

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS DE *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei¹

Adriana Teramoto², Marise Cagnin Martins³, Marcos Gomes Cunha²

ABSTRACT

EVALUATION OF METHODS FOR PRESERVING *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei ISOLATES

Corynespora cassiicola (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei is the causal agent for target spot on several economically important crops. So, studies on the *C. cassiicola* isolates preservation are necessary to maintain mycelium growth and sporulation, during experiments. The objective of this study was to evaluate the efficiency of three isolates preserving methods: Castellani, periodical transference, and mineral oil, during six months of storage. The evaluations were carried out by analyzing mycelial growth on potato-dextrose-agar medium. It was observed that mycelial growth was higher in the periodical transference method, sporulation was a little higher in the Castellani method, and all methods preserved isolates pathogenicity. Thus, for that phytopathogen, the Castellani method is the most recommended one.

KEY-WORDS: Mycelial growth; sporulation; target spot.

A determinação do melhor método para preservação de isolados é um aspecto de grande importância, uma vez que a utilização destes pode variar, no decorrer dos experimentos, mantendo ativos o potencial de crescimento micelial e a esporulação.

Os métodos de repicagens periódicas, óleo mineral, Castellani ou água destilada e liofilização são utilizados em institutos de pesquisas, como o Instituto Biológico de Campinas, para preservação de fitopatógenos fúngicos, apresentando bons resultados, para longos períodos de preservação (Finatti & Aparecido 2009). Outros métodos, como o de sílica-gel, grãos de cereais esterilizados, solo e turfa esterilizados, também podem ser empregados (Silva et al. 2010).

Assim, de acordo com os equipamentos e materiais disponíveis no laboratório, foram escolhidos,

RESUMO

O fungo *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei é o agente causal da mancha alvo, em diversas culturas de importância econômica. Assim, estudos de preservação de isolados de *C. cassiicola*, que possam manter viáveis isolados do patógeno, durante experimentos, são necessários. O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de três métodos de preservação de isolados: Castellani, repicagens periódicas e óleo mineral, durante seis meses de armazenamento. As avaliações foram efetuadas por meio de análise do desenvolvimento do fungo, em meio de cultivo contendo batata-dextrose-ágar. Constatou-se que o crescimento micelial foi maior para o método de repicagens periódicas; a esporulação, no método Castellani, foi um pouco superior à dos demais métodos; e todos os métodos propiciaram a preservação da patogenicidade dos isolados estudados. Desta forma, recomenda-se, para este fitopatógeno, o método de preservação Castellani.

PALAVRAS-CHAVE: Crescimento micelial; esporulação; mancha alvo.

para a realização deste estudo, os métodos de repicagens periódicas, Castellani ou água destilada e óleo mineral, com o objetivo de avaliar a eficiência destes, na preservação de dez isolados de *Corynespora cassiicola*, pelo período de seis meses.

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Pesquisa em Fitopatologia da Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia (GO), de outubro de 2006 a março de 2007. Discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro, dos isolados de *C. cassiicola* provenientes de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) (PESP01, PESP02, PESP04, PESP05 e PESP06), acerola (*Malpighia emarginata* L.) (ACSP01), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (ALSP01), café (*Coffea canephora* cv. *conilon* L.) (CAES01), hortênsia

1. Trabalho recebido em dez./2010 e aceito para publicação em jun./2011 (nº registro: PAT 12571/ DOI: 10.5216/pat.v41i2.12571).

2. Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Goiânia, GO, Brasil.

E-mails: adritera@terra.com.br, mgc@agro.ufg.br.

3. Instituto Biológico, Campinas, SP, Brasil. E-mail: marise@biologico.sp.gov.br.

[*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.] (HOPA01) e soja (*Glycine max* L.) (SOMA02), foram submetidos aos seguintes tratamentos, decorridos dez dias da repicagem: a) método Castellani (Castellani 1939 apud Figueiredo 1967): foram depositados cinco discos de micélio por frasco de 20 mL, contendo 5 mL de água destilada esterilizada; b) método de repicagens periódicas (Figueiredo & Pimentel 1989, Dhingra & Sinclair 1995): um disco de micélio de cada isolado foi repicado, para tubo de ensaio contendo meio BDA inclinado; c) método do óleo mineral (Sherf 1943 apud Lima 1991): um disco de micélio de cada isolado foi repicado, para vidro do tipo penicilina, contendo meio BDA. Esperou-se o crescimento micelial do patógeno, por três a quatro dias, para recobri-lo com óleo mineral esterilizado.

Todos os tratamentos constaram de três repetições, sendo mantidos sob refrigeração ($\pm 10^{\circ}\text{C}$), durante seis meses. Após este período, discos de micélio de todas as repetições foram repicados, para meio de cultura BDA, mantidos a 25°C e em regime de luz alternada (12 horas de luz/12 horas de escuro). Em seguida, foi observado o crescimento micelial, tomando-se as medidas de dois diâmetros transversais da colônia fúngica, após, aproximadamente, dez dias. O número de esporos produzidos por cada isolado foi determinado com auxílio da câmara de Neubauer. Para cada isolado, utilizaram-se três placas de Petri (três repetições).

