

Bento Gonçalves, RS
Setembro, 2012

Autores

Silvio André Meirelles Alves

Eng. Agr., Dr., Pesquisador
Embrapa Uva e Vinho,
Estação Experimental de
Fruticultura de Clima Temperado
Vacaria, RS
silvio@cnpuv.embrapa.br

Vanderlei Candido da Silva

Biólogo
Embrapa Uva e Vinho,
Estação Experimental de
Fruticultura de Clima Temperado
Vacaria, RS
vanderlei@cnpuv.embrapa.br

Claudia Cardoso Nunes

Acadêmica do curso de
Tecnologia em Fruticultura,
UERGS,
Vacaria, RS
clcd.nunes@gmail.com

Metodologia para cultivo e preservação do fungo causador da entomosporiose da pereira

Introdução

A entomosporiose, causada pelo fungo *Entomosporium mespili* (DC.) Sacc. (forma perfeita: *Fabraea maculata* Atk.), é uma das principais doenças da pereira (*Pyrus* sp.) (JONES, 1990). Também conhecida como requeima, essa doença é caracterizada por apresentar pequenas lesões no limbo foliar e por causar desfolha, o que afeta a capacidade fotossintética das plantas e reduz o seu rendimento.

Os sintomas são visíveis em ambas as faces das folhas e começam com lesões pequenas, avermelhadas a púrpuras, as quais coalescem, tornando-se marrom-escuras, podendo aparecer rodeadas por um halo clorótico. As folhas severamente infectadas apresentam aspecto necrótico, amarelecem e caem. Nos frutos, há formação de manchas necróticas semelhantes às folhas, que ficam, porém, deprimidas à medida que o fruto cresce. Além disso, podem aparecer rachaduras, favorecendo a entrada de outros microrganismos. A principal fonte de inóculo primário são as folhas caídas do ano anterior (JONES, 1990).

Essa doença ocorre na maioria das regiões produtoras do mundo (JONES, 1990), com maior severidade onde há verões quentes e úmidos (ZWET, 1985). Por esse motivo, a importância da entomosporiose no Brasil é relativamente maior do que nos principais países produtores.

Embora essa doença tenha grande importância para o desenvolvimento da cultura no Brasil, não há muitos trabalhos realizados nas condições brasileiras.

Os trabalhos conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Uva e Vinho, em Vacaria, com o fungo *E. mespili*, objetivaram superar as dificuldades de isolamento, cultivo, esporulação e manutenção do fungo. A superação dessas dificuldades é essencial para permitir a condução de experimentos que necessitem de inoculações em condições controladas, para a avaliação de resistência das variedades ou de materiais produzidos pelo programa de melhoramento, avaliação de eficácia de fungicidas e determinação de condições climáticas necessárias para a infecção, colonização e reprodução durante os períodos de epidemia da doença.



Fig. 1. Sintomas de entomosporiose em folhas (A) e em frutos (B).

Isolamento

Foram realizadas diversas tentativas de isolamento de *E. mespili*. As primeiras tentativas foram feitas a partir de fragmentos de tecido doente (AMORIM; SALGADO, 1995). Nessa técnica, é feita a desinfestação superficial de fragmentos e o plaqueamento em meio de cultura. Posteriormente, segmentos de crescimento fúngico são repicados para novas placas.

Outra técnica utilizada foi o isolamento direto, que consiste em transferir diretamente os conídios para o meio de cultura. Detalhadamente, o método consistiu nos seguintes procedimentos: com o uso de microscópio estereoscópico, foram localizados os acérvulos presentes no centro das lesões (Figura 2A) e, com auxílio de bisturi, um acérvulo foi destacado e macerado sobre uma lâmina de vidro contendo 50 μ L de água esterilizada. Após a confirmação da presença de conídios em microscópio óptico (Figura 2B), uma alíquota da suspensão da lâmina foi distribuída em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) + cloridrato de tetraciclina na concentração de 60 mg/L, e espalhada com alça de Drigalsky. Depois disso, as placas foram

mantidas em câmara de crescimento tipo BOD, com temperatura de 22°C e fotoperíodo de doze horas de luz durante três a cinco dias.

