

Crescimento Micelial e Esporulação de Isolados de *Phytophthora* sp. Patogênicos à Acácia-negra¹

*Adriano Abdanur*²

*Álvaro Figueredo dos Santos*³

*Renato Tratch*⁴

RESUMO

Avaliou-se o crescimento micelial e a esporulação de sete isolados de *Phytophthora* de acácia-negra (*Acacia mearnsii*), sob diferentes condições. Observou-se maior crescimento micelial nos meios cenoura-água e V-8, entre 20°C e 28°C. A 12°C o crescimento foi mínimo e a 36°C não houve crescimento. Os isolados em estudo apresentaram poucas variações quanto ao aspecto das colônias. A esporulação ocorreu na presença de meio líquido (solução de KNO₃ e água destilada esterilizada) e luz contínua. Os isolados de *Phytophthora* apresentaram esporângios papilados, ovóides e persistentes. Todos os isolados foram patogênicos à acácia-negra.

Palavras-chave: Gomose, etiologia, doença de tronco, *Acacia mearnsii*.

¹ Parte da monografia desenvolvida pelo primeiro autor para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

² Acadêmico de Engenharia Agrônoma, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba-PR.

³ Engenheiro-Agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. alvaro@cnpf.embrapa.br

⁴ Engenheiro-Agrônomo, Mestre, Professor da PUC-PR.

Micelial Growth and Sporulation of Black Wattle (*Acacia mearnsii*) *Phytophthora* Isolates

ABSTRACT

Seven *Phytophthora* sp. isolates from black wattle (*Acacia mearnsii*) were evaluated based on mycelial growth and sporangia production. The greatest mycelial growth rate were observed on carrot-agar and V-8 at 20 and at 28°C. The isolates sporulated under liquid cultures (KNO₃ solution and sterilized water) in continuous light. Sporangia were ovoid, papillated and non-caducous. All isolates were pathogenic to black wattle.

Keywords: Gummosis, etiology, stem disease, *Acacia mearnsii*.

1. INTRODUÇÃO

A acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) é plantada extensivamente no estado do Rio Grande do Sul em área superior a 100.000 ha. É espécie de rápido crescimento e múltiplas utilizações, desde a produção de tanino, extraído de sua casca e utilizado em curtumes de couros e peles, produção de anticorrosivos e no tratamento de água, até a madeira empregada como lenha e para produção de carvão, celulose, papel e chapa de fibra.

O principal problema fitossanitário da acácia-negra é a doença conhecida como gomose de *Phytophthora* sp. (Santos et al., 1998). Essa doença acarreta prejuízos relevantes à cultura da acácia-negra, por danificar a casca, principalmente nas porções basais e mediana do tronco. Os sintomas da gomose caracterizam-se por lesões necróticas na casca, de tamanhos variados, com exsudação ou não de goma, localizados no colo e ao longo do tronco.

Há falta de trabalhos sobre as características morfofisiológicas dos isolados de *Phytophthora* que atacam a acácia-negra no Brasil. A maioria desses isolados

produz poucos ou não produzem esporângios sobre meio de cultura sólido, dificultando os trabalhos de produção de inóculo com os mesmos. Assim, neste trabalho, estudou-se a influência da temperatura e do meio de cultura no crescimento micelial e a influência de diferentes substratos na indução à esporulação de isolados de *Phytophthora* da gomose da acácia-negra.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e na casa-de-vegetação da Embrapa Florestas, Colombo-PR, no período de março a dezembro de 2001.

Isolados. Os isolados de *Phytophthora* sp. utilizados nos diversos experimentos pertencem à coleção do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Florestas e foram provenientes de acácia-negra e coletados no Estado do Rio Grande do Sul, denominados TR-1, TR-2, TR-3, TR-4, TR-5, AN 11 e AN 20. Todos os isolados foram patogênicos à acácia-negra.

