. Fontes

Brasília, DF
2001

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

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

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Edson Junqueira Leite

José Roberto de Alencar Moreira

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Revisor de texto: Felisberto de Almeida e Miraci de A.C. Pontual

Normalização bibliográfica: Maria Lara Pereira Machado

Sérgio Souza Santos

Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva

Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2001): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

MELLO, S. C. M.; RIBEIRO, Z. M. A.; SOUSA, G. R.; TIGANO, M. S.; NAGHTIGAL, G. de F.; FONTES, E. M. G. **Método de classificação de espécies de *Alternaria* spp. patogênicas a *Senna obtusifolia* com base na morfologia de conídios e nos perfis isoenzimáticos dos isolados.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 16p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 8).

ISSN 1676 - 1340

1. Alternaria-classificação 2. Patógeno 3. Senna obtusifolia-planta daninha 4. Biocontrole I. Ribeiro, Z. M. A. II. Sousa, G. R. III. Tigano, M. S. IV. Naghtigal, G. de F. V. Fontes, E. M. G. VI. Título VII. Série.

CDD 632.424

© Embrapa 2001

Autores

Sueli C. M. Mello

Eng. Agr^a. PhD., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Zilda M. A. Ribeiro

Bióloga MSc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Gutemberg R. Sousa

Biólogo, Bolsista do RHAE

Myrian S. Tigano

Eng. Agr^a. PhD., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Glaucia de F. Naghtigal

Eng. Agr^a, PhD., Universidade Camilo Castelo Branco

Eliana Maria G. Fontes

Bióloga, PhD., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	12
Conclusões	14
Referências Bibliográficas	15

Entrada

Invidade Emergen

Refer aquisição

Data aquisição 2002

N.º N. Fiscalizadora

Fornecedor

N.º OCS Doacao

Origem EOL 05429

Método de Classificação de Espécies de *Alternaria* spp. Patogênicas a *Senna obtusifolia* com base na Morfologia de Conídios e nos Perfis Isoenzimáticos dos Isolados

Resumo

Isolados de *Alternaria* spp. patogênicos ao fedegoso (*Senna obtusifolia*) foram comparados quanto aos aspectos morfológicos e padrões isoenzimáticos, em gel de poliacrilamida. Com base nas características culturais, morfologia e morfometria de conídios, verificou-se que 11 dos 13 isolados pertenciam à espécie *A. cassiae* e os outros dois, à *A. alternata*. Os resultados da análise eletroforética corroboraram as informações obtidas por meio de critérios morfológicos. Portanto, esta técnica tem potencial para ser usada na separação destas espécies de *Alternaria*. A ocorrência de mais de uma espécie deste gênero fúngico em *S. obtusifolia* foi constatada, ampliando o número de patógenos a serem avaliados no programa de desenvolvimento de um bioherbicida para esta espécie de planta daninha.

Palavras chaves: biocontrole, patógeno, planta daninha e caracterização.

Method for Identification of *Alternaria* spp. species pathogenic to *Senna obtusifolia* based on conidial morphology and isozyme patterns

Abstract

Alternaria spp. isolates pathogenic to sicklepod (*Senna obtusifolia*) were characterized based on morphological aspects and acrylamide-gel electrophoresis. Colonial morphology, conidial shape and morphometry showed that 11 of the 13 isolates belong to *A. cassiae*. The other two isolates belong to *A. alternata*. Electrophoresis patterns confirmed the results of morphological criteria, because they allowed us to distinguish the analysed species. Therefore, it was considered that electrophoretic analysis is a potential technique for differentiation of *Alternaria* species. The occurrence of more than one species of this fungus infecting *S. obtusifolia* was found, widening the range of suitable pathogens to be evaluated in bioherbicide programs for sicklepod control.