Quando as folhas apresentam lesões novas ou possuem poucos conídios nos acérvulos, recomenda-se submetê-las à câmara úmida por alguns dias para favorecer a produção dos conídios.

Decorrido o período de três a cinco dias, as placas foram observadas em microscópio estereoscópico com luz transmitida (Figura 2C), para localizar o crescimento inicial dos conídios germinados (Figura 2D). Com o auxílio de um bisturi, foram retirados fragmentos de meio de cultura contendo um conídio germinado (Figura 2E), os quais foram transferidos para placas contendo o mesmo meio de cultura e mantidos nas mesmas condições de temperatura e luminosidade previamente citadas. Visando eliminar a ocorrência de contaminantes e obter cultura monospórica pura, foram transferidos conídios germinados que se encontravam individualizados.

Decorridos quatorze dias após o isolamento, avaliaram-se os aspectos macro-morfológicos das

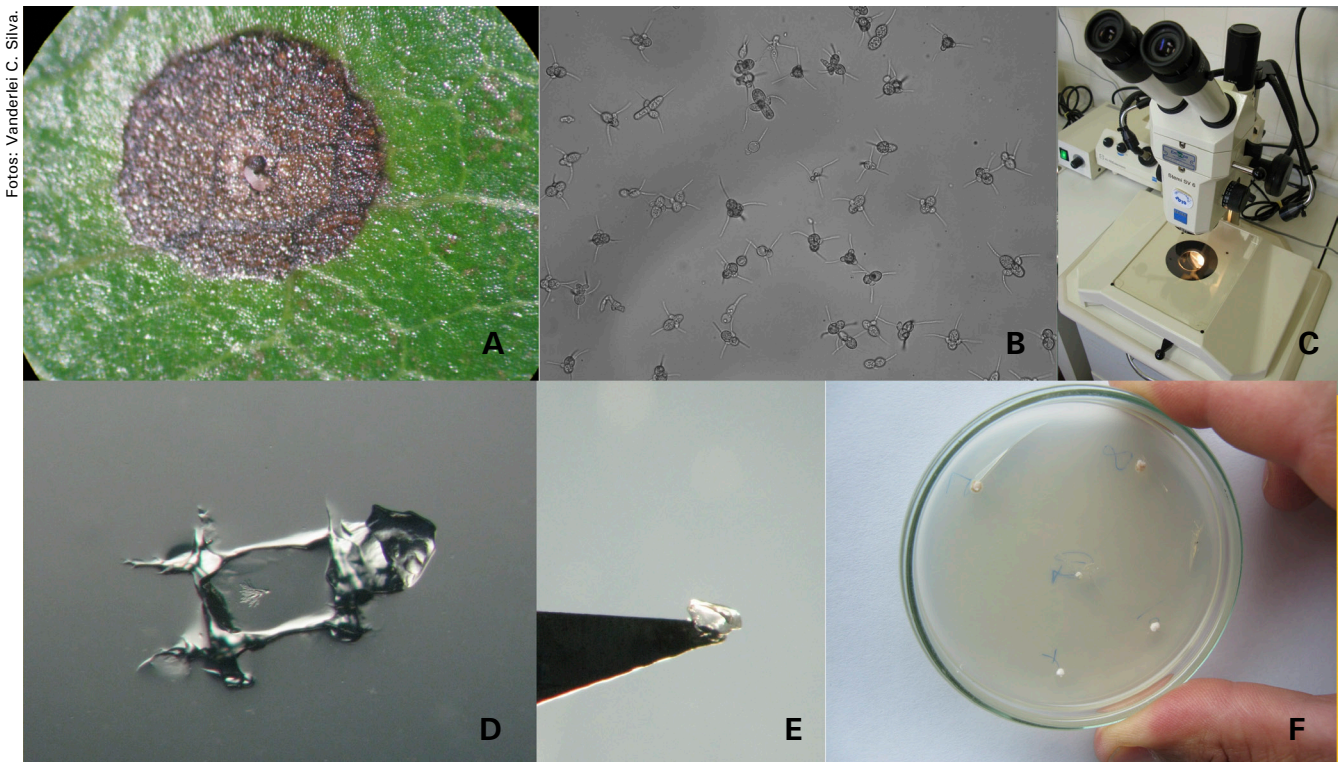


Fig. 2. Algumas etapas para o isolamento de *Entomosporium mespili*. Acérvulo produzindo conídios (A), conídios em aumento aproximado de 100x (B), lupa com luz transmitida (C), conídio escolhido para repicagem (D), pedaço de meio contendo o conídio germinado (E) e placa contendo colônias 14 dias após a repicagem (F).

colônias (Figura 2F). Constatou-se crescimento muito lento, com tamanho variando de 2 a 3 mm de diâmetro. Foram observadas colônias de textura veludosa e relevo apiculado (com uma pequena saliência central). As bordas apresentaram-se bem delimitadas, com variação da coloração dessas em relação ao centro da colônia. O centro apresentou variações de bege rosado, enquanto que as bordas apresentaram tonalidades mais claras.