Crescimento micelial. Foram testados os efeitos de oito temperaturas e de três meios de cultura sobre o crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora*. A metodologia consistiu na transferência de discos de cultura de 7 mm de diâmetro de cada isolado desenvolvido em BDA, para o centro de placas de Petri de 90 mm de diâmetro, que continham os meios BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 18 g de ágar e 1000 ml de água destilada), CA (200g de cenoura, 15g ágar e 1000ml de água destilada) e V8 (200ml de suco V8 "Campbell", 3 g de CaCO₃ e 18 g de ágar e 800ml de água destilada).

As placas foram incubadas nas temperaturas de 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36°C. As avaliações, de diâmetro e aspecto morfológico das colônias, foram realizadas diariamente até o 7º dia de incubação.

Esporulação. Os isolados, testados previamente, produziram raros esporângios em vários meios de cultura sólidos, como BDA, CA e V8. Assim, avaliou-se o comportamento dos isolados TR-1 e TR-2 quanto à produção de esporângios, em presença ou ausência de KNO₃ e água destilada esterilizada.

Neste experimento, os isolados de *Phytophthora* sp. foram crescidos em meio CA, sendo que parte das placas de Petri foram incubadas no escuro contínuo e a outra parte sob luz contínua, fornecida por lâmpadas fluorescentes, 40 watts, luz do dia, colocadas a cerca de 25 cm de altura. O tratamento escuro contínuo consistiu em placas de Petri envolvidas em papel alumínio, sob as mesmas condições de incubação.

Após 7 dias de incubação o meio de cultura contendo micélio fúngico foi cortado em tiras paralelas de 4 mm de largura. Em seguida, as tiras foram transferidas para placas de Petri esterilizadas e distribuídas de maneira que ficassem cerca de 4 mm distanciadas entre si. As placas foram submetidas aos seguintes tratamentos: a) lâmina de água destilada esterilizada; e b) lâmina de solução de KNO_3 , pH=6, 0,001 M. O conjunto foi distribuído em prateleiras e submetido à iluminação constante, nas mesmas condições anteriormente descritas.

A avaliação foi feita após um período de incubação de dez dias, quantificando-se o número de esporângios formados. Foram avaliados dez campos por placa, sob microscópio óptico. Nesse ensaio, cada placa correspondeu a uma repetição, sendo quatro repetições por tratamento.

Foram preparadas lâminas coletando-se um pouco da massa micelial e colocando-se em gotas de lactofenol sobre lâminas de vidro para observação de esporângios.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto a temperatura como o meio de cultura influenciaram o crescimento micelial dos isolados de *Phytophthora* (Figuras 1, 2 e 3). Os isolados de *Phytophthora* apresentaram pequenas variações entre si, na taxa de crescimento, em cada temperatura testada.

Na faixa entre 24°C e 28°C, verificou-se o crescimento máximo; no entanto, os isolados não cresceram a 8°C e nem a 36°C. Para os isolados AN11 e AN20 houve uma redução do crescimento micelial na temperatura de 32°C (Fig. 1 e 2).

Waterhouse et al. (1983) agruparam as espécies de *Phytophthora* de acordo

com as temperaturas ótimas para crescimento. Os isolados de *Phytophthora* sp. em estudo enquadram-se no grupo intermediário, em que o crescimento ótimo é obtido em temperatura em torno de 25°C, exceto para o isolado TR-1 que poderia ser enquadrado no grupo de temperatura ótima alta, com o máximo de crescimento entre 27 e 32°C. Luz & Campelo (1983), em estudo conduzido com *Phytophthora* spp. que ocorre no cacaueteiro, utilizaram a característica temperatura como fator preponderante no equilíbrio populacional de espécies de *Phytophthora* que causam podridão parda do cacaueteiro na Bahia.

Entre os meios testados observou-se maiores crescimentos das colônias de *Phytophthora* sp. em CA e V8. Estes resultados concordam com os obtidos por outros autores para várias espécies de *Phytophthora* (Urban, 1980; Rodrigues, 1985; Santos, 1991). O meio BDA condicionou os isolados de *Phytophthora* aos menores crescimentos miceliais em todas as temperaturas testadas.