Key words: biocontrol, pathogen, weeds and characterization

Introdução

Um grande número de espécies de *Alternaria* tem sido relatado causando manchas foliares em diversas plantas cultivadas e não cultivadas, dentre estas, várias espécies daninhas que infestam culturas economicamente importantes. Existem vários programas de desenvolvimento de bioherbicidas, em todo o mundo, utilizando espécies desse gênero fúngico. Um bioherbicida foi desenvolvido a partir de *A. cassiae* Jurair & Khan (Simmons, 1982) e registrado nos Estados Unidos para controle do fedegoso (*Senna obtusifolia* L.) (Charudattan, 1996). No Brasil, onde esta planta daninha vem-se tornando um sério problema, particularmente em áreas cultivadas com soja, um isolado de *A. cassiae*, coletado no Distrito Federal (DF), demonstrou grande potencial para ser utilizado contra biotipos brasileiros desta planta (Figueiredo et al., 1992). Outros isolados de *Alternaria* spp. foram obtidos de folhas e hastes de *S. obtusifolia*, coletadas em áreas do DF, em diferentes ocasiões, e incorporados à Coleção de Fungos Agentes de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Este trabalho teve como objetivo comparar esses isolados de *Alternaria* spp. coletados no Distrito Federal quanto às características morfológicas e com base na análise de isoenzimas em gel de poliacrilamida.

Material e Métodos

Foram utilizadas culturas monospóricas de 13 isolados de *Alternaria* spp. (Tabela 1), dentre os quais, o isolado CG594, anteriormente identificado como *A. cassiae* (Figueiredo et al., 1992). Estes isolados foram previamente avaliados quanto à patogenicidade, nas hospedeiras originais, e mantidos em tubos de ensaio contendo o meio de batata-dextrose-agar (BDA) a 4°C. Um isolado de *A. solani* (As), obtido de tomate, cedido pela Embrapa-Hortaliças, Brasília, DF, foi incluído como referência desta espécie.

Para os estudos morfológicos, colônias foram desenvolvidas em placas de Petri contendo BDA, a 28°C, sob fotoperíodo de 12 h. O fotoperíodo foi simulado por meio de quatro lâmpadas fluorescentes de 20W, luz do dia, instaladas na porta da incubadora tipo BOD (Nova Técnica, modelo NT 708 - AT). Observações quanto ao aspecto de micélio aéreo e submerso, bem como de presença de esporulação, foram feitas durante o período de cultivo.

Tabela 1. Morfometria de conídios de isolados de *Alternaria cassiae* e *A. alternata*.

Isolado	Conídios (µm) ³	Conídios (µm) ⁴	Conídios + bico (µm) ⁵	Conídios (µm) ⁶	Septos transversais (µm) ⁴
CG594 ¹	90,2-241,4 x 12,2-26,8	65,5 b	141,3 cd	18,7 bc	6,872 bcd
CG598 ²	26,8-09,7 x 9,7-17	27,4 e	55,7 g	12,8 g	3,925 g
CG600 ¹	97,5-180,5 x 9,7-21,9	58,4 c	144,4 cd	15,0 f	6,825 cd
CG601 ¹	148,7-19,5 x 17,0-21,9	70,1 a	178,7 a	20,3 a	7,525 a
CG603 ¹	100-226,9 x 12,2-29,3	64,4 b	153,2 bc	19,3 ab	7,625 a
CG604 ²	36,6-92,7 x 7,3-14,6	28,3 e	57,1 g	11,4 h	4,775 f
CG606 ¹	65,9-231,7 x 9,7-19,5	55,4 c	163,0 b	14,8 f	7,125 abc
CG607 ¹	92,6-190,2 x 12,2-26,8	66,4 ab	139,3 d	16,5 de	7,400 ab
CG609 ¹	92,7-139 x 14,6-24,4	58,8 c	112,4 f	19,5 ab	6,175 e
CG610 ¹	107,3-46,3 x 12,2-24,4	49,5 d	136,2 d	17,9 c	6,150 e
CG611 ¹	107,3-07,3 x 9,7-21,9	54,3 c	164,4 b	16,0 ef	6,475 de
CG615 ¹	75,6-180,5 x 12,2-19,5	54,7 c	120,2 ef	15,0 f	7,675 a
CG616 ¹	100-160,9 x 14,6-24,4	57,8 c	131,9 de	17,5 cd	6,878 bcd
C.V. (%)		0,1671	0,2169	0,1691	0,1764

(1) Isolados identificados como *A. cassiae*.
(2) Isolados identificados como *A. alternata*.
(3) Valores mínimo e máximo encontrados para comprimento e largura de 40 conídios, tomados ao acaso.
(4) Comprimento médio de 40 conídios, tomados ao acaso.
(5) Largura média de 40 estruturas, tomadas ao acaso.
(6) Número médio de septos de 40 conídios, tomados ao acaso.