Quanto ao método de isolamento, não houve sucesso a partir de fragmentos de tecido doente. Isso ocorreu porque *E. mespili* é pouco competitivo devido à fonte nutritiva na presença de fungos saprófitas. Os isolamentos só foram possíveis a partir da técnica de isolamento direto.

Germinação, crescimento e esporulação

Após o sucesso dos primeiros isolamentos, buscou-se o desenvolvimento de um meio de cultura para favorecer a germinação, o crescimento e a esporulação de *E. mespili*.

Para isso, foram realizados isolamentos conforme o descrito acima e, após cinco dias, realizou-se repicagem monospórica para novas placas contendo BDA, as quais foram mantidas a 24°C e fotoperíodo

de 12 h, durante vinte dias. A partir dessas placas, foram feitas raspagens da colônia e ajustou-se uma suspensão de 10^5 conídios/mL. Essa suspensão foi utilizada em experimentos de germinação e de crescimento da colônia. Em ambos os experimentos, os meios de cultura Batata-Dextrose (BD) e BDA foram acrescidos de caldo de folhas de pereira nas concentrações de 6, 14, 28, 42, 56 e 70 g/L. A porcentagem de germinação foi determinada contando-se cinquenta conídios por repetição. A medição do crescimento foi realizada pela contagem de unidades formadoras de colônias por placa e a esporulação foi determinada pela contagem em hemacitômetro. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com sete tratamentos e quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e às médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos permitem afirmar que a composição do meio de cultura influenciou a germinação, o crescimento e a esporulação de *E. mespili*. Obteve-se maior germinação no meio BD, que diferiu dos demais meios testados, e não houve germinação em água (controle). O meio BDA + 6 g de caldo de folhas foi o que proporcionou melhor crescimento e esporulação, diferindo dos demais (Figura 3A).