Em conformidade com Rodrigues (1985) e Santos (1991) e neste trabalho, o crescimento micelial, bem como a morfologia de colônias de *Phytophthora* spp., variam com o meio de cultura, temperatura e isolado. Os isolados apresentaram pequenas variações quanto à morfologia das colônias. Nos meios CA e V8, as culturas foram petalóides, com bordas difusas, micélio denso e cotonoso, enquanto que, no meio BDA apresentou pouco micélio aéreo.

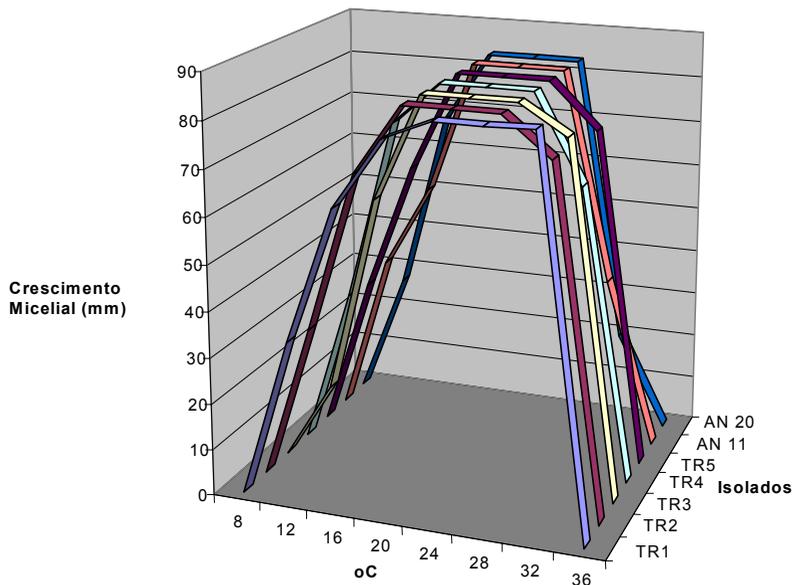


Fig. 1. Crescimento micelial de isolados de *Phytophthora* sp. de acácia-negra, em diferentes temperaturas, em meio cenoura-água

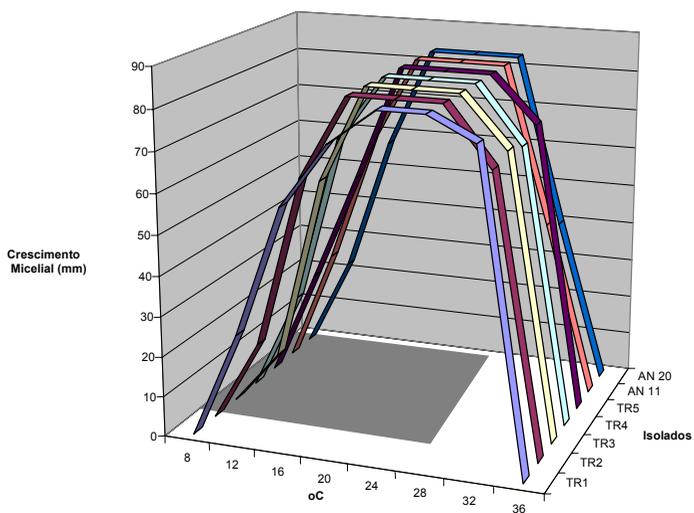


Fig. 2. Crescimento micelial de isolados de *Phytophthora* sp. de acácia-negra, em diferentes temperaturas, em meio V8.

