



Caracterização morfológica de isolados de *Cryptosporiopsis perennans* em diferentes meios de cultura

Amauri Bogo¹, Marta A. Maffioletti¹, Rosa M. V. Sanhueza² & Ricardo T. Casa¹

¹Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Cx. Postal 281, 88502-970, Lages, SC, Brasil; ²Embrapa Uva e Vinho, Cx. Postal 1513, 95.200-000, Vacaria, RS, Brasil

Autor para correspondência: Amauri Bogo, e-mail: a2ab@cav.udesc.br

RESUMO

O crescimento micelial e a esporulação de nove isolados de *Cryptosporiopsis perennans* foram avaliados nos meios de cultura batata-dextrose-ágar acidificado (BDA-acid), ágar extrato de malte (AEM) e V8-ágar (V8) sob o regime de fotoperíodo de 12 h a 21°C. Discos de 5 mm de diâmetro, retirados de colônias crescidas em meio BDA por 14 dias, foram transferidos para placas de Petri contendo 20 mL de cada meio. Morfologia das colônias, crescimento micelial, esporulação e dimensão dos esporos foram determinadas ao 13º dias de incubação. Observou-se que os efeitos dos meios de cultura variaram dependendo do isolado. Verificou-se crescimento micelial e produção de conídios em todos os meios testados, porém com uma ampla variação de aspecto e coloração de colônias. Maior crescimento micelial e produção de conídios foram observados nos meios de cultura V8 e AEM, para a maioria dos isolados de *C. perennans* avaliados. Em todos os meios de cultura todos isolados produziram microconídios fusiformes.

Palavras-chave: *Malus domestica*, maçã, podridão olho-de boi.

ABSTRACT

Morphological characterization of *Cryptosporiopsis perennans* isolates in different culture media

The mycelial growth and conidial production of nine isolates of *Cryptosporiopsis perennans* were evaluated on the culture media of potato-dextrose-agar acidified (PDA-acid), malt extract agar (MEA) and V8-agar (V8) under 12 hours of photoperiod at 21°C. Five mm-diameter disks taken from colonies grown for 14 days on PDA medium under 12 hours of photoperiod at 21°C were transferred to Petri dishes with 20 mL of each medium. Colonial morphology, mycelial growth, sporulation and spore dimension were evaluated after 13 days of incubation. The effect of the culture media varied according to isolates. Mycelial growth and conidial production were observed in all tested media. The culture medium V8 was the best medium tested for mycelial growth and conidial production, followed by MEA for all *C. perennans* isolates. In all culture media the isolates presented a fusiform conidial shape.

Keywords: *Malus domestica*, apple, bull's-eye rot.

A podridão “olho-de-boi em frutos”, e o cancro de ramos da macieira, associados à infecção pela fase anamórfica de *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenw. (Kienholz, 1939) [teleomorfo *Neofabraea perennans* Kienholz; sin. *Pezicula perennans* (Kienholz) Dugan, R.G. Roberts & G.G. Grove foram descritas no Brasil em 1996 e atualmente encontram-se disseminadas em todas as regiões produtoras de maçã do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, causando perdas de até 16% na cultivar Fuji (Sanhueza, 2002).

As ambigüidades taxonômicas surgiram a partir dos trabalhos de Kienholz (1939), que utilizou para descrever a espécie *N. perennans* características de apotécios obtidos em inoculação artificial em macieiras. Já Boerema & Verhoeven (1972) consideraram *C. perennans* e *C. malicorticis* como sinônimo de *C. curvispora*, considerando esse o correto nome da fase anamórfica de *N. malicorticis*. Sutton (1980) não considerou a espécie *C. curvispora* utilizada por Boerema & Verhoeven (1972), utilizando somente *C. perennans* como sinônimo de *C. malicorticis*. Estes fungos

têm sido considerados diferentes espécies de acordo com características culturais, curvatura dos macroconídios, fisiologia e sintomas da doença em maçã nos EUA. (Miller, 1932; Kienholz, 1939; Dugan *et al.*, 1993). Jong *et al.* (2001) demonstraram com técnicas moleculares que o complexo de agentes causais [...] da podridão “olho-de-boi” é constituído por quatro espécies do gênero *Neofabraea*: *N. perennans* Kienholz, *N. malicorticis* H.S. Jacks., *N. alba* (E.J. Guthrie) Verkley e e uma espécie não descrita de *Neofabraea* sp. No Brasil, somente foi constatada a fase anamórfica de *C. perennans* até o presente, mas é provável que, como ocorre em outras regiões produtoras de maçãs do mundo, estudos mais abrangentes sobre os isolados associados a esta doença possam identificar outras espécies, pois as características morfológicas e fisiológicas que diferenciam essas espécies são pouco claras. A identificação é baseada em critérios convencionais tênues e a alta variabilidade morfológica interfere na definição precisa da posição taxonômica dos isolados associados ao sintoma citado, originando relatos conflitantes (Gariépy *et al.*, 2003).