Após 10 dias de crescimento, as colônias tiveram seu micélio aéreo removido e foram expostas ao ar, para esporulação.

As estruturas dos fungos foram montadas em lâminas com glicerol + KOH e observadas ao microscópio de luz. De cada isolado, foram utilizados 40 esporos para contagem de septos e medições do comprimento do conídio, comprimento total (conídio + bico) e largura do conídio. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Duncan, por meio do pacote estatístico MSTATC (Russel P. Feed, Michigan State University).

Para análise de isoenzimas, o micélio para extração de proteínas foi produzido em meio semi-sintético preparado a partir de 10 g de sacarose, 2 g de L-asparagina, 2 g de extrato de levedura, 1 g de KH₂PO₄, 0,1 g de MgSO₄·7H₂O, 0,44 mg ZnSO₄·7H₂O, 0,48 mg FeCl₃·6 H₂O, 0,36 mg MnCl₂·H₂O em 1 l de água destilada, pH 5,3 (Alfenas et al., 1991). Frascos Erlenmeyers, contendo 50 ml do meio receberam cinco discos de micélio retirados de colônias com sete dias de idade. Os frascos foram mantidos em estufa incubadora tipo BOD (descrita na página anterior) a 28°C, no escuro, durante 14 dias. Após este período, o micélio foi coletado por filtração através de papel de filtro (Whatman® N° 1), lavado várias vezes em água destilada esterilizada e, quando não utilizado imediatamente, conservado a -80°C.

Para extração das proteínas e realização da eletroforese, seguiram-se os procedimentos descritos por Alfenas et al. (1991). Testaram-se os seguintes sistemas enzimáticos: Enzima Málica (ME) EC 1.1.1.40, Esterase (EST) EC 3.1.1.1., Sorbitol Desidrogenase (SDH) EC 1.1.1.14, Menadiona Redutase (MR) EC 1.6.99.2, Fosfatase Alcalina (ALP) EC 3.1.3.1, 6-Fosfogluconato Desidrogenase (PGDH) EC 1.1.1.44, Manitol Desidrogenase (MADH) EC 1.1.1.67, Fosfatase ácida (ACP) EC 3.1.3.2, Diaforase (DIA) EC 1.8.1.4, Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase (NADHDH) EC 1.6.99.3, Superóxido Dismutase (SOD) EC 1.15.1.1, Polifenoloxidase (PPO) EC 1.14.18.1, Álcool Desidrogenase (ADH) EC 1.1.1.1, b-Galactose Desidrogenase (GLDH) EC 1.1.1.48 e Malato Desidrogenase (MDH) EC 1.1.1.37. Após a eletroforese, os géis foram corados para detecção de atividade isoenzimática, conforme Alfenas et al. (1991).

A partir dos fenótipos isoenzimáticos encontrados, os isolados foram agrupados pelo método não ponderado de agrupamento aos pares U.P.G.M.A

("Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages), utilizando-se o pacote NTSYS-pc para taxonomia numérica e análise multivariada (Rohlf, 1992). A matriz de similaridade foi calculada pelo coeficiente de Jaccard.

Resultados e Discussão

Todos os isolados cresceram prontamente em BDA, sendo as colônias características do gênero *Alternaria*, de acordo com a descrição feita por Ellis (1971). As colônias dos isolados CG598 e CG604 cresceram rapidamente, tomando toda a superfície da placa, de forma irregular e esporularam profusamente, durante o período de incubação, sem exigir nenhum tratamento estressante. Entretanto, os outros isolados formaram colônias circulares, não esporulantes e somente produziram esporos após escarificação do micélio superficial e exposição ao ar.