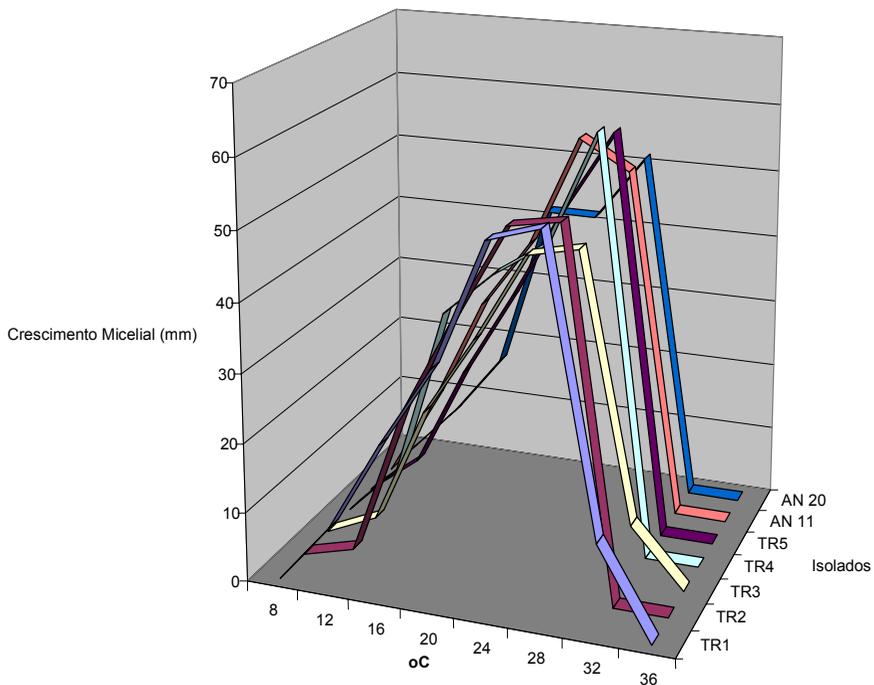


Fig. 3. Crescimento micelial de isolados de *Phytophthora* sp. de acácia-negra, em diferentes temperaturas, em meio BDA.

Os isolados de *Phytophthora* sp., TR-1 e TR-2, esporularam quando foram colocados em meio líquido, solução de KNO_3 ou água destilada esterilizada, sob luz contínua (Figura 4). O isolado TR4 produziu a maior quantidade de esporângios. O tratamento KNO_3 /LUZ foi mais eficiente para o isolado TR4 do que para o isolado TR1. As culturas formaram esporângios papilados, persistentes, ovóides e mais ou menos esféricos.

Os isolados de *Phytophthora* sp. produziram esporângios quando foram submetidos a estímulos. Estes resultados concordam com outros autores (Zentmyer & Erwin, 1970; Ribeiro, 1983; Urban, 1980; Zentmyer & Jefferson, 1974; Rodrigues, 1985), que demonstraram a influência estimuladora de líquidos na produção de esporângios para várias espécies de *Phytophthora*.

Observou-se que os esporângios formaram-se mais sobre a superfície das tiras de meio de cultura do que lateralmente a estas. Estas observações concordam com os resultados de outros autores (Lima, 1991; Zentmyer & Erwin, 1970), indicando a importância da aeração na formação dos esporângios.