Apesar da importância do patógeno existem poucas publicações sobre a caracterização de *C. perennans*, e pouco se conhece do efeito das condições climáticas, variações genéticas e biologia do patógeno e do tipo de resistência do hospedeiro. Para o desenvolvimento de estudos sobre o patógeno é fundamental o conhecimento de características morfológicas de colônias, micélio e conídios, bem como fisiológicas, como composição química dos meios de cultura que determina a eficiência da esporulação e crescimento micelial dos fitopatógenos (Dhingra & Sinclair, 1995).

Dugan *et al.* (1993) compararam a morfologia de colônias e conídios de isolados de *C. perennans* e *C. curvispora* e constataram que os macroconídios de *C. curvispora* produzidos em meio de cultura BDA eram curvos, unicelulares, hialinos e mediam 3-6 µm por 10,5-17,7 µm, enquanto que os microconídios eram retos, unicelulares e mediam 1,5-2,5 por 5-8 µm, diferindo da espécie *C. perennans*, além de uma grande quantidade de estromas pulverulentos em culturas mais velhas. No meio de cultura V8-aveia, a largura média dos conídios de *C. curvispora* e *C. perennans* foi de 1,9 e 1,6 µm, respectivamente e somente *C. perennans* produziu sinêmios sem ápices ramificados. Diferenças morfológicas e fisiológicas de isolados de espécies do gênero *Cryptosporiopsis* em meio de cultura pode ter significância taxonômica. No meio de cultivo ágar extrato de malte 2%, isolados da espécie *N. Fructigenum* tiveram maior taxa de crescimento, comparados com isolados das espécies *N. perennans* e *N. album* (Henriquez *et al.*, 2004). Neste trabalho avaliaram-se características morfológicas de colônias, crescimento micelial, produção e forma de conídios de nove isolados de *C. perennans* associados à podridão ‘olho de boi’ cultivados nos meios de cultura BDA acidificado, Extrato de Malte-ágar e Ágar suco V8.

Os trabalhos foram realizados nos laboratórios de Fitopatologia da Embrapa Uva e Vinho, em Vacaria/RS e do Centro de Ciências Agroveterinárias- CAV/UEDESC, em Lages/SC. Os isolados de *C. perennans* foram obtidos de frutos com sistemas de podridão “olho-de-boi” em maçãs da cultivar Fuji de diferentes pomares e regiões do Sul do Brasil e pertencem à coleção da Embrapa Uva e Vinho (Tabela 1). Para o isolamento, os frutos foram desinfestados superficialmente com álcool etílico hidratado 92° e lavados com água destilada esterilizada. Fragmentos de tecidos com a podridão “olho de boi” foram retirados das margens das lesões e colocados em meio de cultura BDA contido em placas de Petri. As placas foram mantidas a 21°C com fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento das colônias, culturas monospóricas de cada isolado foram transferidas para tubos de vidro com BDA e preservados a 4°C.

As colônias dos isolados foram inicialmente cultivadas em BDA e incubadas durante 14 dias com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 21°C. Nas placas de Petri com os diferentes meios de cultura foi substituído um disco central com 5 mm de diâmetro por outro com o mesmo diâmetro com o micélio de cada isolado. As placas foram mantidas a 21°C com fotoperíodo de 12 horas.

Os meios de cultura testados formam: i. BDA acidificado - Batata-Dextrose-Ágar (10g de dextrose, 18g de ágar, 300 mL de caldo de batata e 700 mL de água destilada) acidificado com ácido láctico a pH 4,5 antes de verter; ii. V8 - meio de ágar com suco V8 (200 mL de V8 (Campbel Soup Company), 3g de CaCO₃, 17g de ágar e 800mL de água destilada) e iii. extrato de malte ágar (25 g de extrato de malte, 17g de ágar e 1000 mL de água destilada).