Também foi testada a patogenicidade de cada isolado, para cada tratamento, inoculando-os em mudas de pepino (híbrido Nikkey), acerola (propagada por semente, sem variedade definida), algodão (var. Delta Opal), café (cv. Catuaí Vermelho), hortênsia (propagada por estaquia, sem variedade definida) e soja (cv. BRS Valiosa), respectivamente.

A suspensão foi ajustada para 10^4 esporos mL^{-1} e pulverizada em ambas as faces das folhas, até o ponto de escorrimento superficial. As plantas inoculadas foram submetidas a 24 horas de câmara úmida e mantidas em casa-de-vegetação, por, aproximadamente, sete dias. Para avaliação da manutenção de patogenicidade dos isolados, foram utilizados três vasos com duas plantas, no caso do pepino, algodão e soja, e três mudas, para aceroleira, cafeeiro e hortênsia. Após o surgimento dos sintomas, foi realizado reisolamento, para confirmação do agente causal. Todos os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5%.

O método de repicagem periódica foi o método de preservação que permitiu maior crescimento micelial, para todos os isolados, seguido do Castellani e do óleo mineral. O método Castellani foi desfavorável apenas para um isolado proveniente de pepineiro (PESP01), um de aceroleira (ACSP01) e um de cafeeiro (CAES01), enquanto o método do óleo mineral desfavoreceu dois isolados provenientes de pepineiro (PESP02 e PESP06), um de aceroleira (ACSP01) e um de soja (SOMA02).

Com relação à esporulação, diferenças foram observadas entre os três métodos de preservação testados: o método de repicagem periódica proporcionou maior esporulação, para o isolado de pepineiro PESP04 e de soja SOMA02, e o método Castellani favoreceu dois isolados de pepineiro (PESP05 e PESP06) e o de hortênsia (HOPA01). O método do óleo mineral proporcionou maior esporulação ao isolado de algodoeiro (ALSP01) e de cafeeiro (CAES01).

Todos os esporos resultantes dos testes com os diferentes isolados reproduziram sintomas típicos da mancha alva, em seus respectivos hospedeiros, comprovando, assim, a eficiência dos métodos de preservação em manter a capacidade patogênica dos mesmos. Dois isolados de pepino (PESP01 e PESP02) e o de acerola (ACSP01) já foram preservados com baixa esporulação, justamente por decréscimo e perda de capacidade de esporulação e declínio da patogenicidade, resultado de repicagens periódicas constantes anteriores à instalação deste experimento, fato, este, esclarecido por Figueiredo & Pimentel (1989).

O isolado de hortênsia (HOPA01) não reproduziu sintomas nas plantas, apesar de esporular bem. Este fato ocorreu, muito provavelmente, pela alta infestação de oídio, na superfície foliar das mudas de hortênsia, após inoculação com *C. cassiicola*, assim como no isolado de café (CAES01), que não foi infectivo às mudas de café. Este fato ocorreu, provavelmente, em função de o patógeno *C. cassiicola* ser apenas patogênico a *Coffea canephora* cv. *conilon* (Souza et al. 2009) e de as mudas utilizadas serem da cv. Catuaí Vermelho, ou seja, *Coffea arabica*, que não é hospedeira deste patógeno.

De acordo com os resultados obtidos, constatou-se que o método de repicagem periódica foi o que resultou em maiores crescimentos miceliais, para todos os isolados de *C. cassiicola*, enquanto a esporulação, no método Castellani, foi um pouco superior à

dos demais métodos, ao passo que a patogenicidade foi mantida, em todos os métodos de preservação utilizados. Desta forma, recomenda-se, para este fitopatógeno, o método de preservação Castellani.

REFERÊNCIAS

- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Long-term storage of plant pathogens. In: DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. *Basic plant pathology methods*. Boca Raton: CRC Lewis, 1995. p. 61-81.
- FIGUEIREDO, M. B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para conservação de fungos patógenos em plantas. *O Biológico*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 9-13, 1967.
- FIGUEIREDO, M. B.; PIMENTEL, C. P. V. Métodos de preservação de fungos em cultura. *O Biológico*, São Paulo, v. 55, n. 1/2, p. 27-33, 1989.
- FINATTI, D.; APARECIDO, C. C. Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na preservação, em laboratório, de isolados do gênero *Verticillium*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 715-720, 2009.
- LIMA, D. M. M. Preservação de espécies de *Fusarium* sob óleo mineral. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 26, n. 6, p. 853-855, 1991.
- SILVA, E. C. et al. Coleção de culturas de fungos fitopatogênicos da UFRPE: importante fonte de material biológico para pesquisadores brasileiros. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO (JEPEX), 10., 2010, Recife. *Anais...* Recife: UFRPE, 2010. p. 1-3.
- SOUZA, A. F. et al. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and berry spots on *Coffea canephora* in Brazil. *Australasian Plant Diseases Notes*, Collingwood, v. 4, n. 1, p. 72-74, 2009.