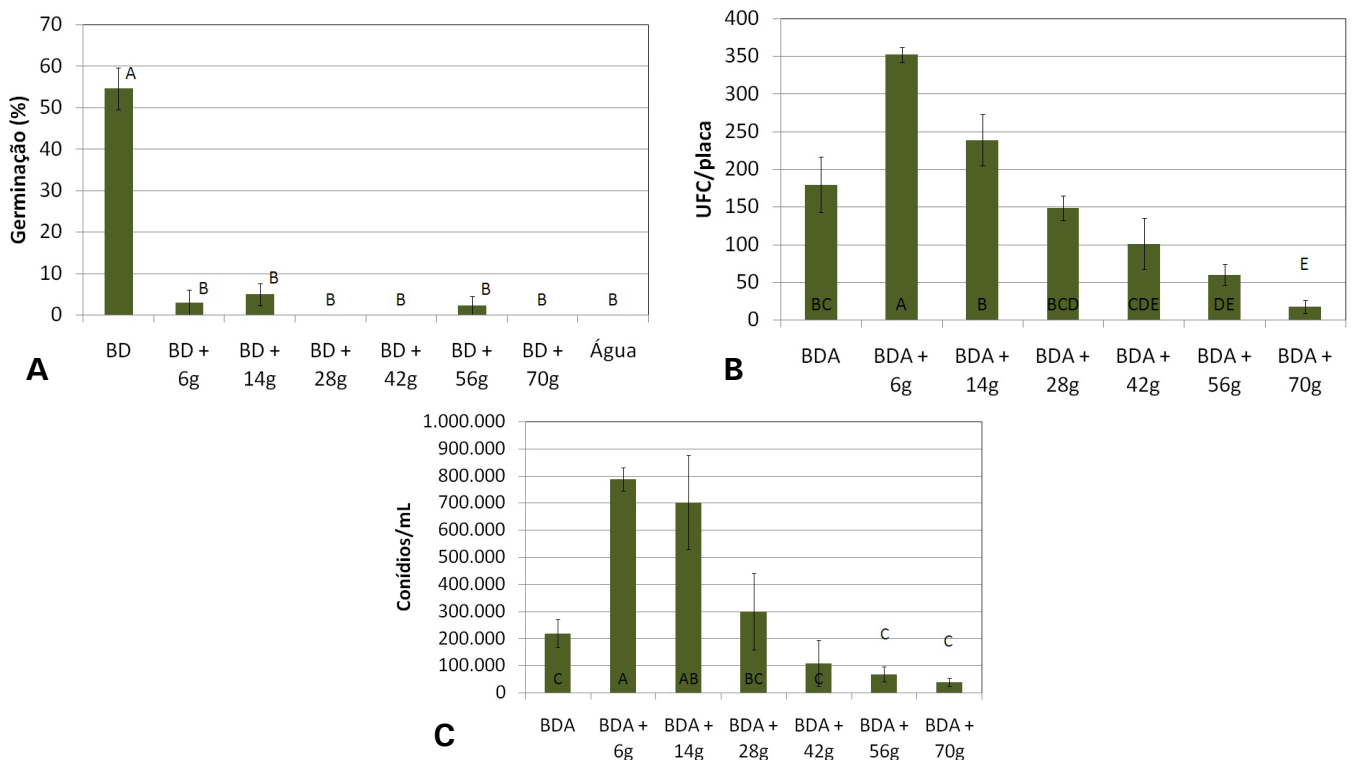


Fig. 3. Desenvolvimento de *Entomosporium mespili* em meio contendo doses crescentes de caldo de folhas. Efeito na germinação (A), crescimento (B) e na esporulação (C).

Preservação

Considerando as dificuldades que *E. mespili* apresenta para seu isolamento e crescimento em meio de cultura, foi realizado um experimento com o intuito de preservar o fungo em folhas destacadas de pereira.

O experimento foi realizado com folhas da cultivar Packham's Triumph com sintomas de entomosporiose, coletadas em maio de 2011 no pomar da Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado (EFCT) da Embrapa Uva e Vinho, em Vacaria/RS. Duas amostras, com cinquenta folhas cada, foram armazenadas em geladeira (5 °C), em câmara fria (0 a 2 °C) e em freezer (-4 °C).