As avaliações finais do diâmetro das colônias foram feitas aos 13º dias de incubação com registro de dois diâmetros perpendiculares feitos com paquímetro digital (Mítutoyo) bem como aspecto e coloração de colônias. As avaliações de forma, dimensão (comprimento e largura média de 50 esporos por isolado e meio de cultura) e produção de conídios foram determinadas em um disco de 1,5 cm de diâmetro retirado da região central de cada colônia ao 13º dia de incubação. Os conídios foram retirados dos discos de cada meio de cultura com bastão de vidro e água, e suspensos em água destilada esterilizada com Tween-80, 0,001%, e a contagem de conídios em câmara de Neubauer.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. Os dados foram analisados como experimento fatorial (9 isolados e três meios de cultura). Foi realizado teste F seguido de contraste de médias ($p < 0,05$) para as variáveis diâmetro das colônias e produção de conídios (Demétrio, 2001). Todas as pressuposições para a análise de variância foram devidamente testadas de acordo com Banzatto & Kronza (2006).

Houve variação quanto a morfologia e coloração das colônias (Figura 1). As colônias nos três meios de cultura apresentavam margem lisa, micélio aéreo bem desenvolvido, medianamente cotonoso a cottonoso. Algumas colônias produziram micélio aéreo denso e floculoso com a presença de zonas concêntricas. A coloração do micélio aéreo variou de cinza-esverdeado a levemente rosado. Em algumas colônias foi observado com micélio central submerso avermelhado e margem levemente rosada (Figura 1, BDA-A-5). A maior

TABELA 1 - Origem dos isolados de *Cryptosporiopsis perennans*

Origem dos isolados	Código	Cultivar	Data da coleta
Tainha/RS	Cp1	Fugi	2002
Tainha/RS	Cp2	Fugi	2002
Tainha/RS	Cp3	Fugi	2002
Vacaria/RS	Cp4	Fugi	2002
Friburgo/SC	Cp5	Fugi	2003
Vacaria/RS	Cp6	Fugi	2002
Vacaria/RS	Cp7	Fugi	2003
Vacaria/RS	Cp8	Fugi	2003
Friburgo/SC	Cp9	Fugi	2002