A análise estatística das características dos conídios estudadas revelou diferença significativa ($p=0,05$) entre os isolados (Tabela). Os isolados CG598 e CG604 apresentaram os menores valores médios de comprimento de conídios, comprimento de conídios + bico e largura de conídios, para os quais não se verificaram diferenças significativas entre si, tendo entretanto, diferido dos demais isolados. No tocante ao número de septos transversais dos conídios, embora tenha sido detectada diferença significativa entre estes dois isolados, ambos apresentaram os menores valores médios. Nos testes de patogenicidade previamente realizados, estes dois isolados também se mostraram menos agressivos a plântulas de fedegoso (dados não publicados). Embora o comprimento dos conídios tenha diferido da descrição de Ellis (1971) no seu limite superior, as demais características observadas levaram a identificá-los como pertencentes à espécie *A. alternata*.

Os demais isolados, apesar de, em alguns casos, terem diferido significativamente entre si, ao nível de 0,05 de probabilidade, com relação às características estudadas (Tabela), mostraram-se semelhantes quanto ao crescimento, morfologia de colônias e esporulação, que foram de acordo com a descrição feita por Simmons (1982) para a espécie *A. cassiae*. As diferenças verificadas podem ser atribuídas a vários fatores, dentre os quais, a idade do conídio (Simmons, 1982).

O fungo *A. alternata* tem sido relatado como saprófita e também como agente patogênico em muitas plantas (Ellis, 1971), incluindo algumas espécies daninhas como *Abutilon theophrasti* (Kremer, 1986), *Centaurea maculosa* (Strobel, 1991), *Datura stramonium* (Abbas et al., 1993) e *Epilobium angustifolium* (Winder & Watson, 1994), e como produtora de fitotoxinas com propriedades herbicidas (Abbas et al., 1993). A ocorrência desta espécie em *S. obtusifolia*, constatada neste trabalho, amplia o número de patógenos a serem avaliados no programa de bioherbicida para essa planta daninha.

No tocante aos perfis isoenzimáticos, dentre as 16 enzimas estudadas, ADH, GLDH e MDH foram as únicas que não apresentaram atividade. Entretanto, para a análise dos perfis dos isolados, foram utilizadas apenas as enzimas ACP, ALP, PPO, EST e SOD, que apresentaram melhor resolução e reprodutibilidade.

O agrupamento dos isolados, segundo os fenótipos isoenzimáticos apresentados, sugeriu a existência de três grupos distintos: grupo I, constituído apenas pelo isolado de *A. solani*; grupo II, abrangendo os 11 isolados identificados, com base na morfologia, como pertencentes à espécie *A. cassiae*; grupo III, constituído pelos isolados CG598 e CG604, classificados como pertencentes à espécie *A. alternata* (Fig. 1). Portanto, os padrões eletroforéticos permitiram separar as espécies analisadas, corroborando as informações obtidas a partir de critérios morfológicos.

A caracterização dos isolados ao nível de espécie, baseada em critérios morfológicos, constitui-se tarefa árdua, exigindo grande disponibilidade de tempo, sendo assim pouco prática para uso nos programas de desenvolvimento de bioherbicidas. Entretanto, análise de isoenzimas, que é uma técnica simples, eficiente e de baixo custo, mostrou-se, neste trabalho, ser útil para separação das espécies de *Alternaria* spp. patogênicas a *S. obtusifolia*, ainda que, para aplicação prática em controle de qualidade e monitoramentos de campo, torna-se necessária a caracterização de outras espécies e utilização de um maior número de isolados.