A germinação foi avaliada no dia da coleta das folhas e após uma, duas, quatro e oito semanas consecutivas de armazenamento. Na câmara fria, as folhas foram acondicionadas em (a) saco de papel branco encerado, (b) saco de papel branco encerado envolvido em saco plástico de polipropileno e (c) caixa de isopor. Na geladeira e no freezer, as folhas foram acondicionadas em (a) saco de papel branco encerado e (b) saco de papel branco encerado envolvido em saco plástico de polipropileno.

Para a avaliação de germinação, foram retiradas duas folhas de cada tratamento e, dessas folhas, foi realizada uma suspensão a partir dos acérvulos de cinco lesões de cada folha. A suspensão foi distribuída em duas placas de Petri contendo BDA + 60 mg/L de cloridrato de tetraciclina. Posteriormente, as placas foram armazenadas em BOD a 22 ± 2 °C e com fotoperíodo de doze horas. Cada placa foi considerada uma repetição. O percentual de

germinação dos conídios foi quantificado três dias após a incubação, contando-se cinquenta conídios por placa, classificando-os como germinado ou não-germinado. Considerou-se germinado o conídio que apresentasse tubo germinativo com comprimento igual ou maior que a largura do conídio.

Os resultados obtidos demonstraram que os conídios foram capazes de germinar em todos os métodos e períodos avaliados. A germinação no dia de coleta das folhas foi de 38,6%. A capacidade de germinação apresentou tendência de diminuição ao longo do tempo, para a maioria das condições de preservação. Ao final de oito semanas, a maior porcentagem de germinação (33,7%) foi obtida no método de preservação em câmara fria, nas folhas armazenadas em saco de papel branco encerado envolvido em saco plástico (Tabela 1).

Da mesma amostra de folhas utilizada nos métodos de preservação, realizaram-se isolamentos de conídios em placas de Petri, conforme o método citado anteriormente. Os isolados foram mantidos em geladeira durante o período de 10/05/2011 a 11/10/2011. Ao final desse período, foi realizado teste de patogenicidade através da inoculação de ramos destacados da cultivar Packham's Triumph.

Foram utilizados três ramos para cada tratamento. Os tratamentos consistiram de (i) folhas inoculadas, seguidas de um período de 24 h de câmara úmida, (ii) folhas inoculadas sem câmara úmida e (iii) ramos não inoculados, seguidos de 24 h de câmara úmida.

Os sintomas típicos da doença foram observados apenas no tratamento com inoculação seguida de 24 h de câmara úmida.

Tabela 1. Germinação de *Entomosporium mespili* submetida a diferentes métodos e períodos de armazenamento.

Local	Temperatura	Tratamento ¹	Média de germinação (%) ²			
			1 semana	2 semanas	4 semanas	8 semanas
Freezer	-4 °C	SPB	32,4 a	31,1 ab	8,0 cd	12,5 ab
		SPB + SPL	34,8 a	17,0 b	6,0 d	9,2 b
Câmara fria	0 a 2 °C	SPB	51,4 a	49,0 a	22,5 abc	19,0 ab
		SPB + SPL	44,7 a	32,8 ab	31,9 a	33,7 a
		CI	41,2 a	30,5 ab	31,2 ab	26,3 ab
Geladeira	5 °C	SPB	41,3 a	39,3 ab	16,9 bcd	20,7 ab
		SPB + SPL	42,5 a	35,4 ab	30,4 ab	7,1 b

¹ SPB = saco de papel branco encerado, SPL = saco plástico, CI = caixa de isopor.

² Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O início dos sintomas foi observado sete dias após a inoculação, e a evolução foi acompanhada até o 14^o dia (Figuras 4A, 4B e 4C).

A preservação de conídios por meio do frio é um método viável de manutenção do inóculo fúngico durante períodos em que a planta não apresenta folhas.

Além da preservação do fungo em folhas, a preservação de isolados em placa de Petri em geladeira também se mostrou eficaz. Esse método permite a manutenção do isolado, evitando que sejam feitas repicagens sucessivas, o que pode diminuir a capacidade de esporulação e de patogenicidade do isolado.