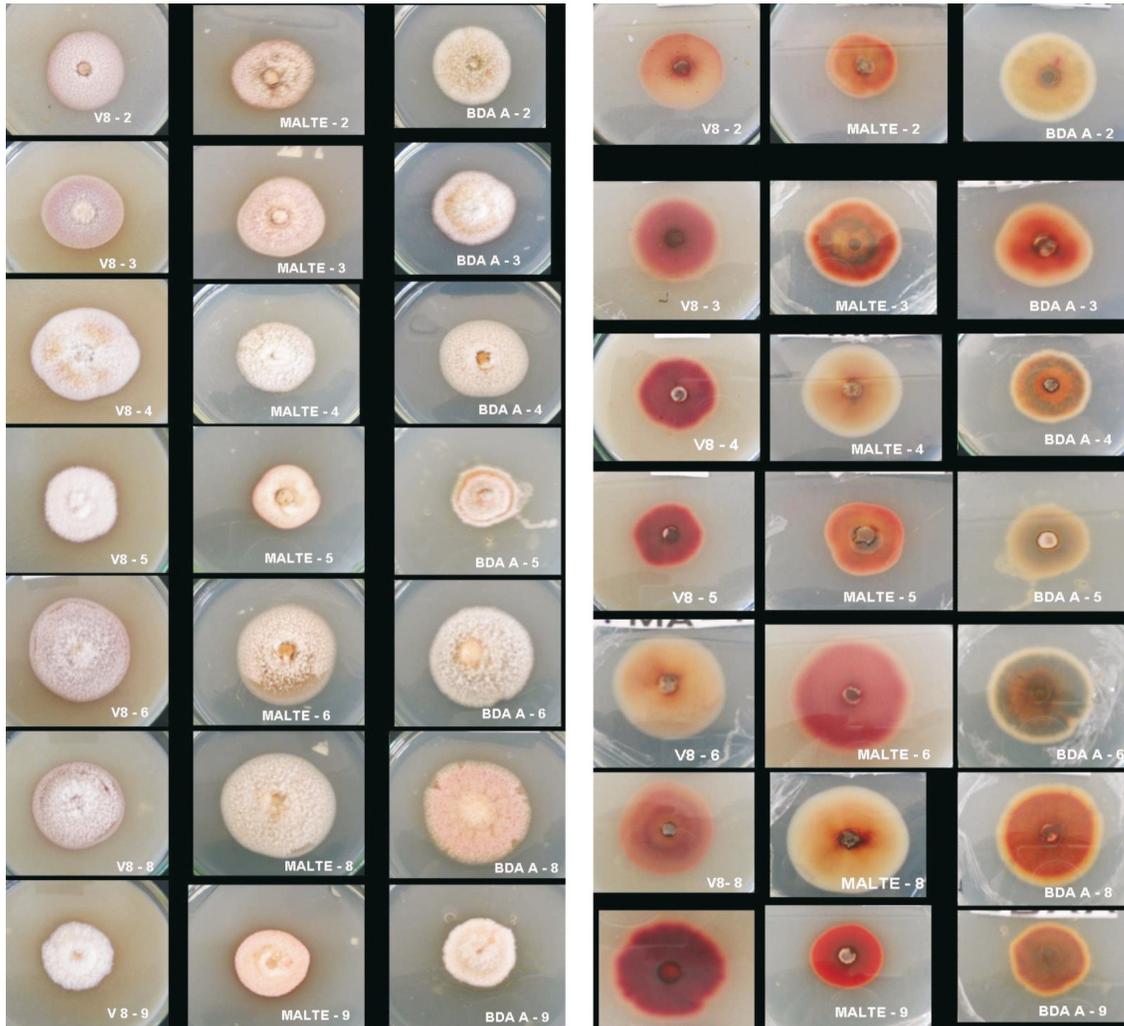


FIG. 1 - Aspecto e coloração de colônias (esquerda: parte superior das placas; direita: lado inverso das placas) de isolados de *Cryptosporiopsis perennans*, isolados de frutos de macieira, ao 13^o de incubação. V8 (meio V8 ágar); MALTE (extrato de malte ágar); BDA A (batata-dextrose-ágar); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (número de isolados).

variação de coloração foi observada no lado inverso das colônias. No meio V8, variou de amarelo-avermelhado a vermelho-púrpura, no meio AEM de rosa à variações de laranja- avermelho a púrpura e no meio BDA-acid de cinza-esverdeado a vermelho alaranjado.

Nos três meios de cultura testados, não houve diferença significativa quando as dimensões médias de macroconídios e microconídios. As colônias produziram nos três meios de cultura macroconídios curvos, hialinos, unicelulares, com extremidades arredondadas à levemente pontiagudo e com dimensões variando de 4-7 x 15-30µm e microconídios cilíndricos, retos e alguns, levemente curvados nas pontas com ápice arredondado e dimensões variando de 1-2 x 5-8µm.

Houve interação significativa entre os fatores isolados e meio de cultura de modo que foram realizados dois testes

de média dentro de cada isolado e meio de cultura (Tabela 2). Houve diferença significativa quanto ao crescimento micelial e produção de microconídios ($p < 0,05$) para os nove isolados de *C. perennans* nos meios de cultura avaliados (Tabela 2). No meio de cultura V8 foi observado o maior crescimento micelial das colônias para todos os isolados, exceto para o isolado 5, que teve o menor valor entre todos. O menor desenvolvimento micelial das colônias foi observado para o isolado 5 no meio de cultura BDA- acid (Tabela 2). Dos nove isolados avaliados somente os isolados 4, 5 e 9 não diferiram significativas no desenvolvimento micelial das colônias nos meios BDA-acid e AEM, e somente o isolado 6 não diferiu no seu crescimento micelial quando comparado nos meios de cultura AEM versus V8. Houve diferença significativa na quantidade de conídios produzidos pelos diferentes isolados no meio de cultura V8, destacando o isolado 2 com a maior

TABELA 2 - Médias de crescimento micelial e produção de microconídios de *Cryptosporiopsis perennans* em diferentes meio de cultura aos 13° dias após a inoculação