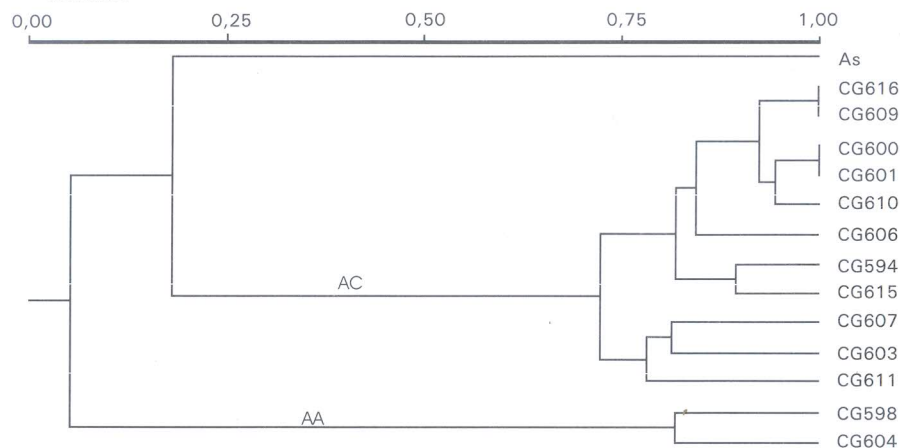


Fig. 1. Dendrograma de isolados de *Alternaria* spp. patogênicos a *Senna obtusifolia* obtidos pelo método não ponderado de agrupamento aos pares, a partir dos fenótipos isoenzimáticos, onde: As = *A. solani*, previamente identificado; Ac = *A. cassiae* (CG616, CG609, CG600, CG601, CG610, CG606, CG594, CG615, CG607, CG603 e CG611) e AA = *A. alternata* (CG598 e CG604).

Conclusões

1. Os resultados da análise eletroforética corroboraram as informações obtidas por meio de critérios morfológicos, indicando a utilidade dessa técnica para separação de espécie de *Alternaria*.
2. Foi constatada a ocorrência da espécie *Alternaria alternata*, patogênica a *S. obtusifolia*, ampliando o número de patógenos do gênero *Alternaria* a serem avaliados no programa de desenvolvimento de um bioherbicida para esta espécie de planta daninha.

Referências Bibliográficas

- ABBAS, H. K.; VESONDER, R. F.; BOYETTE, C. D.; PETERSON, S. W. Phytotoxicity of AAL-toxin and other compounds produced by *Alternaria alternata* to jimsonweed (*Datura stramonium*). **Canadian Journal of Botany**, v.71, p.155-160, 1993.
- ABBAS, H. K.; DUKE, S. O.; PAUL, R. N.; RYLEY, R. T.; TANAKA, T. AAL- toxin, a potent natural herbicide which disrupts sphingolipid metabolism of plants. **Pesticide-Science**, v.43, n.3, p.181-187, 1995.
- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242 p.
- CHARUDATTAN, R. Biological control of weeds: an international overview. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., 1996, Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Londrina: EMBRAPA - CNPSo/COBRAFI, 1996. p.270-282.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.
- FIGUEIREDO, G. de; FONTES, E. G.; TEIXEIRA, C. A. D.; PAIS, J. S. Levantamento e seleção de patógenos para o controle biológico de fedegoso (*Senna obtusifolia* : Leguminosae). **Fitopatologia Brasileira**, v.17, n.169, 1992.
- KREMER, R. J. Microorganisms associated with velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) seeds on soil surface. **Weed Science**, v.34, p.233-236, 1986.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York: Applied Biostatistics, 1992. não paginado.
- SIMMONS, E. G. *Alternaria* themes and variations (7-10). **Mycotaxon**, v.14, p.17-43, 1982.
- STROBEL, G. A. Biological control of weeds. **Scientific American**, v.265, n.1, p.50-60, jul. 1991.

Método de Classificação de Espécies de *Alternaria* spp. Patogênicas a *Senna obtusifolia* com base na Morfologia de Conídios e nos Perfis Isoenzimáticos dos Isolados

WINDER, R. S.; WATSON, A. K. A potential microbial control for fireweed (*Epilobium angustifolium*). **Phytoprotection**, v.75, p.19-33, 1994.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

Método de classificação de ...
2001

FL-5429



CENARGEN- 19322-1

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**