Foto: Claudia C. Nunes e Silvio A. M. Alves.

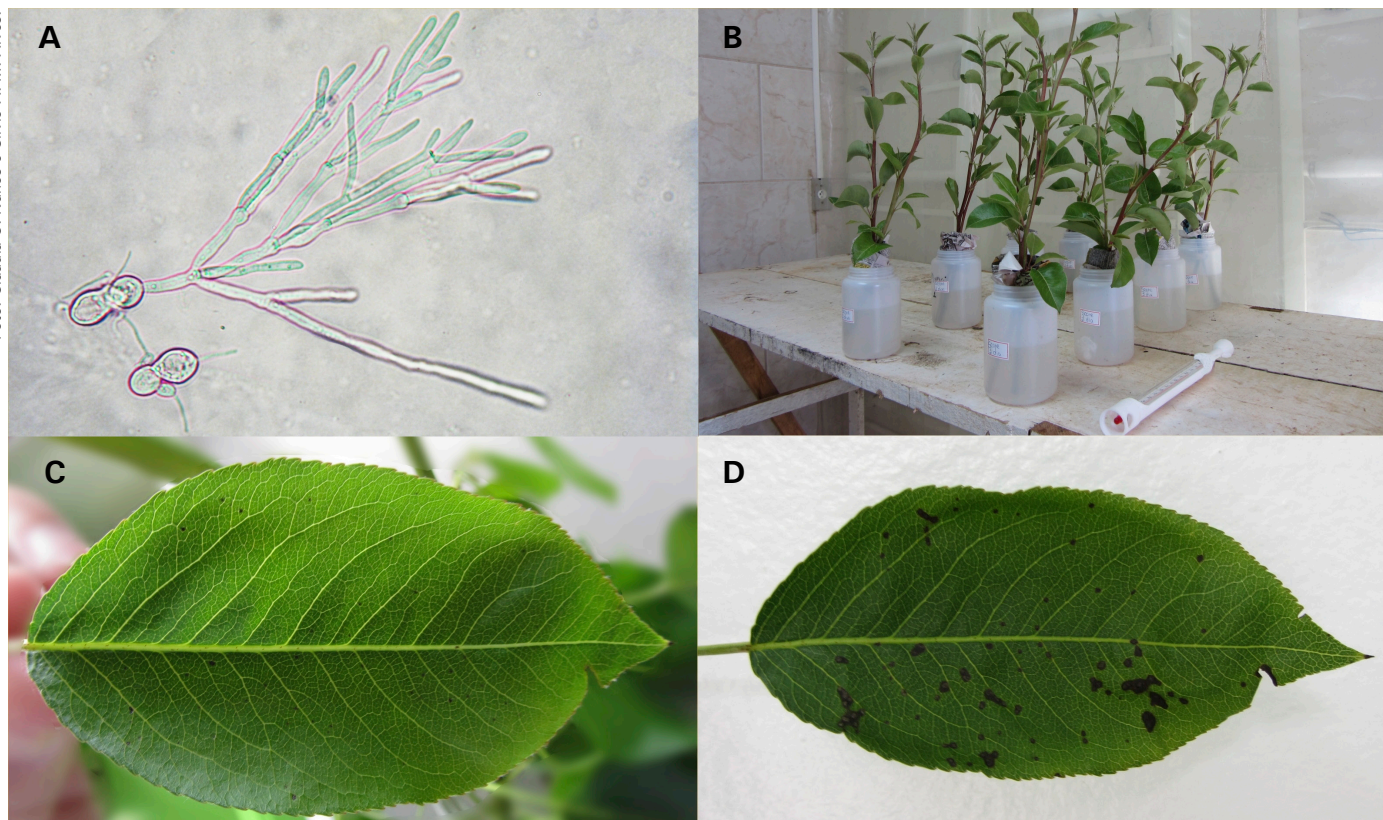


Fig. 4. Conídio germinado e conídio não germinado em aumento aproximado de 200x (A), ramos utilizados para inoculação (B), folha com início de sintomas, sete dias após a inoculação (C) e sintomas da mesma folha quatorze dias após a inoculação (D).