Isolados	crescimento			esporulação		
	micelial (mm)			microconídios x 10 ⁴ /mL		
	meios de culturas					
	BDA-acid	V8	AEM	BDA	V8	AEM
1	29,0Bb	33,4Ba	31,6Ba	41,1Cc	115,2Ca	66,0Cb
2	30,9Bb	34,5Ba	30,0Bb	23,7Dc	186,0Aa	95,7Ab
3	33,9Aa	33,0Ba	28,8Bb	45,1Cc	89,7Da	77,0Bb
4	30,1Bb	31,6Bb	37,1Aa	16,0Ec	100,5Da	32,7Db
5	17,1Dc	27,8Ca	23,5Cb	27,0Dc	66,2Eb	81,7Ba
6	34,1Ab	39,6Aa	38,6Aa	79,0Ab	94,2Da	38,5Dc
7	25,6Cb	33,7Ba	32,0Ba	47,5Cc	126,1Ca	64,2Cb
8	37,0Aa	38,9Aa	39,4Aa	66,2Bb	124,2Ca	55,5Cc
9	20,0Cc	28,2Ba	24,5Cb	30,7Dc	145,5Ba	81,0Bb
CV%	6,2	4,9	4,7	11,2	9,4	7,8

¹ BDA-acid= batata dextrose ágar acidificado; V8= V8-ágar; AEM= extrato de malte. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

esporulação (Tabela 2). O meio de cultura V8 sob regime de fotoperíodo de 12 hs é o mais eficiente no crescimento micelial e produção do conídios de *C. perennans*.

Meio de cultura contendo alta concentração de carboidratos pode estimular o crescimento micelial, mas não a esporulação (Moore-Landecker, 1972). Já meios com baixo teor de carboidratos, mas com extratos vegetais, normalmente estimulam a esporulação de vários fungos (Dhingra & Sinclair, 1995), sendo o que foi observado para *C. perennans* em relação ao meio V8 (Tabela 2).

A variabilidade do patógeno é confirmada pelos resultados obtidos por Dugan *et al.*, 1993, que mostraram que o estímulo diferencial observado em alguns isolados, por um dos meios de cultura, nem sempre se mantém constante quando da variação de fotoperíodo. O maior estímulo ao desenvolvimento das colônias, bem como a produção de esporos, exercido pelos meios de culturas V8 e AEM, para a maioria dos isolados, justifica a sua escolha isoladamente ou associados, sendo recomendado o seu uso nos estudos futuros deste patógeno no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boerema GH, Verhoeven AA (1972) Checklist for scientific names of common parasitic fungi. Series 1a: Fungi on trees and shrubs. Netherland Journal of Plant Pathology 78, Supplement 1.
- Bonzatto PA, Kronza SN (2006). Experimentação Agrícola. 3° ed. Jaboticabal SP. Funep.
- Demétrio CGB (2001) Modelos lineares generalizados em experimentação agrônômica. 46 Reunião Anual da Sociedade Internacional de Biometria e 9° Simpósio de Estatística e Experimentação Agrônômica. ESALQ, Universidade de São Paulo. Piracicaba SP. p. 113.
- Dhingra OD, Sinclair JB (1995) Basic Plant Pathology Methods. Boca Raton FL. Lewis Publishers.
- Dugan FM, Grove GG, Roberts JD (1993) Comparative studies of *Cryptosporiopsis curvispora* and *C. perennans*. I. Morphology and pathogenic behavior. Mycologia 85:551-564.
- Gariépy TD, Lévesque AC, Jong SN, Rahe JE (2003) Species specific identification of the *Neofabraea* pathogen complex associated with pome fruits using PCR and multiplex DNA amplification. Mycologia 107:528-536.
- Henriquez JL, Sugar D, Spotts RA (2004) Etiology of bull's eye rot of pear caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington, and California. Plant Disease 88:1134-1138.
- Jong SN, Levesque CA, Verkley GJM, Abeln ECA, Rahe JE, Braun PG (2001) Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA and the B-tubulin gene. Mycological Research 105:658-669.
- Kienholz JR (1939) Comparative study of the apple anthracnose and perennial canker fungi. Journal of Agriculture Research 59:635-665.
- Moore-Landecker E (1972) Fundamentals of the Fungi. London. Prentice-Hall.
- Miller EV (1932) Some physiological studies of *Gloeosporium perennans* and *Neofabraea malicorticis*. Journal Agricultural Research 45:65-77.
- Sanhueza RMV (2002) Ocorrência de *Cryptosporiopsis perennans* em macieiras "Fuji" no Sul do Brasil. *Summa Phytopathologica* 28:204-206.
- Sutton BC (1980) The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew UK. Commonwealth Mycological Institute.

Recebido 10 Dezembro 2007 - Aceito 11 Junho 2008 - TPP 7091
 Editor Associado: Marcos P.S. Câmara