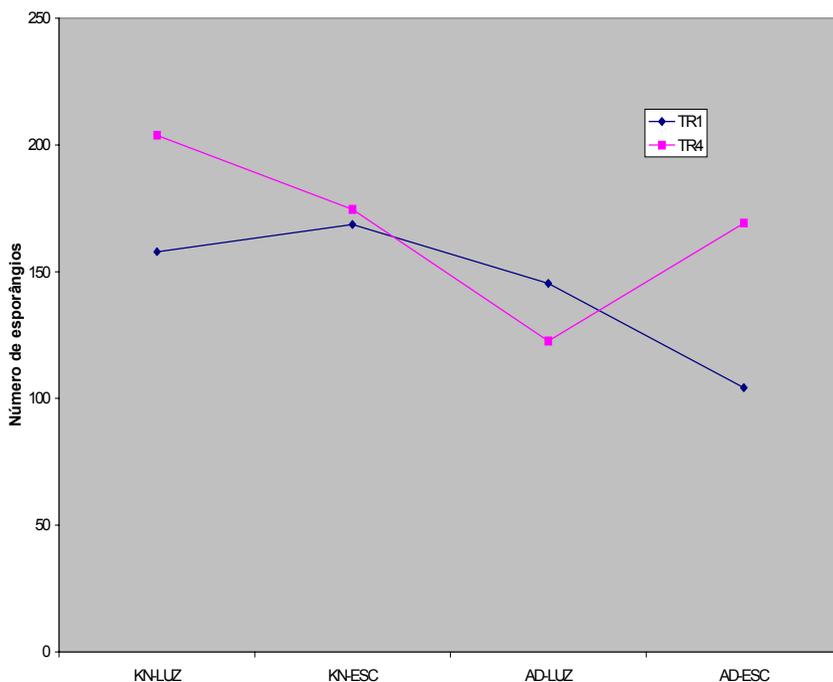


Fig. 4. Esporulação de dois isolados de *Phytophthora* sp. de acácia-negra, TR-1 E TR-4, em meio líquido: KN-LUZ (micélio crescido sob luz contínua + solução de KNO_3); KN-ESC (micélio crescido no escuro + solução de KNO_3); AD-LUZ (micélio crescido sob luz contínua + água destilada); AD-ESC (micélio crescido no escuro + água destilada).

4. CONCLUSÕES

- O maior crescimento micelial foi verificado nos meios CA e V-8 a 24 e 28°C;
- A 12°C o crescimento foi mínimo e a 8 e 36°C não houve crescimento micelial;
- A produção de esporângios ocorreu na presença de meio líquido (solução de KNO₃ ou água destilada esterilizada).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LIMA, M. F. **Estudo da variabilidade de *Phytophthora deechleri*, agente causador da podridão das raízes da mandioca, e detecção de fontes de resistência em genótipos do hospediero.** Brasília: UNB, 1991. 145 p.

LUZ, E. D. M. N.; CAMPELO, A. M. F. L. Temperatura, fator preponderante no equilíbrio populacional das espécies de *Phytophthora* que causam podridão parda na Bahia, Brasil. **Revista Theobroma**, v. 13, p. 361-375, 1983.

POSER, G. L.; GOSMANN, G.; D'ÁVILA, R. R. P.; HORA, M. A. Acácia-negra. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 63, p. 68-70. 1990.

RIBEIRO, O. K. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*. In: ERWIN, D. C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P. H. (Ed.). ***Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology.*** St. Paul: American Phytopathological Society, 1983. p. 139–147.

RODRIGUES, C. **Caracterização morfofisiológica de isolados de *Phytophthora*, obtidos de figo e de goiaba.** Viçosa: UFV, 1985. 77 p.

SANTOS, A. F. dos. **Identificação de *Phytophthora* em *Hevea*, histopatologia e resistência do hospedeiro.** Viçosa: UFV, 1991. 139 p.

SANTOS, A. F. dos; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Caracterização de tipos de gomose da acácia-negra (*Acacia mearnsii*) no sul do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 37, p. 31-40, 1998.

URBEN, A. F. **Phytophthora capsici Leonian agente etiológico da murcha de *Capsicum annum* L. em Minas Gerais**. Viçosa: UFV, 1980. 63 p. Dissertação de Mestrado.

WATERHOUSE, G. M.; NEWHOOK, F. J.; STAMPS, D. J. Present criteria for classification of Phytophthora. In: ERWIN, D. C.; BARTNICKI-GARCIA, S.; TSAO, P. H. (Ed.). **Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1983. p. 139–147.

ZEILJEMAKER, F. C. J. The gummosis of black wattle: a complex of disease In: WATTLE RESEARCH INSTITUTE. **Report for 1967-68**. Pietermaritzburg, 1968. p. 40-43.

ZENTMYER, G. A.; ERWIN, D. C. Development and reproduction of *Phytophthora*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 1120–1127, 1970.

ZENTMYER, G. A.; JEFFERSON, L. Studies of *Phytophthora citricola*, isolated from *Persea americana*. **Mycologia**, New York, v. 65, p. 830–845, 1974.