Considerações finais

O sucesso do cultivo de microrganismos em condições de laboratório está associado à capacidade de proporcionarmos a eles as condições ideais de ambiente, tais como temperatura, umidade, luminosidade, e as condições nutricionais. Os fungos possuem exigências nutricionais específicas para o seu crescimento, sendo necessário, em muitos casos, adicionar e disponibilizar tais metabólitos no meio de cultura, para que ocorra o seu crescimento e reprodução (MENEZES; SILVA-HANLIN, 1997).

Nos experimentos relatados, o método que permitiu o isolamento de maneira mais fácil foi o isolamento

direto. Os meios com batata e dextrose, de maneira geral, permitiram bom crescimento e esporulação de *E. mespili*; porém, a utilização de caldo de folhas, na concentração de 6 g/L, adicionado ao meio BDA, favoreceu o seu desenvolvimento e deve ser considerada em trabalhos futuros.

A manutenção de fungos em laboratório por sucessivas repicagens é um método que apresenta a desvantagem de induzir a perda da patogenicidade do isolado (MENEZES; SILVA-HANLIN, 1997). Em fungos que são parasitas obrigatórios, como é o caso das ferrugens (que não crescem em meio de cultura), ou outros fungos que crescem lentamente em meio de cultura, as opções para sua manutenção

são feitas por meio de inoculações sucessivas em plantas ou por meio de método de preservação em temperaturas baixas (ALVES et al., 2006).

O congelamento de esporos da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) em ultra freezer (-80°C) permitiu a preservação por um período de duzentos e trinta e um dias sem perda significativa do seu poder germinativo (FURTADO et al., 2008).

A preservação de *E. mespili* em baixas temperaturas é uma alternativa viável à manutenção de plantas infectadas em casa de vegetação, que é muito cara e laboriosa. A preservação se mostrou viável pelos métodos de folhas infectadas e pelo armazenamento de placas de Petri após seu isolamento, sem interferir na patogenicidade dos isolados.

Referências Bibliográficas

ALVES, S. A. M.; FURTADO, G. Q.; BERGAMIN FILHO, A. Influência das condições climáticas sobre a ferrugem soja. **Ferrugem asiática da soja**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2006, p. 37-59.

AMORIM, L.; SALGADO, C. L. Diagnose. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995, v. 1, p. 224-232.

FURTADO, G. Q.; ALVES, S. A. M.; CZERMAINSKI, A. B. C.; MASSOLA JUNIOR, N. S. Preservation of *Phakopsora pachyrhizi* Uredospores. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 1, p. 62-64, jan. 2008.

JONES, A. L. **Compendium of apple and pear diseases**. Saint Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 1990.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1997.

ZWET, T. VAN DER. Effects of cultural conditions on sporulation, germination, and pathogenicity of *Entomosporium maculatum*. **Phytopathology**, v. 75, p. 94-97, 1985.

Circular Técnica, 92

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Uva e Vinho
Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95700-000 Bento Gonçalves, RS
Fone: (0xx) 54 3455-8000
Fax: (0xx) 54 3451-2792
<http://www.cnpuv.embrapa.br>

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição

Comitê de Publicações

Presidente: Mauro Celso Zanus
Secretária-Executiva: Sandra de Souza Sebben
Membros: Alexandre Hoffmann, César Luís Girardi, Flávio Bello Fialho, Henrique Pessoa dos Santos, Kátia Midori Hiwatashi, Thor Vinícius Martins Fajardo e Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Expediente

Formatação e diagramação: Alessandra Russi
Normatização Bibliográfica: Kátia Midori Hiwatashi